2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

小野薬品工業株式会社

目次

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表.....3
2.6.1　緒言.....3

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

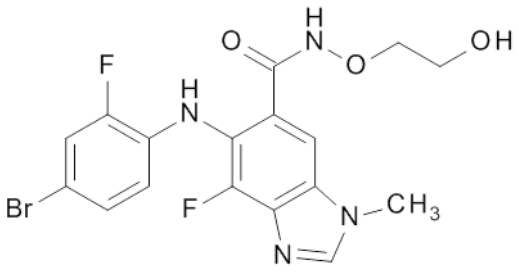
Binimetinib は強力かつ選択的でアロステリック ATP 非競合的な MEK 阻害剤である．

MAP キナーゼ経路（RAS/RAF/MEK/ERK）は，細胞の分化，増殖，生存などを制御するシグナル伝達機構である．RAF には 3 種類のサブタイプ（ARAF，BRAF，CRAF）が知られており，悪性黒色腫の約 60%に BRAF 遺伝子の変異が認められている．本変異により MAP キナーゼ経路のシグナル伝達が亢進するため，細胞が異常に増殖する．BRAF の下流に存在する MEK を阻害する薬剤は，BRAF 変異により恒常的に活性化した MAP キナーゼ経路のシグナル伝達を抑制するため BRAF 変異を有する悪性黒色腫に対する抗腫瘍効果が期待できる．また，MEK と RAF を同時に阻害すると，活性化した MAP キナーゼ経路のシグナル伝達を効率的に遮断するため，単剤投与時よりも強力な抗腫瘍効果が期待できる．

Binimetinib は，ヒト MEK1 及び MEK2 の活性化並びにキナーゼ活性を阻害することで MEK の基質である ERK のリン酸化を阻害し，BRAF 変異を有する悪性黒色腫細胞の増殖を抑制した．更に，binimetinib と BRAF 阻害剤である encorafenib の併用は，単剤より強力な抗腫瘍効果を示した．

これらのことから，binimetinib は BRAF 変異を有する悪性黒色腫に対する新たな治療薬になり得ると考えた．

【構造式】



【化学名】

5-[(4-Bromo-2-fluorophenyl)amino]-4-fluoro-*N*-(2-hydroxyethoxy)-1-methyl-1*H*-benzimidazole-6-carboxamide

2.6.1 緒言
ビニメチニブ

本申請における効能・効果及び用法・用量の案は以下のとおりである.

【効能・効果（案）】

BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫

【用法・用量（案）】

エンコラフェニブとの併用において，通常，成人にはビニメチニブとして 1 回 45mg を 1 日 2 回，12 時間毎を目安に経口投与する.

2.6.2 薬理試験の概要文

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 3
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.2.3 副次的薬理試験 21
2.6.2.4 安全性薬理試験 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 25
2.6.2.6 考察及び結論 26
2.6.2.7 図表 28
2.6.2.8 参考文献 29

2.6.2 薬理試験の概要文

本項で使用した用語及び略号を表 2.6.2-1 に，関連化合物の名称を表 2.6.2-2 に示す.

表 2.6.2-1 用語及び略号一覧

用語及び略号	内容又は日本語名称
ARAF	A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
ATP	アデノシン三リン酸
Binimetinib	ビニメチニブ
BMF	Bcl-2 Modifying Factor
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
Cmax	最高血中濃度
CMC	カルボキシメチルセルロース
CRAF	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase
DMSO	ジメチルスルホキシド
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FCOHb	総ヘモグロビン中に存在するカルボキシヘモグロビンの割合
FMetHb	総ヘモグロビン中に散在するメトヘモグロビンの割合
FOB	機能観察総合評価法
FO_2Hb	総ヘモグロビン（tHb）中に存在する酸素化ヘモグロビンの割合
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GPCR	G タンパク質共役型受容体
HCO_3act	重炭酸量
HEK	ヒト胎児由来腎臓細胞
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
LD_{50}	半数致死量
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
mRNA	メッセンジャーRNA
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
pCO_2	二酸化炭素分圧
PCR	Polymerase chain reaction
pERK	リン酸化 ERK
pO_2	酸素分圧
QTc	心拍数で補正した QT
sO_2	酸素飽和度
tCO_2	総二酸化炭素量
tHb	総ヘモグロビン量
TK	トキシコキネティクス
TTE	Time to endpoint
Tmax	最高血漿又は腫瘍中濃度到達時間

表 2.6.2-2　関連化合物の一覧

名称	その他の名称
Binimetinib	MEK162
AR00426032	Binimetinib の代謝物
Encorafenib	LGX818

2.6.2.1 まとめ

薬理試験では，*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で binimetinib の作用を検討した．また，binimetinib と RAF 阻害剤である encorafenib の併用効果も検討した．

効力を裏付ける試験（Binimetinib 単剤）

In vitro 試験では，binimetinib は不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化，並びに活性型 MEK1 による基質タンパク質 ERK のリン酸化（図 2.6.2.1-1）をいずれも阻害し，活性型 MEK1 に対する阻害様式の検討より ATP との不競合的なアロステリック阻害剤であることが示された．また，binimetinib は MEK1 及び MEK2 以外の 200 種類以上のタンパク質キナーゼを阻害しなかった．Binimetinib は，BRAF V600 変異（V600E，V600D 又は V600K）を有するヒト悪性黒色腫細胞に対して，ERK のリン酸化を阻害し，細胞増殖を抑制した．

In vivo 試験では，binimetinib は BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞を用いたマウス異種移植モデルにおいて，腫瘍中の ERK のリン酸化を阻害し，抗腫瘍効果を示した．MAP キナーゼ経路の活性化により誘導される DUSP6 の腫瘍中での遺伝子発現は，binimetinib の抗腫瘍効果に応じて減少した．

効力を裏付ける試験（Binimetinib 及び encorafenib 併用）

Binimetinib と encorafenib の併用は，BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞の増殖を単剤よりも低濃度から強力に抑制し，マウス異種移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示した．特に，長期的な抗腫瘍効果を評価したモデルでは，binimetinib 及び encorafenib の単剤投与は短期的な効果を発現したが，獲得耐性の出現により腫瘍は再増殖した．これに対して両剤の併用投与は，一般状態及び体重に明らかな影響を及ぼすことなく強力に腫瘍を縮小させるとともに，腫瘍の再増殖を抑制した．

以上より，binimetinib と encorafenib の併用は，BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞の増殖を強力に抑制し，マウス異種移植モデルにおいて獲得耐性の出現を遅延させたことから，BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫に対する持続的な臨床効果が期待される．

副次的薬理作用

Binimetinib は，60 種類の GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素に対し，10 μ mol/L で 50%以上阻害又は活性化しなかった．

安全性薬理試験

Binimetinib は，ラット又はサルにおいて中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する影響を示さず，ラットにおける中枢神経系及び呼吸系に対する無影響量は 100 mg/kg，サルにおける体温及び心血管系に対する無影響量は 10 mg/kg であった．Binimetinib は 10 μ mol/L 以上で hERG チャネル電流を阻害したが，その IC_{50} 値は 30 μ mol/L（13.2 μ g/mL）を超える濃度であった．また，binimetinib の代謝物である AR00426032 は，30 μ mol/L（12.8 μ g/mL）まで hERG チャネル電流に対する明らかな阻害作用を示さなかった．補足的安全性薬理試験において，binimetinib は最高投与量の 100 mg/kg までラットの胃腸管系及び腎／泌尿器系に対する影響を示さなかった．

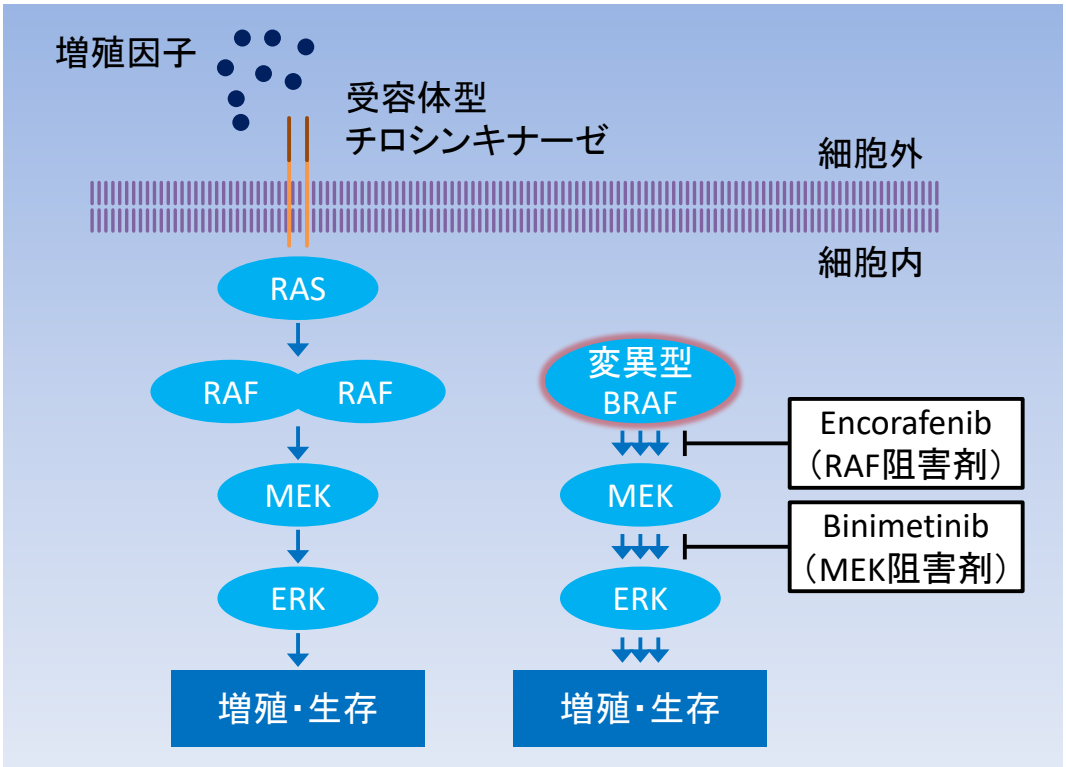


図 2.6.2.1-1　MAP キナーゼ経路の概略

MAP キナーゼ経路は，分化，増殖，生存など様々な細胞機能を制御するシグナル伝達機構である．受容体型チロシンキナーゼなどを介した細胞外からの刺激により活性化した RAS が RAF を活性化し，二量体化した RAF が下流の MEK をリン酸化し，リン酸化された MEK が更に下流の ERK をリン酸化することでシグナルが伝達される [1) 2) 3)]．MAP キナーゼ経路のシグナル伝達は，正常細胞では厳密に制御されている．一方，RAS や RAF などに遺伝子変異を有するがん細胞では，MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化するために細胞の異常増殖や長期生存が引き起こされる [1) 2) 3)]．

RAF には 3 種類のサブタイプ（ARAF，BRAF 及び CRAF）が知られており，このうち BRAF 遺伝子の変異は，悪性黒色腫の約 60%の患者で認められる [2) 4) 5)]．キナーゼドメイン内に存在する 600 番目のバリンがグルタミン酸，アスパラギン酸又はリジンに置換した（V600E，V600D 又は V600K）変異型 BRAF は，野生型と比較して極めて高いキナーゼ活性を持ち，単量体として，RAS の活性化の有無にかかわらず恒常的に MEK 及び ERK を活性化させることで細胞の異常増殖を誘発する [2) 5) 6)]．

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

不活性型 MEK が活性型 MEK に変換する段階，及び活性型 MEK が ERK リン酸化を触媒する段階（図 2.6.2.2.1-1），それぞれに対する binimetinib の阻害活性を検討した．また，binimetinib の BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用を検討した．更に，binimetinib の代謝物である AR00426032 の活性型 MEK1 に対する阻害活性を検討した．

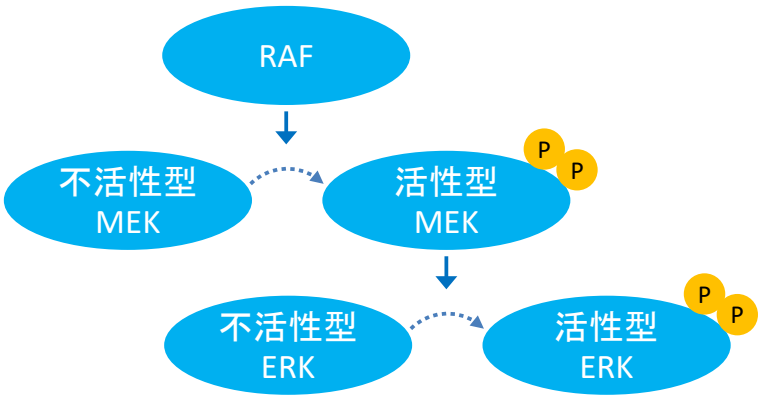


図 2.6.2.2.1-1 MEK 阻害剤の作用点

不活性型 MEK（MEK1 及び MEK2）は RAF によりリン酸化されることで活性型 MEK に変換する．続いて，活性型 MEK は不活性型 ERK をリン酸化することで活性型 ERK に変換する．MEK 阻害剤の作用点は不活性型 MEK が活性型 MEK に変換する段階，及び活性型 MEK が ERK リン酸化を触媒する段階が想定される．

2.6.2.2.1.1 不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化に対する阻害活性

［評価資料：4.2.1.1-1］

不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化に対する binimetinib の阻害活性を検討した．

不活性型 MEK1（又は不活性型 MEK2）に，binimetinib，BRAF 及び ATP（25 μmol/L）を含む緩衝液を添加し，30 分間反応させた．BRAF による MEK1（又は MEK2）活性化反応を encorafenib（RAF 阻害剤，1 μmol/L）で停止させるとともに，ERK 及び[γ-^{33}P]ATP（終濃度 5 μmol/L；20 μCi/mL）を含む緩衝液を添加し，更に 30 分間反応させた．ERK に取り込まれた[γ-^{33}P]ATP の放射活性を不活性型 MEK から変換された活性型 MEK のキナーゼ活性の指標として，binimetinib の阻害活性を評価した．

Binimetinib は不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 16 及び 46 nmol/L であった．

2.6.2.2.1.2 活性型 MEK1 に対する阻害活性

［評価資料：4.2.1.1-2］

活性型 MEK1 に対する binimetinib の阻害活性を検討した.

活性型 MEK1 に，binimetinib，[γ-^{33}P]ATP（10 μmol/L；5 μCi/mL）及び ERK を含む緩衝液を添加し，45 分間反応させた．MEK1 の基質タンパク質である ERK に取り込まれた[γ-^{33}P]ATP の放射活性を活性型 MEK1 のキナーゼ活性の指標として，binimetinib の阻害活性を評価した.

Binimetinib は処置濃度に応じて活性型 MEK1 を阻害し，IC_{50} 値は 12.1 nmol/L であった.

2.6.2.2.1.3 活性型 MEK1 に対する阻害様式

［参考資料：4.2.1.1-2］

活性型 MEK1 に対する binimetinib の阻害様式を検討した.

活性型 MEK1 に，binimetinib，[γ-^{33}P]ATP（0.23～30 μmol/L；5 μCi/mL）及び ERK を含む緩衝液を添加し，25～30 分間反応させた．ERK に取り込まれた[γ-^{33}P]ATP の放射活性を活性型 MEK1 のキナーゼ活性の指標として，binimetinib の阻害活性を評価した.

Binimetinib の阻害活性は ATP 濃度の上昇に依存して増強された．この結果は，binimetinib が ATP と複合体を形成した活性型 MEK1 に選択的に結合していることを意味する [7]．したがって，活性型 MEK1 に対する binimetinib の阻害様式は ATP との不競合的なアロステリック阻害であることが示された.

2.6.2.2.1.4 MEK 以外のキナーゼに対する阻害活性

［参考資料：4.2.1.1-3］

MEK 以外の 218 種類のタンパク質キナーゼに対する binimetinib の阻害活性を検討した.

Binimetinib は，いずれのキナーゼに対しても 10 μmol/L で 50%以上の阻害を示さなかった.

2.6.2.2.1.5 BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する ERK リン酸化阻害作用

［評価資料：4.2.1.1-4］

BRAF V600E 変異を有する 4 種類のヒト悪性黒色腫細胞株を用いて，MEK の基質タンパク質である ERK のリン酸化に対する binimetinib の阻害作用を検討した.

Binimetinib（0.13～10000 nmol/L）を含む培地中で各細胞株を 24 時間培養した．細胞の固定及び透過処理後，in-cell Western 法により pERK 量を測定し，binimetinib のリン酸化阻害作用を評価した.

結果を表 2.6.2.2.1.5-1 に示した．Binimetinib は，いずれの細胞株に対しても処置濃度に応じて ERK リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 7.6～125.8 nmol/L，最大阻害率は 73.0～97.3%であった．

表 2.6.2.2.1.5-1　BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する ERK リン酸化阻害作用

細胞株名	BRAF 変異	IC_{50} 値（nmol/L）	最大阻害率（%）
A375	V600E	27.4	87.4
UACC-62	V600E	14.4	76.1
RPMI-7951	V600E	125.8	73.0
COLO 800	V600E	7.6	97.3

IC_{50} 値及び最大阻害率は，tripricate で行った結果を示した．

2.6.2.2.1.6　BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用

［評価資料：4.2.1.1-4］

BRAF V600E，V600D 又は V600K 変異を有する 8 種類のヒト悪性黒色腫細胞株に対する binimetinib の増殖抑制作用を検討した．

Binimetinib（0.13～10000 nmol/L）を含む培地中で各細胞株を 72 時間培養後，レサズリンアッセイ法により生細胞数を測定し，binimetinib の増殖抑制作用を評価した．

結果を表 2.6.2.2.1.6-1 に示した．Binimetinib は，いずれの細胞株に対しても処置濃度に応じて細胞増殖を抑制し，IC_{50} 値は 34.1～9272.0 nmol/L，最大抑制率は 43.0～116.8%であった．

表 2.6.2.2.1.6-1　BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用

細胞株名	BRAF 変異	IC_{50} 値（nmol/L）	最大抑制率（%）
A375	V600E	34.4±9.3	96.0±0.9
UACC-62	V600E	34.1±0.7	111.9±8.2
IGR-1	V600K	372.2±20.2	86.0±5.9
RPMI-7951	V600E	4359.1±4717.6	56.8±3.1
MDA-MB-435S	V600E	5046.6±7005.2	54.1±14.9
WM-115	V600D	99.8±16.0	116.8±17.9
IGR-39	V600E	9272.0±1261.0	43.0±13.3
COLO 800	V600E	93.6±28.2	112.3±21.8

IC_{50} 値及び最大抑制率は，tripricate で行った 2～3 試験の結果の平均値及び標準偏差を示した．

2.6.2.2.1.7 AR00426032 の活性型 MEK1 に対する阻害活性

［参考資料：4.2.1.1-2］

活性型 MEK1 に対する AR00426032 の阻害活性を検討した．

活性型 MEK1 に，AR00426032，[γ-^{33}P]ATP（10 μmol/L；5 μCi/mL）及び ERK を含む緩衝液を添加し，45 分間反応させた．MEK1 の基質タンパク質である ERK に取り込まれた[γ-^{33}P]ATP の放射活性を活性型 MEK1 のキナーゼ活性の指標として，AR00426032 の阻害活性を評価した．

AR00426032 は処置濃度に応じて活性型 MEK1 を阻害し，IC_{50} 値は 7.1 nmol/L であった．

2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

Binimetinib のマウス異種移植モデルにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用及び抗腫瘍効果を検討した．媒体には 0.5 vol%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を用い，投与経路は経口とした．

2.6.2.2.2.1 ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用

［参考資料：4.2.1.1-5］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を用いたマウス異種移植モデルにおける binimetinib の腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用を検討した．

5×10^6 個の A375 を雌性ヌードマウス（HSD:Athymic Nude-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，腫瘍が定着した時点で 1 群当たり 3 例を割り付けた．媒体あるいは binimetinib を投与した後，血液及び腫瘍を採取し，血漿及び腫瘍中 binimetinib 濃度を分析した．腫瘍中の pERK 量は電気化学発光免疫測定法により測定した．MAP キナーゼ経路の活性化により誘導される DUSP6[8] 及びアポトーシス関連分子 BMF[9] の mRNA 量は，定量的リアルタイム PCR 法により測定した．

単回投与試験では，binimetinib を 30，100 及び 300 mg/kg で投与し，1，6，12 及び 24 時間後に血液及び腫瘍を採取した．Binimetinib の血漿及び腫瘍中濃度は投与量に応じて増加した．Binimetinib は，すべての投与群で 1～12 時間後の腫瘍中 ERK リン酸化を 80%以上阻害し，DUSP6 の遺伝子発現を 70%以上抑制した．また，binimetinib は腫瘍中で BMF の遺伝子発現を誘導し，24 時間後も誘導作用が持続した．

反復投与試験では，binimetinib を 30 及び 100 mg/kg で 1 日 2 回，あるいは 300 mg/kg で間歇的（各週の 1～3 日目に 1 日 2 回）に，14 日間反復投与した．15 日目に同量を単回投与し，1，6，12 及び 24 時間後に血液及び腫瘍を採取した．Binimetinib は，すべての投与群で 1～6

時間後の腫瘍中 ERK リン酸化を 50%以上阻害し，DUSP6 の遺伝子発現を 70%以上抑制した．また，binimetinib は腫瘍中で BMF の遺伝子発現を誘導し，24 時間後も誘導作用が持続した．反復投与による血漿及び腫瘍中 binimetinib 濃度の蓄積はなく，単回投与と比較して，ERK リン酸化阻害作用，DUSP6 発現抑制作用及び BMF 発現誘導作用の増強は認められなかった．

2.6.2.2.2.2 ヒト大腸がん細胞株 HT-29 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用

［参考資料：4.2.1.1-6］

BRAF V600E 変異を有するヒト大腸がん細胞株 HT-29 を用いたマウス異種移植モデルにおける binimetinib の腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用を検討した．

5×10^6 個の HT-29 を雌性ヌードマウス（Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，腫瘍が定着した時点で 1 群当たり 4 例を割り付けた．割り付け後，媒体あるいは binimetinib を 3，10 及び 30 mg/kg で単回投与した．投与 2，8，12 及び 24 時間後に血液及び腫瘍を採取し，血漿及び腫瘍中 binimetinib 濃度を分析した．腫瘍中の ERK 量及び pERK 量は，ウエスタンブロッティングにより測定した．

結果を図 2.6.2.2.2.2-1 に示した．Binimetinib の血漿及び腫瘍中濃度は概ね投与量に比例して増加し，Tmax は 2 時間であった．Binimetinib は，腫瘍の縮小効果が認められる 10 mg/kg 以上で腫瘍中 ERK リン酸化を投与 24 時間後まで持続的に 50%以上阻害した．

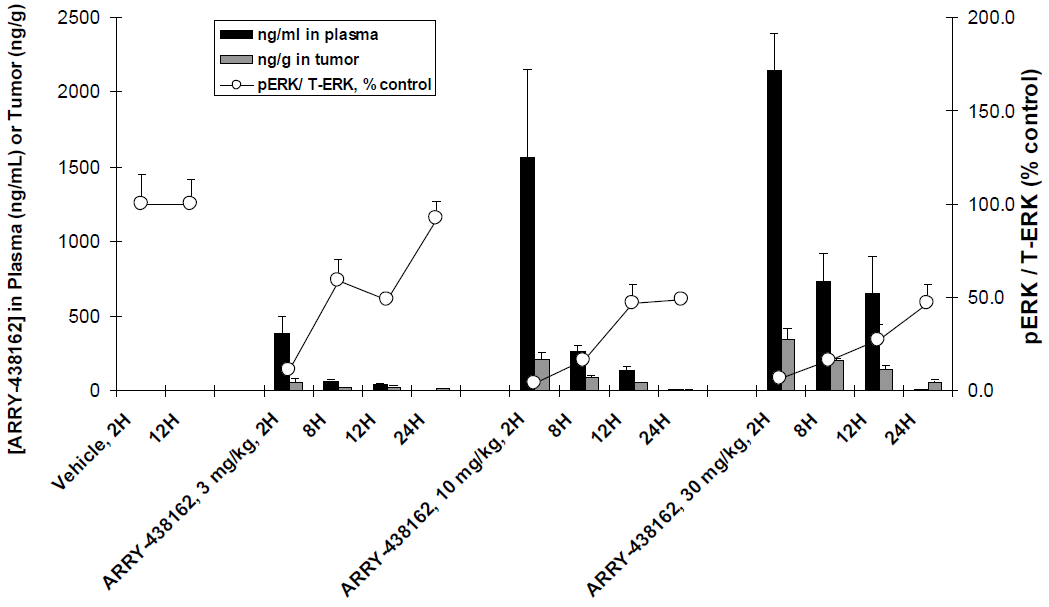


図 2.6.2.2.2.2-1　ヒト大腸がん細胞株 HT-29 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用

BRAF V600E 変異を有するヒト大腸がん細胞株 HT-29 を雌性ヌードマウスの皮下に移植した．腫瘍が定着した時点で binimetinib（ARRY-438162）を 3，10 及び 30 mg/kg で単回投与した．投与 2，8，12 及び 24 時間後に血液及び腫瘍を採取し，血漿及び腫瘍中 binimetinib 濃度を分析した．腫瘍中の ERK（T-ERK）量及び pERK 量は，ウエスタンブロッティングにより測定した．データは 4 例の平均値及び標準誤差を示した．

2.6.2.2.2.3　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果

［評価資料：4.2.1.1-7］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を用いたマウス異種移植モデルにおける binimetinib の抗腫瘍効果を検討した．

A375 移植マウスより摘出した腫瘍組織片（～1 mm^3）を雌性ヌードマウス（HSD:Athymic Nude-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，12 日後に 1 群当たり 11 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体あるいは binimetinib を 1，3，10 及び 30 mg/kg で 1 日 2 回，21 日間反復投与した．一般状態観察及び体重測定を行うとともに，腫瘍体積を週に 2 回測定した．腫瘍体積が 2000 mm^3 に到達した個体は，その時点で評価を中止した．腫瘍体積が 2000 mm^3 未満の個体は，投与完了後も最長で投与開始 74 日後まで評価を継続した．投与開始日から評価日までの腫瘍体積の減少を，投与開始日の腫瘍体積で除して百分率で示した値を腫瘍縮小率とした．投与開始から腫瘍体積が 2000 mm^3 に到達するまでに要した日数を TTE とした．

結果を図 2.6.2.2.2.3-1 に示した．Binimetinib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさなかった．媒体投与マウスで持続的な腫瘍体積の増加がみられたのに対して，binimetinib は投与量に応じて腫瘍の増殖を抑制し，10 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた．投与開始 11 日後での腫瘍縮小率は，10 及び 30 mg/kg で，それぞれ 60 及び 93%であった．すべての媒体投与マウスの腫瘍体積が移植 25 日後までに 2000 mm^3 に到達し，TTE の中央値は 11.7 日であった．Binimetinib は，10 及び 30 mg/kg で，TTE の中央値がそれぞれ 38.5 及び 63.1 日であった．

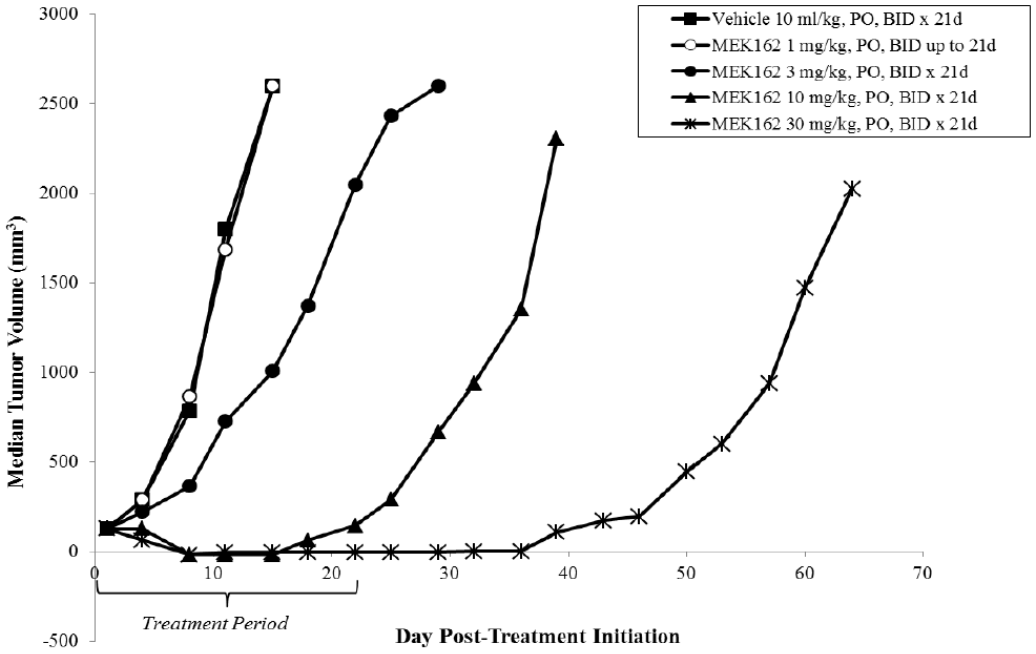


図 2.6.2.2.2.3-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を雌性ヌードマウスの皮下に移植した．移植 12 日後から，binimetinib（MEK162）を 1，3，10 及び 30 mg/kg で 1 日 2 回，21 日間反復投与した．データは 11 例の中央値を示した．

2.6.2.2.2.4　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（連日投与と間歇的投与の比較）

［参考資料：4.2.1.1-8］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を用いたマウス異種移植モデルにおける binimetinib の抗腫瘍効果を連日投与と間歇的投与とで比較した．

5×10^6 個の A375 を雌性ヌードマウス（HSD:Athymic Nude-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，22 日後に 1 群当たり 12 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体あるいは binimetinib を 30 及び 100 mg/kg で 1 日 2 回，あるいは 300 mg/kg で間歇的（各週の 1～3 日目に 1 日 2 回）に，14 日間反復投与した．一般状態観察及び体重測定を行うとともに，腫瘍体積を週に 2 回測定した．

結果を図 2.6.2.2.2.4-1 に示した．Binimetinib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさなかった．Binimetinib は 30 及び 100 mg/kg で腫瘍の増殖を抑制し，投与開始 14 日後の腫瘍縮小率は，それぞれ 11 及び 20%であった．一方，binimetinib を 300 mg/kg で間歇的に投与した場合，明らかな抗腫瘍効果は認められなかった．

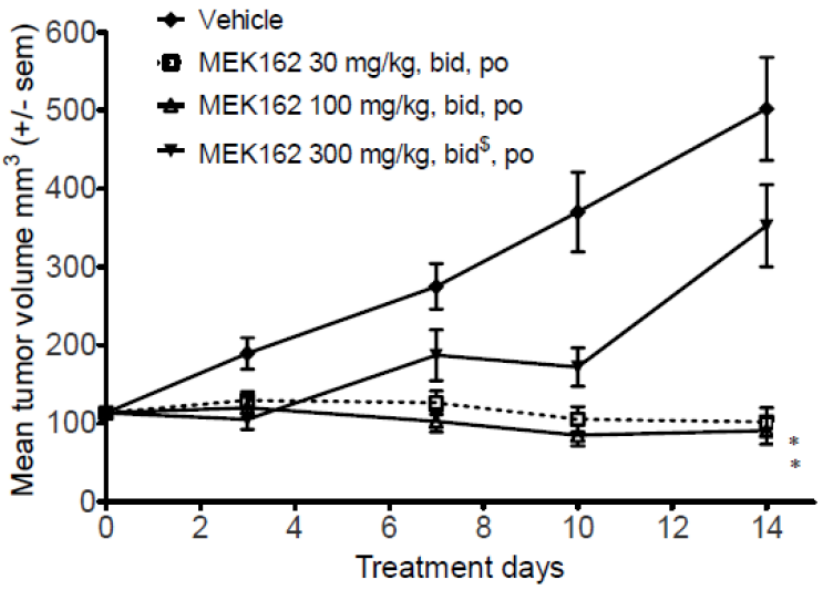


図 2.6.2.2.2.4-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（連日投与と間歇的投与の比較）

* p<0.05：媒体群に対する Kruskal-Wallis 検定

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を雌性ヌードマウスの皮下に移植した．移植 22 日後から，binimetinib（MEK162）を 30 及び 100 mg/kg で 1 日 2 回（bid），あるいは 300 mg/kg で間歇的（各週の 1～3 日目に 1 日 2 回，bid$）に，14 日間反復投与した．データは 12 例の平均値及び標準誤差を示した．

2.6.2.2.3　*In vitro* 試験（併用）

Binimetinib 及び encorafenib 併用の BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用を検討した．

2.6.2.2.3.1　ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用（併用）

［評価資料：4.2.1.1-9］

BRAF 変異の有無が確認されている 16 種類のヒト悪性黒色腫細胞株を用いて，binimetinib と encorafenib の併用による増殖抑制作用を検討した．

Binimetinib 及び encorafenib を含む培地中で各細胞株を 72 時間培養した後，CellTiter-Glo アッセイ法により生細胞数を測定し，増殖抑制作用を評価した．単剤では IC_{50} 値が 1000 nmol/L 未満の結果を，増殖抑制作用を示すと定義した．Lehar らの報告 [10] を参考に SS 及び CI を算出し，表 2.6.2.2.3.1-1 に示すように，SS 及び CI の組み合わせにより併用効果を判定した．相乗又は相加／相乗と判定された結果を，顕著な併用効果を示すと定義した．

結果を表 2.6.2.2.3.1-2 に示した．Binimetinib 及び encorafenib は，BRAF V600E 又は V600K 変異を有する 12 細胞株のうち，それぞれ 8 株に対して単剤で増殖抑制作用を示した．一方，野生型 BRAF を有する 4 細胞株に対して encorafenib は単剤で作用を示さず，binimetinib も 3

株で作用を示さなかった．Binimetinib と encorafenib の併用効果は，検討したすべての細胞株で確認された．相乗又は相加／相乗と判定され，顕著な併用効果を示したのは，BRAF V600E 又は V600K 変異を有する 12 細胞株中では 9 株，野生型 BRAF を有する 4 細胞株中では 2 株であった．

表 2.6.2.2.3.1-1　併用効果の判定基準

SS 及び CI の組み合わせ	併用効果
SS＞2.0，CI＜0.5	相乗
SS＞2.0，CI＞0.5	相加／相乗
1.0＜SS＜2.0，CI＜0.5	相加／相乗
SS＜1.0，CI＜0.5	相加
SS＜2.0，CI＞0.5	相加

表 2.6.2.2.3.1-2　ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用（併用）

細胞株名	Encorafenib IC_{50}(nmol/L)	Binimetinib IC_{50}(nmol/L)	SS	CI	併用効果	BRAF 変異
A375	5.8	20.0	1.20	0.87	相加／相乗	V600E
COLO 741	32.6	1190.4	1.45	0.27	相加／相乗	V600E
COLO 800	7.9	50.5	2.67	0.84	相加／相乗	V600E
IGR-1	167.6	893.0	3.81	0.02	相乗	V600K
IGR-37	17.6	82.8	1.03	0.70	相加／相乗	V600E
K029AX	12.8	78.8	2.59	0.73	相加／相乗	V600E
LOX IMVI	>2700	>2700	5.99	0.28	相乗	V600E
A2058	1486.1	978.0	2.07	0.34	相乗	V600E
IGR-39	>2700	>2700	0.70	nc	相加	V600E
RPMI-7951	>2700	>2700	1.02	nc	相加	V600E
SK-MEL-24	776.0	892.2	1.87	0.66	相加	V600E
UACC-62	3.7	47.0	1.26	0.93	相加／相乗	V600E
COLO 792	>2700	182.5	0.90	1.29	相加	なし
HMCB	>2700	>2700	2.86	0.04	相乗	なし
MeWo	>2700	>2700	2.60	0.25	相乗	なし
SK-MEL-31	1032.0	>2700	0.93	0.80	相加	なし

nc, not calculated

2.6.2.2.4 *In vivo* 試験（併用）

Binimetinib 及び encorafenib 併用のマウス異種移植モデルにおける抗腫瘍効果を検討した．投与経路は経口とした．

2.6.2.2.4.1 ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用，長期評価）

［評価資料：4.2.1.1-10］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 を用いた patient-derived xenograft モデルにおける binimetinib と encorafenib の併用による抗腫瘍効果を検討した．本モデルは，評価期間を延長することにより RAF 阻害剤に対する獲得耐性が出現することが報告されている[11]．

ドナーマウスより摘出した腫瘍組織片（継代回数 4 回）を雌性ヌードマウス（HSD:Athymic Nude-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，29 日後に 1 群当たり 8 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体（0.5 vol%Tween 80 含有 0.5 w/v%CMC），binimetinib 単剤（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（3 mg/kg，1 日 2 回）あるいは binimetinib（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（3 mg/kg，1 日 2 回）の併用を最長 117 日間反復投与した．一般状態観察及び体重測定を行うとともに，腫瘍体積を週に 2 回測定した．評価最終日（移植 145 日後）まで生存した個体に対しては，採血及び組織採取を行い，血液学検査と病理組織学的検査を実施した．

結果を図 2.6.2.2.4.1-1 及び図 2.6.2.2.4.1-2 に示した．Binimetinib 及び encorafenib は，単剤あるいは併用投与により一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさなかった．Binimetinib 及び encorafenib は，それぞれ単剤で腫瘍を縮小させたが，その効果を長期に持続することができず，腫瘍の再増殖がみられた．一方，binimetinib（3 及び 10 mg/kg）と encorafenib（3 mg/kg）の併用は，持続的な腫瘍縮小効果を示し，評価最終日までほぼ全例で腫瘍の再増殖はみられなかった．生存期間の中央値は，媒体群が 42 日，binimetinib 単剤（3 mg/kg）群が 92 日，binimetinib 単剤（10 mg/kg）群が 117 日であった．評価最終日に encorafenib 単剤（3 mg/kg）群の 6 例及び併用群の全例（各 8 例）が生存しており，生存の中央値は算出できなかった．生存曲線の解析では，binimetinib（10 mg/kg）と encorafenib（3 mg/kg）の併用群は各単剤群との間に有意差がみられた（$p<0.05$，log-rank 検定）．なお，血液学検査の結果，binimetinib 及び encorafenib いずれの単剤投与でも好中球数の増加などがみられたが，併用による増強はなかった．また，病理組織学的検査の結果，binimetinib 単剤で角膜縁の炎症がみられたが，併用による程度及び頻度の増強はなかった．一方，それぞれの単剤投与ではみら

れない肝臓小葉辺縁部への炎症細胞浸潤が併用時に認められ，binimetinib の投与量に応じて変化の程度は強くなった．

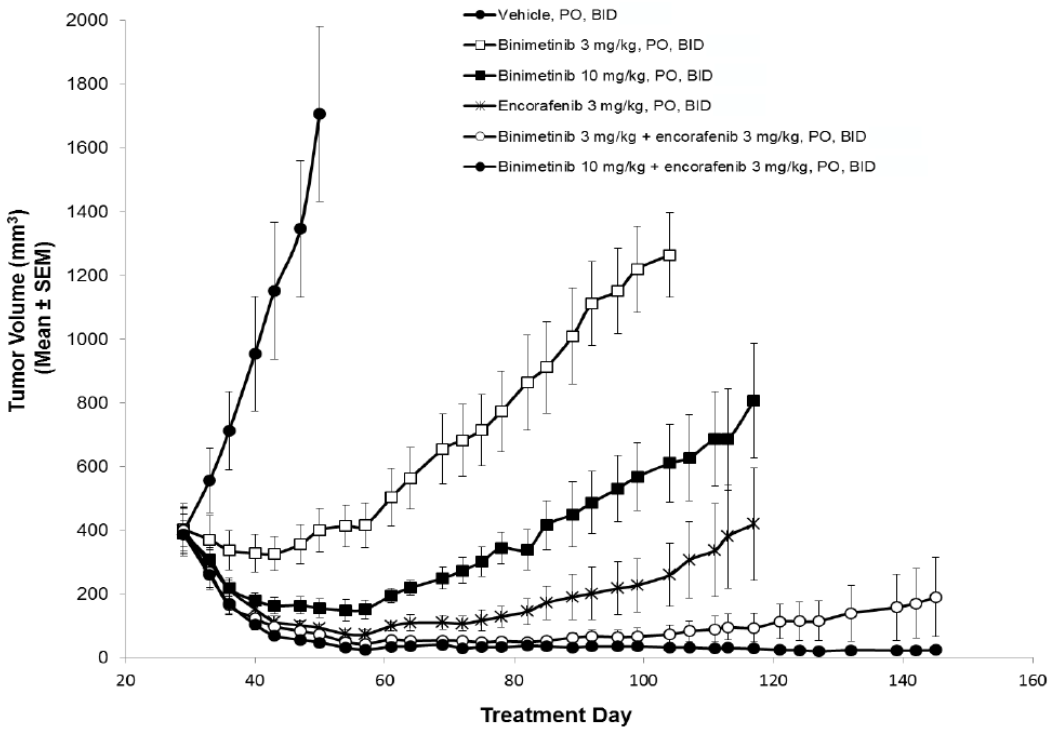


図 2.6.2.2.4.1-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 を雌性ヌードマウスの皮下に移植した．移植 29 日後から，binimetinib 単剤（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（3 mg/kg，1 日 2 回）あるいは binimetinib（3 及び 10 mg/kg（1 日 2 回））と encorafenib（3 mg/kg，1 日 2 回）の併用を最長 117 日間反復投与した．データは 8 例（投与開始時）の平均値及び標準誤差を示した．

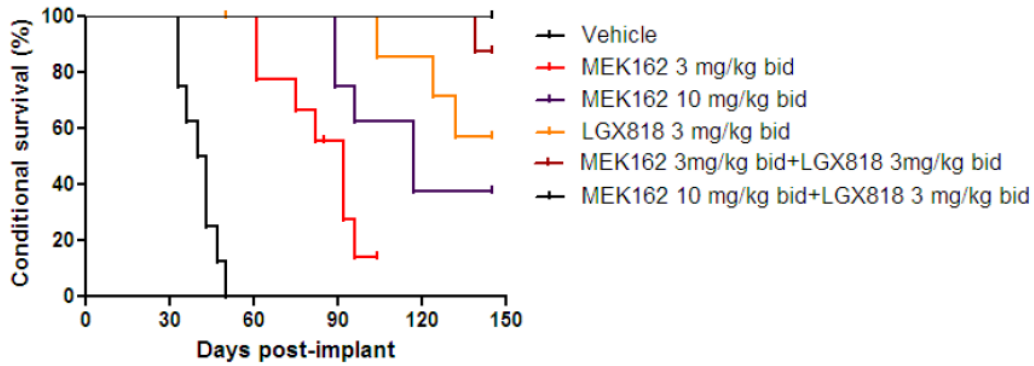


図 2.6.2.2.4.1-2　ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける生存率（併用）

腫瘍体積が 750 mm^3 未満の個体の生存率を示した．Binimetinib（MEK162）を 3 mg/kg で投与した 1 例は，中枢症状（旋回）のため，移植 86 日後に安楽死させた．Encorafenib（LGX818）を 3 mg/kg で投与した 1 例は，口周囲の炎症及び変色のため，移植 51 日後に安楽死させた．

2.6.2.2.4.2　　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

［参考資料：4.2.1.1-11］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を用いたマウス異種移植モデルにおける binimetinib と encorafenib の併用による抗腫瘍効果を検討した．

5×10^6 個の A375 を雌性ヌードマウス（NCr nu/nu）の皮下に移植し，18 日後に 1 群当たり7例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体（0.5 vol%Tween 80 含有 1 w/v%CMC），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）あるいは binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）の併用を反復投与した．一般状態観察及び体重測定を行うとともに，腫瘍体積を投与開始 4 日後より 2～3 日毎に測定した．TGI は，媒体群の腫瘍体積と被験化合物群の腫瘍体積との差を媒体群の腫瘍体積に対する割合として示した．投与開始 15 日後の時点で媒体群の腫瘍体積が規定の上限を超えたため，すべての投与を終了し，抗腫瘍効果を評価した．

結果を図 2.6.2.2.4.2-1 及び表 2.6.2.2.4.2-1 に示した．すべての群で一般状態及び体重推移に明らかな影響はみられなかった．Binimetinib 単剤投与での TGI は 40.2％であった．Encorafenib は投与量に応じて腫瘍増殖を抑制し，6，20 及び 60 mg/kg での TGI は，それぞれ 8.3，77.5 及び 90.0%であった．Binimetinib に encorafenib を 6，20 及び 60 mg/kg で併用した時の TGI は，それぞれ 78.2，89.9 及び 90.0%であった．Encorafenib の 20 及び 60 mg/kg は単剤で強い抗腫瘍効果を示したため併用効果を評価できなかったが，binimetinib に encorafenib の 6 mg/kg を併用すると抗腫瘍効果が増強した．

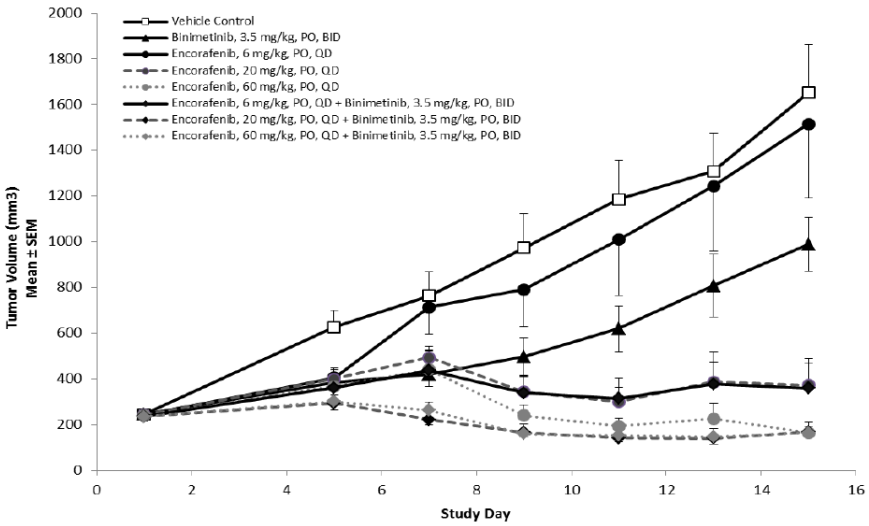


図 2.6.2.2.4.2-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を雌性ヌードマウスの皮下に移植した．移植 18 日後から，binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）あるいは binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）の併用を 14 日間反復投与した．データは 7 例の平均値及び標準誤差を示した．

表 2.6.2.2.4.2-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける TGI（併用）

群構成	TGI（%）
媒体	0.0
Binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）	40.2
Encorafenib（6 mg/kg，1 日 1 回）	8.3
Encorafenib（20 mg/kg，1 日 1 回）	77.5
Encorafenib（60 mg/kg，1 日 1 回）	90.0
Encorafenib（6 mg/kg，1 日 1 回）及び binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）併用	78.2
Encorafenib（20 mg/kg，1 日 1 回）及び binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）併用	89.9
Encorafenib（60 mg/kg，1 日 1 回）及び binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）併用	90.0

TGI は，媒体群の腫瘍体積と被験化合物群の腫瘍体積との差を媒体群の腫瘍体積に対する割合（平均値）として示した．

2.6.2.2.4.3　ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

［参考資料：4.2.1.1-12］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 を用いた patient-derived xenograft モデルにおける binimetinib と encorafenib の併用による抗腫瘍効果を検討した．

MEL13B4 細胞を雌性ヌードマウス（NCr nu/nu）の皮下に移植し，11 日後に 1 群当たり 8 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体（0.5 vol%Tween 80 含有 1 w/v%CMC），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）あるいは binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）の併用を反復投与した．一般状態観察及び体重測定を行うとともに，腫瘍体積を投与開始 4 日後より 2～3 日毎に測定した．TGI は，媒体群の腫瘍体積と被験化合物群の腫瘍体積との差を媒体群の腫瘍体積に対する割合として示した．投与開始 14 日後の時点で媒体群の腫瘍体積が規定の上限を超えたため，すべての群で投与を終了し，抗腫瘍効果を評価した．

結果を図 2.6.2.2.4.3-1 及び表 2.6.2.2.4.3-1 に示した．すべての群で一般状態及び体重推移に明らかな影響はみられなかった．Binimetinib 単剤投与時の TGI は 31%であった．Encorafenib は投与量に応じて腫瘍増殖を抑制し，6，20 及び 60 mg/kg での TGI は，それぞれ-4，48 及び 44%であった．Binimetinib に encorafenib を 6，20 及び 60 mg/kg で併用した時の TGI は，それぞれ 52，71 及び 63%であり，単剤投与と比べて抗腫瘍効果が増強した．

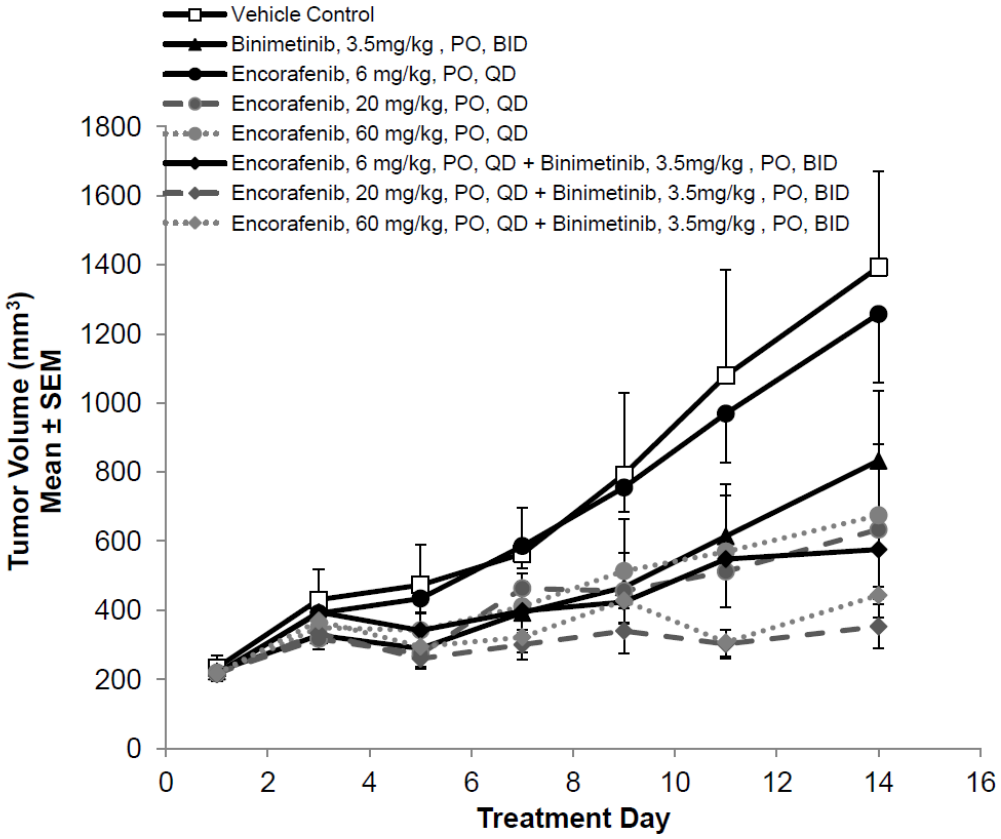


図 2.6.2.2.4.3-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 を雌性ヌードマウスの皮下に移植した．移植 11 日後から，binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）あるいは encorafenib（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）と binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）の併用を 14 日間反復投与した．データは 8 例（投与開始時，媒体群は 7 例）の平均値及び標準誤差を示した．

表 2.6.2.2.4.3-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 移植マウスにおける TGI（併用）

群構成	TGI（%）
媒体	0.0
Binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）	31
Encorafenib（6 mg/kg，1 日 1 回）	-4
Encorafenib（20 mg/kg，1 日 1 回）	48
Encorafenib（60 mg/kg，1 日 1 回）	44
Encorafenib（6 mg/kg，1 日 1 回）及び binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）併用	52
Encorafenib（20 mg/kg，1 日 1 回）及び binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）併用	71
Encorafenib（60 mg/kg，1 日 1 回）及び binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）併用	63

TGI は，媒体群の腫瘍体積と被験化合物群の腫瘍体積との差を媒体群の腫瘍体積に対する割合（平均値）として示した．

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 各種分子標的に対する作用

［参考資料：4.2.1.2-1］

Binimetinib の各種分子標的に対する作用を 60 種類の GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素を用いて検討した．Binimetinib は，いずれの分子標的に対しても 10 μmol/L で 50%以上阻害又は活性化しなかった．

2.6.2.4 安全性薬理試験

Binimetinib の安全性薬理試験として，*in vitro* で binimetinib の hERG チャネル電流に対する作用を評価し，ラット又はサルを用いて中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する作用を評価した．また，補足的安全性薬理試験として，ラットを用いて胃腸管系及び腎／泌尿器系に対する作用を評価した．いずれも GLP に準拠して実施した．

その他，*in vitro* で binimetinib の代謝物である AR00426032 の hERG チャネル電流に対する作用を評価した．また，術後の臨床環境を踏まえ，マウスを用いて binimetinib の創傷治癒及び細菌感染時の予後に及ぼす影響を探索的に評価した．これらの試験は GLP に準拠した試験ではないため，参考資料とした．

2.6.2.4.1 中枢神経系に対する作用

2.6.2.4.1.1 ラットにおける一般症状，行動，自発運動量及び体温に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

Crl:CD(SD)系ラットに binimetinib を 10，30 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，中枢神経系に対する影響を FOB 法及び自発運動量の測定により検討した．FOB（雌雄各 10 例／群）では，投与前，投与後 1 及び 24 時間における一般症状，行動，握力及び体温を観察又は測定した．自発運動量（雌雄各 5 例／群）では，投与後 1 時間から 30 分間の自発運動量を測定した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，binimetinib は最高投与量である 100 mg/kg までいずれの検査項目にも影響しなかった．ラットにおける binimetinib の中枢神経系に対する無影響量は 100 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.1.2 サルにおける体温に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-4］

カニクイザル（雄 6 例／群）に，binimetinib を 1，3 及び 10 mg/kg で単回経口投与し，テレメトリー法により覚醒下・非拘束下で binimetinib の体温に対する影響を検討した．投与前

から投与後 21 時間までの体温を経時的に測定した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．また，投与後 2 及び 24 時間後の血漿中 binimetinib 濃度を分析し，結果を表 2.6.2.4.1.2-1 に示した．

その結果，binimetinib は最高投与量である 10 mg/kg まで体温に影響しなかった．サルにおける binimetinib の体温に対する無影響量は 10 mg/kg と判断した．

表 2.6.2.4.1.2-1　サルにおける単回経口投与後の血漿中 binimetinib 濃度

投与量 (mg/kg)	血漿中 binimetinib 濃度（μg/mL）[a]	
	C2h	C24h
1	0.088	0.010
3	0.179	0.049
10	1.20	0.149

a：非 GLP 適用での TK 測定値（n=5 又は 6 の平均値）

2.6.2.4.2　心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1　Binimetinib の hERG チャネル電流に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-2］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3～4 標本／濃度）を用いて，binimetinib の hERG チャネル電流に対する影響を検討した．DMSO に溶解させた binimetinib を灌流液に添加し，0.3，1，3，10 及び 30 μmol/L の濃度で適用した．

その結果，binimetinib の hERG チャネル電流に対する阻害率は 10 及び 30 μmol/L の濃度でそれぞれ 8.0 及び 30.4%であり，その IC_{50} 値は 30 μmol/L（13.2 μg/mL）を超える濃度であった．

2.6.2.4.2.2　AR00426032 の hERG チャネル電流に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-3］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3～4 標本／濃度）を用いて，AR00426032 の hERG チャネル電流に対する影響を検討した．DMSO に溶解させた AR00426032 を灌流液に添加し，10 及び 30 μmol/L の濃度で適用した．

その結果，AR00426032 の hERG チャネル電流に対する阻害率は 10 及び 30 μmol/L の濃度でそれぞれ 3.4 及び 7.9%であり，30 μmol/L（12.8 μg/mL）まで hERG チャネル電流に対する明らかな阻害作用は認められなかった．

2.6.2.4.2.3 サルにおける心血管系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-4］

カニクイザル（雄 6 例／群）に，binimetinib を 1，3 及び 10 mg/kg で単回経口投与し，テレメトリー法により覚醒下・非拘束下で binimetinib の血圧，心拍数及び心電図に対する影響を検討した．血圧及び心電図を投与前から投与後 21 時間まで経時的に測定し，平均血圧及び心拍数については 5 分毎に，心電図（RR 間隔，QT 間隔及び QTc）については投与後 3 時間まで 15 分毎，投与後 3 時間以降は 3 時間毎に 30 秒間の平均値を評価した．また，心電図については，心電図波形の異常や不整脈の有無も評価した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．また，投与後 2 及び 24 時間の血漿中 binimetinib 濃度を分析し，結果を表 2.6.2.4.1.2-1 に示した．

その結果，binimetinib は最高投与量である 10 mg/kg まで血圧，心拍数及び心電図パラメータに影響せず，心電図の異常波形や不整脈も認められなかった．サルにおける binimetinib の心血管系に対する無影響量は 10 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.3 ラットにおける呼吸系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-5］

Crl:CD(SD)系ラット（雄 12 例／群）に，binimetinib を 10，30 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，binimetinib の呼吸系に対する影響を検討した．投与前から投与後 4 時間までの呼吸数，1 回換気量及び分時換気量をプレチスモグラフ法により経時的に測定し，投与後 1 及び 4 時間における血液ガス（pH，pCO_2，pO_2，HCO_3act，tCO_2，tHb，FO_2Hb，sO_2，FCOHb 及び FMetHb）を測定した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，binimetinib は最高投与量である 100 mg/kg までいずれの検査項目にも影響しなかった．ラットにおける binimetinib の呼吸系に対する無影響量は 100 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.4 補足的安全性薬理試験

2.6.2.4.4.1 胃腸管系に対する作用

1） ラットにおける胃液分泌に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-6］

Rj/Han(SD)系ラット（雄 10 例／群）に，binimetinib を 10，30 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，binimetinib の胃液分泌に対する影響を検討した．Binimetinib の投与後 45 分に胃幽門部を結紮し，結紮後 4 時間における胃液分泌量，pH 及び酸性度を測定した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，10 及び 30 mg/kg で胃液分泌量及び酸性度が低値，pH が高値を示したが，用量に応じた変化ではなく，100 mg/kg では胃液分泌量，pH 及び酸性度に対照群との差は認められなかった．したがって，ラットにおける binimetinib の胃液分泌に対する無影響量は 100 mg/kg と判断した．

2） ラットにおける消化管輸送能に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-7］

Crl:CD(SD)系ラット（雌雄各 10 例／群）に，binimetinib を 10，30 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，binimetinib の消化管輸送能に対する影響を検討した．Binimetinib の投与後 2 時間に炭末を経口投与し，炭末投与後 20 分における消化管内での炭末移動距離を測定した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，binimetinib は最高投与量である 100 mg/kg まで炭末移動距離に影響しなかった．ラットにおける binimetinib の消化管輸送能に対する無影響量は 100 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.4.2 ラットにおける腎／泌尿器系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-8］

Crl:CD(SD)系ラット（雌 10 例／群）に，binimetinib を 10，30 及び 100 mg/kg で単回経口投与し，binimetinib の腎／泌尿器系に対する影響を検討した．Binimetinib の投与前に，塩化ナトリウムを負荷する目的で生理食塩液を 15 mL/kg で経口投与した．投与後 6 時間に採尿及び採血を行い，血液生化学検査（血清電解質を含む）及び尿検査（尿量，尿中電解質，電解質分画クリアランス，比重及び pH）を実施した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，binimetinib は最高投与量である 100 mg/kg までいずれの腎機能パラメータにも影響しなかった．ラットにおける binimetinib の腎／泌尿器系に対する無影響量は 100 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.4.3 その他の補足的安全性薬理試験

1） マウスにおける背部皮膚の創傷治癒に及ぼす影響

［参考資料：4.2.1.3-9，4.2.1.3-10］

マウス創傷治癒モデル（CD-1 系マウス，雄 12 例／群（1 日 1 回投与群），雄 5 例／群（1 日 2 回投与群））に binimetinib を 3，10 及び 30 mg/kg で 1 日 1 回並びに 1 日 2 回，10 日間反復経口投与し，binimetinib の創傷治癒に及ぼす影響を検討した．初回投与日の投与前に，内径 12 mm のパンチを用いて，動物の背側皮膚に筋層に達する創傷を作製した．投与後 1，

3，5，7，9 及び 11 日に，背側皮膚の創傷部位の大きさを記録し，創傷閉鎖率及び創傷半閉鎖時間を算出した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，binimetinib はいずれの投与量においてもマウスの背側皮膚創傷の閉鎖率及び閉鎖時間に悪影響を及ぼさなかった．マウス創傷治癒モデルにおける binimetinib の無影響量は 30 mg/kg と判断した．

2） マウスにおける細菌感染時の予後に及ぼす影響

［参考資料：4.2.1.3-10］

細菌感染によるマウス敗血症モデル（CD-1 系マウス，雄 8 例／群）に binimetinib を 10，30 及び 100 mg/kg で 1 日 1 回 7 日間反復経口投与し，binimetinib の細菌感染時の予後に及ぼす影響を検討した．LD_{50} 相当量の黄色ブドウ球菌及びカンジダ菌をそれぞれ腹腔内及び静脈内投与によりマウスに接種し，生存率を指標に細菌感染時の予後に及ぼす影響を評価した．また，LPS 惹起によるマウス敗血症性ショックモデル（C57BL/6 系マウス，雄 8 例／群）に binimetinib を 3，10 及び 30 mg/kg で 1 日 1 回 3 日間反復経口投与し，binimetinib の LPS による敗血症性ショックに及ぼす影響を検討した．LD_{50} 相当量の LPS を静脈内投与し，死亡率を指標に敗血症性ショックに及ぼす影響を評価した．いずれの実験も投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%Tween 80 含有 1 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，黄色ブドウ球菌によるマウス敗血症モデルでは，binimetinib の 10，30 及び 100 mg/kg における生存率はそれぞれ 50，63 及び 38%であり，対照群（生存率：38%）と比較して明らかな生存率の低下は認められなかった．また，カンジダ菌による敗血症モデルでも，binimetinib の 10，30 及び 100 mg/kg における生存率はそれぞれ 50，63 及び 38%であり，対照群（生存率：50%）と比較して明らかな生存率の低下は認められなかった．

LPS 惹起によるマウス敗血症性ショックモデルでは，binimetinib の 3，10 及び 30 mg/kg における死亡率はそれぞれ 88，75 及び 63%であり，対照群（死亡率：88%）と比較して明らかな死亡率の変化は認められなかった．以上より，binimetinib は最高投与量である 100 あるいは 30 mg/kg までマウスの細菌感染時の予後及び LPS 惹起による敗血症性ショックを増悪させなかった．マウス敗血症モデル及び敗血症性ショックモデルにおける binimetinib の無影響量は，それぞれ 100 及び 30 mg/kg と判断した．

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった．

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける試験（Binimetinib 単剤）

Binimetinib は，不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化，並びに活性型 MEK1 による基質タンパク質 ERK のリン酸化をいずれも阻害し，活性型 MEK1 に対する阻害様式の検討より ATP との不競合的なアロステリック阻害剤であることが示された．また，binimetinib は MEK1 及び MEK2 以外の 200 種類以上のタンパク質キナーゼを阻害しなかった．以上より，binimetinib は，MEK の活性化と ERK のリン酸化をいずれも阻害することで MAP キナーゼ経路の活性化を抑制する，選択的な MEK 阻害剤であることが示された．

Binimetinib は，BRAF V600 変異（V600E，V600D 又は V600K）を有するヒト悪性黒色腫細胞株を用いた *in vitro* の検討において，細胞内 ERK のリン酸化を阻害し，細胞増殖を抑制した．*In vivo* では，BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株を移植したマウスにおいて，binimetinib は腫瘍中で ERK のリン酸化を阻害し，抗腫瘍効果を示した．同モデルにおいて，binimetinib は連日（30 mg/kg を 1 日 2 回）投与が抗腫瘍効果を示したのに対して，間歇的（各週の 1～3 日目に 300 mg/kg を 1 日 2 回）投与では抗腫瘍効果を示さなかった．したがって，binimetinib の抗腫瘍効果の発現には，持続的に MAP キナーゼ経路を遮断する投与方法が必要であると考えた．なお，binimetinib は腫瘍中で，MAP キナーゼ経路の活性化により誘導される DUSP6 の遺伝子発現を抑制し，アポトーシス関連分子 BMF の遺伝子発現を誘導した．これらの遺伝子発現の変動は，いずれも binimetinib の抗腫瘍効果に応じていた．したがって，binimetinib は MEK を阻害し，下流に位置する ERK のリン酸化を抑制することで MAP キナーゼ経路のシグナル伝達を遮断し，BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫細胞の増殖を抑制することが示された．

代謝物である AR00426032 は binimetinib と同程度の活性型 MEK1 阻害活性を示したが，ヒトでの曝露量が未変化体の約 8 分の 1 であることから binimetinib の抗腫瘍効果の発現に寄与しないと考えられた．

効力を裏付ける試験（Binimetinib 及び encorafenib 併用）

Binimetinib 及び encorafenib は，BRAF V600E 又は V600K 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株を用いた検討において，併用により顕著な増殖抑制作用を示した．したがって，binimetinib と encorafenib の併用は，MAP キナーゼ経路上の MEK と RAF を同時に阻害することにより，BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫細胞の増殖を低濃度から強力に抑制できることが示された．

Binimetinib と encorafenib の併用は，BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫由来細胞を用いた種々のマウス異種移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示した．このうち，HMEX1906 細

胞を移植した patient-derived xenograft モデルにおいて，binimetinib 及び encorafenib の単剤投与は短期的な効果を示したが，4 カ月間の評価期間内に腫瘍は再増殖した．これに対して両剤の併用投与は，一般状態及び体重に明らかな影響を及ぼすことなく強力に腫瘍を縮小させるとともに，腫瘍の再増殖を抑制し，生存を改善させた．本モデルでは RAF 阻害剤に対する獲得耐性出現の機序として，変異型 BRAF の過剰発現による MAP キナーゼ経路の再活性化が報告されている[11]．臨床においても RAF 阻害剤を単剤で使用した際に獲得耐性による効果の消失がみられ，その 70%以上で MAP キナーゼ経路が再活性化していると報告されている[12]．再活性化の機序として，変異型 BRAF の過剰発現の他に，受容体型チロシンキナーゼの活性化，NRAS の変異，CRAF の過剰発現，MEK1 及び MEK2 の変異などが明らかにされている[2) 3) 12)]．したがって，binimetinib と encorafenib の併用は，MAP キナーゼ経路上の MEK と RAF を同時に阻害することでシグナル伝達を効果的に遮断し，同経路の再活性化に基づく獲得耐性の出現を遅延させることが期待される．

副次的薬理作用

60 種類の GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素を用いた検討において，binimetinib が 10 μmol/L で 50%以上阻害又は活性化した分子標的はなかった．したがって，binimetinib は MEK 以外の分子標的に作用を示さないと考えられた．

安全性薬理試験

中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対する作用を評価した結果，binimetinib はラットにおいて最高投与量の 100 mg/kg（Cmax：16.6 μg/mL）まで中枢神経系及び呼吸系に対する影響を示さず，サルにおいて最高投与量の 10 mg/kg（C2h：1.20 μg/mL）まで体温及び心血管系に対する影響を示さなかった．Binimetinib の臨床用量（45 mg/person b.i.d.）における血漿中濃度（Cmax：0.805 μg/mL）は，ラットの中枢神経系及び呼吸系に対する無影響量と 21 倍，サルの心血管系に対する無影響量と 1.5 倍の安全域があった（表 2.6.2.6-1）．

Binimetinib は 10 μmol/L（4.41 μg/mL）以上で hERG チャネル電流を阻害したが，その IC_{50} 値は 30 μmol/L（13.2 μg/mL）を超える濃度であり，サルの心電図において最高投与量の 10 mg/kg（C2h：1.20 μg/mL）まで QTc の延長は認められなかった．臨床用量（45 mg/person b.i.d.）における binimetinib の血漿中濃度（Cmax：0.805 μg/mL，非結合型：0.0225 μg/mL）は，hERG チャネルに対する IC_{50} 値に対して 500 倍以上の乖離があった．また，binimetinib の代謝物である AR00426032 は 30 μmol/L（12.8 μg/mL）まで hERG チャネル電流に対する明らかな阻害作用を示さなかった．したがって，binimetinib 及び AR00426032 が臨床において hERG チャネル阻害を介した催不整脈作用を生じさせる可能性は低いと考えられた．

補足的安全性薬理試験として，胃腸管系及び腎／泌尿器系に対する作用を評価した．その結果，binimetinib は最高投与量である 100 mg/kg までラットの胃液分泌，消化管輸送能及び腎機能に対する影響を示さなかった．Binimetinib の臨床用量（45 mg/person b.i.d.）における血漿中濃度（Cmax：0.805 μg/mL）は，胃腸管系及び腎／泌尿器系に対する無影響量と 21 倍の安全域があった（表 2.6.2.6-1）．

その他，マウスを用いて創傷治癒及び細菌感染の予後に及ぼす影響を探索的に評価した．その結果，マウス創傷治癒モデルにおいて，binimetinib は最高投与量の 30 mg/kg まで背部皮膚創傷の閉鎖率や閉鎖時間に悪影響を及ぼさなかった．また，マウス敗血症モデル及び敗血症性ショックモデルにおいて，binimetinib は最高投与量の 100 あるいは 30 mg/kg まで細菌感染時の予後及び LPS 惹起による敗血症性ショックを増悪させなかった．したがって，binimetinib は術後における創傷の治癒過程や細菌感染時の予後を増悪させる可能性は低いと考えられた．

以上，binimetinib は中枢神経系，心血管系及び呼吸系に対して影響せず，また胃腸管系及び腎／泌尿器系に対しても影響しなかった．

以上の非臨床試験成績から，binimetinib は BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫に対する新たな治療薬になり得ると考えられた．

表 2.6.2.6-1　ラット及びサルの無影響量並びに臨床用量での血中 binimetinib 濃度の比較

動物種	試験項目	臨床用量	無影響量（mg/kg）	血漿中濃度（μg/mL）	動物／ヒト濃度比 [a]
ヒト	-	45 mg/person (b.i.d.)	-	0.805 [b]	-
ラット	中枢神経系，呼吸系，胃腸管系，腎／泌尿器系	-	100	16.6 [c]	21
サル	体温，心血管系		10	1.2 [d]	1.5

a：臨床用量における binimetinib の血漿中濃度（Cmax）に対する各安全性薬理試験の無影響量における血漿中濃度（Cmax あるいは C2h）の比
b：日本人がん患者に binimetinib を 45 mg/person で 1 日 2 回 28 日間反復経口投与したときの投与 15 日における Cmax（CMEK162X1101 試験）［2.7.2.2.2.2］
c：ラット 1 カ月間反復投与毒性試験の初回投与時（雄）における binimetinib の Cmax ［2.6.7.8A］
d：サル体温・心血管系試験における binimetinib の C2h（表 2.6.2.4.1.2-1）

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

1） Samatar AA, Poulikakos PI. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2014;13:928-42.

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

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

4） Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature. 2002;417:949-54.

5） Karoulia Z, Gavathiotis E, Poulikakos PI. New perspectives for targeting RAF kinase in human cancer. Nat Rev Cancer. 2017;17:676-91.

6） Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. Cell. 2004;116:855-67.

7） Copeland RA. Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis (second edition). 2000, Wiley, New York.

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

9） VanBrocklin MW, Verhaegen M, Soengas MS, Holmen SL. Mitogen-activated protein kinase inhibition induces translocation of Bmf to promote apoptosis in melanoma. Cancer Res. 2009;69:1985-94.

10） Lehár J, Krueger AS, Avery W, Heilbut AM, Johansen LM, Price ER, et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. Nat Biotechnol. 2009;27:659-66.

11） Das Thakur M, Salangsang F, Landman AS, Sellers WR, Pryer NK, Levesque MP, et al. Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. Nature. 2013;494:251-5.

12） Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. Cancer Discov. 2014;4:80-93.

2.6.3 薬理試験の概要表

小野薬品工業株式会社

目次

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary 3
2.6.3.1 Pharmacology: Overview 3
2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics: Overview of the data 7
2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics: Overview of the data 12
2.6.3.4 Safety Pharmacology: Overview of the data 13

2.6.3 Pharmacology Tabulated Summary

2.6.3.1 Pharmacology: Overview

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

AR00426032 (metabolite of binimetinib)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化に対する阻害活性	ヒト MEK1 及び MEK2	*In vitro*	Array BioPharma Inc.	162-Enz-3	4.2.1.1-1
活性型 MEK1 に対する阻害活性	ヒト MEK1	*In vitro*	Array BioPharma Inc.	162-Enz-1	4.2.1.1-2
活性型 MEK1 に対する阻害様式	ヒト MEK1	*In vitro*	Array BioPharma Inc.	162-Enz-1	4.2.1.1-2
MEK 以外のキナーゼに対する阻害活性	タンパク質キナーゼ及び脂質キナーゼ（218 種類）	*In vitro*	[redacted]	162-Enz-2	4.2.1.1-3
BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する ERK リン酸化阻害作用	ヒト悪性黒色腫細胞株（4 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-00952	4.2.1.1-4
BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用	ヒト悪性黒色腫細胞株（8 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-00952	4.2.1.1-4
AR00426032 の活性型 MEK1 に対する阻害活性	ヒト MEK1	*In vitro*	Array BioPharma Inc.	162-Enz-1	4.2.1.1-2
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-00953	4.2.1.1-5
ヒト大腸がん細胞株 HT-29 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用	細胞：ヒト大腸がん細胞株 HT-29 モデル：マウス皮下移植	経口	Array BioPharma Inc.	060304-800	4.2.1.1-6

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	[redacted]	A375-e330	4.2.1.1-7
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（連日投与と間歇的投与の比較）	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-00964	4.2.1.1-8
Primary Pharmacodynamics (Combination with encorafenib)					
ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用（併用）	ヒト悪性黒色腫細胞株（16 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50576	4.2.1.1-9
ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用，長期評価）	細胞：ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 モデル：マウス皮下移植	経口	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50693	4.2.1.1-10
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	Array BioPharma Inc.	060304-1513	4.2.1.1-11
ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）	細胞：ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 モデル：マウス皮下移植	経口	Array BioPharma Inc.	060304-1547	4.2.1.1-12

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (continued)

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Secondary Pharmacodynamics					
各種分子標的に対する作用	GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素（60 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-00279	4.2.1.2-1

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (continued)

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

AR00426032 (metabolite of binimetinib)

Type of Study	Test System[3)]	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Safety Pharmacology					
Central nervous system	Rat, Sprague-Dawley [1)]	PO	[redacted]	1140-012	4.2.1.3-1
	Monkey, Cynomolgus [1)]	PO	[redacted]	[redacted]00033	4.2.1.3-4
Cardiovascular function	HEK293 cells [1), 2)]	*In vitro*	[redacted]	[redacted]0726[redacted]	4.2.1.3-2
	HEK293 cells [2)] AR00426032 (metabolite)	*In vitro*	[redacted]	[redacted]0519[redacted]	4.2.1.3-3
	Monkey, Cynomolgus [1)]	PO	[redacted]	[redacted]00033	4.2.1.3-4
Respiratory function	Rat, Sprague-Dawley [1)]	PO	[redacted]	1140-011	4.2.1.3-5
Supplimental Safety Pharmacology					
Gastric secretion	Rat, Sprague-Dawley [1)]	PO	[redacted]	[redacted]30228	4.2.1.3-6
Gastrointestinal motility	Rat, Sprague-Dawley [1)]	PO	[redacted]	1140-013	4.2.1.3-7
Renal function	Rat, Sprague-Dawley [1)]	PO	[redacted]	1140-010	4.2.1.3-8
Wound healing	Mouse, CD-1	PO	[redacted]	1077057	4.2.1.3-9
Wound healing and Immune mudulation	Mouse, CD-1 & C57BL/6	PO	[redacted]	1105452	4.2.1.3-10

1) Study was conducted in accordance with Good Laboratory Practices.
2) Human embryonic kidney cell line
3) Studies were conducted using binimetinib unless specified otherwise.

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics: Overview of the data

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

AR00426032 (metabolite of binimetinib)

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Primary Pharmacodynamics					
不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化に対する阻害活性	ヒト MEK1 及び MEK2	*In vitro*	0.25 nmol/L～5 μ mol/L	Binimetinib は不活性型 MEK1 及び MEK2 の活性化を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 16 及び 46 nmol/L であった.	162-Enz-3
活性型 MEK1 に対する阻害活性	ヒト MEK1	*In vitro*	2 nmol/L～1 μ mol/L	Binimetinib は処置濃度に応じて活性型 MEK1 を阻害し，IC_{50} 値は 12.1 nmol/L であった.	162-Enz-1
活性型 MEK1 に対する阻害様式	ヒト MEK1	*In vitro*	0.05 nmol/L～1 μ mol/L	Binimetinib の阻害活性は ATP 濃度の上昇に依存して増強され，活性型 MEK1 に対する binimetinib の阻害様式は ATP との不競合的なアロステリック阻害であることが示された.	162-Enz-1
MEK 以外のキナーゼに対する阻害活性	タンパク質キナーゼ及び脂質キナーゼ（218 種類）	*In vitro*	1～10 μ mol/L	Binimetinib は，いずれのキナーゼに対しても 10 μ mol/L で 50%以上の阻害を示さなかった.	162-Enz-2
BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する ERK リン酸化阻害作用	ヒト悪性黒色腫細胞株（4 種類）	*In vitro*	0.13 nmol/L～10 μ mol/L	Binimetinib は，いずれの細胞株に対しても処置濃度に応じて ERK リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 7.6～125.8 nmol/L，最大阻害率は 73.0～97.3%であった.	RD-20[redacted]-00952

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用	ヒト悪性黒色腫細胞株（8 種類）	*In vitro*	0.13 nmol/L～10 μ mol/L	Binimetinib は，いずれの細胞株に対しても処置濃度に応じて細胞増殖を抑制し，IC_{50} 値は 34.1～9272.0 nmol/L，最大抑制率は 43.0～116.8%であった.	RD-20[redacted]-00952
AR00426032 の活性型 MEK1 に対する阻害活性	ヒト MEK1	*In vitro*	0.3 nmol/L～5 μ mol/L（AR00426032）	AR00426032 は処置濃度に応じて活性型 MEK1 を阻害し，IC_{50} 値は 7.1 nmol/L であった.	162-Enz-1
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	単回投与試験： 30，100，300 mg/kg（単回投与） 反復投与試験： 30，100 mg/kg（1 日 2 回 14 日間反復投与）又は 300 mg/kg（各週の 1～3 日目に 1 日 2 回 2 週間反復投与）	単回投与試験： Binimetinib は，すべての投与群で 1～12 時間後の腫瘍中 ERK リン酸化を 80%以上阻害し，DUSP6 の遺伝子発現を 70%以上抑制した．また，binimetinib は腫瘍中で BMF の遺伝子発現を誘導し，24 時間後も誘導作用が持続した. 反復投与試験： Binimetinib は，すべての投与群で 1～6 時間後の腫瘍中 ERK リン酸化を 50%以上阻害し，DUSP6 の遺伝子発現を 70%以上抑制した．また，binimetinib は腫瘍中で BMF の遺伝子発現を誘導し，24 時間後も誘導作用が持続した.	RD-20[redacted]-00953

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
ヒト大腸がん細胞株 HT-29 移植マウスにおける腫瘍中 ERK リン酸化阻害作用	細胞：ヒト大腸がん細胞株 HT-29 モデル：マウス皮下移植	経口	3，10，30 mg/kg（単回投与）	Binimetinib は 10 mg/kg 以上で腫瘍中 ERK リン酸化を投与 24 時間後まで持続的に 50%以上阻害した．	060304-800
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	1，3，10，30 mg/kg（1 日 2 回 21 日間反復投与）	Binimetinib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさなかった．Binimetinib は投与量に応じて腫瘍の増殖を抑制し，10 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた．投与開始 11 日後での腫瘍縮小率は，10 及び 30 mg/kg で，それぞれ 60 及び 93%であった．	A375-e330
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（連日投与と間歇的投与の比較）	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	30，100 mg/kg（1 日 2 回 14 日間反復投与）又は 300 mg/kg（各週の 1～3 日目に 1 日 2 回 2 週間反復投与）	Binimetinib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさなかった．Binimetinib は 30 及び 100 mg/kg で腫瘍の増殖を抑制し，投与開始 14 日後の腫瘍縮小率は，それぞれ 11 及び 20%であった．一方，binimetinib を 300 mg/kg で間歇的に投与した場合，明らかな抗腫瘍効果は認められなかった．	RD-20[redacted]-00964

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Primary Pharmacodynamics (Combination with encorafenib)					
ヒト悪性黒色腫細胞株に対する増殖抑制作用（併用）	ヒト悪性黒色腫細胞株（16 種類）	*In vitro*	binimetinib：0.037～2.7 μmol/L encorafenib：0.037～2.7 μmol/L	Binimetinib と encorafenib の併用効果は，検討したすべての細胞株で確認された．顕著な併用効果を示したのは，BRAF V600E 変異を有する 12 細胞株中では 9 株，野生型 BRAF を有する 4 細胞株中では 2 株であった．	RD-20[redacted]-50576
ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用，長期評価）	細胞：ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 モデル：マウス皮下移植	経口	binimetinib 単剤（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）， encorafenib 単剤（3 mg/kg，1 日 2 回）， binimetinib（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（3 mg/kg，1 日 2 回）の併用（最長 117 日間反復投与）	Binimetinib 及び encorafenib は，単剤あるいは併用投与により一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさなかった． Binimetinib 及び encorafenib は，それぞれ単剤で腫瘍を縮小させたが，その効果を長期に持続することができず，腫瘍の再増殖がみられた．一方，binimetinib（3 及び 10 mg/kg）と encorafenib（3 mg/kg）の併用は，持続的な腫瘍縮小効果を示し，評価最終日までほぼ全例で腫瘍の再増殖はみられなかった．生存曲線の解析では，binimetinib（10 mg/kg）と encorafenib（3 mg/kg）の併用群は各単剤群との間に有意差がみられた（$p<0.05$，log-rank 検定）．	RD-20[redacted]-50693

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）	細胞：ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 モデル：マウス皮下移植	経口	binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）の併用（14 日間反復投与）	すべての群で一般状態及び体重推移に明らかな影響はみられなかった． Binimetinib 単剤投与での TGI は 40.2%であった．Encorafenib は投与量に応じて腫瘍増殖を抑制し，6，20 及び 60 mg/kg での TGI は，それぞれ 8.3，77.5 及び 90.0%であった．Binimetinib に encorafenib を 6，20 及び 60 mg/kg で併用した時の TGI は，それぞれ 78.2，89.9 及び 90.0%であった．	060304-1513
ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）	細胞：ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 モデル：マウス皮下移植	経口	binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib（3.5 mg/kg，1 日 2 回）と encorafenib（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回）の併用（14 日間反復投与）	すべての群で一般状態及び体重推移に明らかな影響はみられなかった． Binimetinib 単剤投与時の TGI は 31%であった．Encorafenib は投与量に応じて腫瘍増殖を抑制し，6，20 及び 60 mg/kg での TGI は，それぞれ-4，48 及び 44%であった．Binimetinib に encorafenib を 6，20 及び 60 mg/kg で併用した時の TGI は，それぞれ 52，71 及び 63%であった．	060304-1547

2.6.3.3 Secondary Pharmacodynamics: Overview of the data

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
各種分子標的に対する作用	GPCR，トランスポーター，イオンチャネル，核内受容体及び酵素（60 種類）	*In vitro*	0.1 nmol/L～30 μ mol/L	Binimetinib は，いずれの分子標的に対しても 10 μ mol/L で 50%以上の阻害又は活性化を示さなかった.	RD-20[redacted]-00279

2.6.3.4 Safety Pharmacology: Overview of the data

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

AR00426032 (metabolite of binimetinib)

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses [1), 2)] (mg/kg)	Number of Animals per Group (M/F)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Safety Pharmacology							
Central nervous system	Rat, Sprague-Dawley	PO	0, 10, 30 or 100	FOB: 10/10 Locomotor activity: 5/5	·No significant effect up to 100 mg/kg ·NOEL = 100 mg/kg	GLP	1140-012
	Monkey, Cynomolgus	PO	0, 1, 3 or 10	6M	·No significant effects noted in body temperature ·NOEL = 10 mg/kg	GLP	[redacted]00033
Cardiovascular function	HEK293 cells	*In vitro*	Up to 30 μ M	NA	·hERG channel inhibitions at 10 and 30 μ M were 8.0 and 30.4%, respectively. ·IC50 >30 μ M	GLP	[redacted]0726[redacted]
	HEK293 cells	*In vitro*	Up to 30 μ M (AR00426032)	NA	·hERG channel inhibition at 10 and 30 μ M were 3.4 and 7.9%, respectively. ·IC50 >30μM	Non-GLP	[redacted]0519.[redacted]
	Monkey, Cynomolgus	PO	0, 1, 3 or 10	6M	·No significant effects noted in MABP, HR or ECG waveform QT or QTc data ·NOEL = 10 mg/kg	GLP	[redacted]00033
Respiratory function	Rat, Sprague-Dawley	PO	0, 10, 30 or 100	12M	·No significant effects noted in pulmonary endopoint (respiratory rate, tidal volume, minute volume) and blood gas up to 100 mg/kg ·NOEL =100 mg/kg	GLP	1140-011

NA: Not Applicable, FOB: Functional observation battery, HEK: Human embryonic kidney cell line, MABP: Mean arterial blood pressure, HR: Heart rate, ECG: Electro cardiogram, 1) Single dose unless specified otherwise, 2) Studies were conducted using binimertinib unless specified otherwise. And all dose levels refer to active compound and all doses are in units of mg/kg unless otherwise specified.

2.6.3.4 Safety Pharmacology: Overview of the data (continued)

Test Article: Binimetinib; Array BioPharma internal code names: ARRY-215311, ARRY-438162 (MEK162)

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses [1), 2)] (mg/kg)	Number of Animals per Group (M/F)	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Supplimental Safety Pharmacology							
Gastric secretion	Rat, Sprague-Dawley	PO	0, 10, 30 or 100	10M	·Slight decreases in gastric acid secretion and gastric volume at 10 and 30 mg/kg ·No significant effects at 100 mg/kg ·NOEL = 100 mg/kg	GLP	[redacted]30228
Gastrointestinal motility	Rat, Sprague-Dawley	PO	0, 10, 30 or 100	10/10	·No significant effect up to 100 mg/kg ·NOEL = 100 mg/kg	GLP	1140-013
Renal function	Rat, Sprague-Dawley	PO	0, 10, 30 or 100	10F	·No significant effect up to 100 mg/kg ·NOEL = 100 mg/kg	GLP	1140-010
Wound healing	Mouse/CD-1	PO	0, 3, 10 or 30 (BID for 10 days)	12M	No adverse effects on wound healing	Non-GLP	1077057
	Mouse/CD-1	PO	0, 3, 10 or 30 (QD for 10 days)	12M	No adverse effects on wound healing	Non-GLP	1105452
Immune modulation	LPS challenge: Mouse/ C57BL/6	PO	LPS Challenge: 0, 3, 10 or 30 (QD for 3 days)	8M	No adverse effect on survival.	Non-GLP	1105452
	S. aureus or *C.albicans* Challenge: Mouse/CD-1		*S. aureus* or *C.albicans* Challenge: 0, 10 , 30 or 100 (QD for 7 days)	8M	No adverse effect on survival.		

1) Single dose unless specified otherwise
2) Study was conducted using binimetinib and all dose levels refer to active compound. All doses are in units of mg/kg unless otherwise specified.