# 2.4 非臨床試験の概括評価

小野薬品工業株式会社

**目次**

用語及び略号一覧 3
2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 6
2.4.2 薬理試験 7
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 7
2.4.2.2 副次的薬理試験 9
2.4.2.3 安全性薬理試験 9
2.4.3 薬物動態試験 10
2.4.3.1 吸収 10
2.4.3.2 分布 10
2.4.3.3 代謝 10
2.4.3.4 排泄 12
2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用 13
2.4.3.6 Encorafenib と binimetinib の併用 13
2.4.4 毒性試験 14
2.4.4.1 単回投与毒性試験 14
2.4.4.2 反復投与毒性試験 14
2.4.4.3 遺伝毒性試験 15
2.4.4.4 がん原性試験 15
2.4.4.5 生殖発生毒性試験 15
2.4.4.6 局所刺激性試験 15
2.4.4.7 その他の毒性試験 16
2.4.5 総括及び結論 16
2.4.6 参考文献一覧 20

**用語及び略号一覧**

| 用語及び略号 | 内容又は日本語名称 |
|---|---|
| $^{14}$C-encorafenib | $^{14}$C 標識 encorafenib |
| ARAF | A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase |
| ATP | アデノシン三リン酸 |
| AUC | 血漿中濃度–時間曲線下面積 |
| AUCinf | 投与後無限大時間までの AUC |
| BA | 生物学的利用率 |
| BCRP | Breast cancer resistance protein |
| Binimetinib | ビニメチニブ |
| BRAF | B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase |
| CL | クリアランス |
| Cmax | 最高血漿中濃度 |
| CRAF | Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase |
| CYP | シトクロム P450 |
| DUSP6 | Dual specificity phosphatase 6 |
| $EC_{50}$ | 50%有効濃度 |
| Emax | 最大効果 |
| Encorafenib | エンコラフェニブ |
| ERK | 細胞外シグナル制御キナーゼ |
| 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 |
| HEK | ヒト胎児由来腎臓細胞 |
| 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 |
| KDR | Kinase insert domain receptor |
| $K_I$ | 最大不活性化速度の 1/2 の不活性化をもたらす濃度 |
| $k_{inact}$ | 最大不活性化速度定数 |
| LC/MS/MS | 液体クロマトグラフィー／タンデムマススペクトロメトリー |
| LSC | 液体シンチレーションカウンター |
| MEK | 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ |
| mRNA | メッセンジャーリボ核酸 |
| NRAS | NRAS proto-oncogene, GTPase |
| OAT | Organic anion transporter |
| OATP | Organic anion transporting polypeptide |
| OCT | Organic cation transporter |
| PDE | ホスフォジエステラーゼ |
| P-gp | P-糖蛋白質 |
| PIF | 光毒性係数 |
| PXR | Pregnane X receptor |
| QWBA | 定量的全身オートラジオグラフィー |
| radio-HPLC | 放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー |
| Rb | 血液／血漿中濃度比 |
| SPRY4 | Protein sprouty homolog 4 |
| T1/2 | 消失半減期 |
| Tmax | 最高血漿中濃度到達時間又は最高組織中濃度到達時間 |
| UGT | ウリジン-5'-二リン酸-グルクロン酸転移酵素 |

| 用語及び略号 | 内容又は日本語名称 |
|---|---|
| Vss | 定常状態での分布容積 |

## 2.4 非臨床試験の概括評価

RAS/RAF/MEK/ERK（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，その 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 は，悪性黒色腫の約 60%，甲状腺がんの 30～50%，結腸直腸がんの 5～20%，卵巣がんの約 30%の患者で遺伝子変異が認められる[2) 4) 5)]．特に頻度が高い変異は，BRAF のキナーゼドメイン内に存在する 600 番目のバリン（V600）のグルタミン酸，アスパラギン酸又はリジンへの置換（V600E，V600D 又は V600K）である[2) 5)]．これらの変異型 BRAF は野生型と比較して極めて高いキナーゼ活性を持ち，RAS の活性化の有無にかかわらず 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)]．したがって，RAF 阻害剤は BRAF V600 変異を有するがん細胞の増殖シグナルである MAP キナーゼ経路の活性化を抑制することで，抗腫瘍効果を発揮することが期待できる．

既に，RAF 阻害剤のベムラフェニブ及びダブラフェニブが BRAF 遺伝子変異を有する根治切除不能な悪性黒色腫を対象に上市されている．RAF 阻害剤は悪性黒色腫に対して高い臨床効果を発揮するものの，獲得耐性の出現による病勢の再燃が長期の治療継続を困難にしている[2) 3) 7)]．RAF 阻害剤に耐性を獲得した患者の 70%以上で MAP キナーゼ経路の再活性化が認められ，その機序として，受容体型チロシンキナーゼの活性化，NRAS の変異，変異型 BRAF の過剰発現，CRAF の過剰発現，MEK1 及び MEK2 の変異などが報告されている[2) 3) 7)]．したがって，RAF 阻害剤は MEK 阻害剤と併用することで MAP キナーゼ経路のシグナル伝達を効果的に遮断し，悪性黒色腫細胞の増殖を強力に抑制するとともに，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できる．また，RAF 阻害剤の副作用である増殖性皮膚病変の発現頻度は MEK 阻害剤の併用により低下するとの臨床報告もある[8) 9) 10)]．RAF 阻害剤によるパラドキシカルな MAP キナーゼ経路の活性化が皮膚の過形成性変化を誘発する[11) 12) 13)]ことから，RAF の下流に位置する MEK に対する阻害剤の併用により増殖性皮膚病変を軽減できると考えられる．

Encorafenib はヒト変異型 BRAF（V600E）のキナーゼ活性を阻害し，BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞において MEK 及び ERK のリン酸化を阻害することで増殖抑制作用を示した．また，BRAF V600 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

デルにおいて抗腫瘍効果を示した．更に，MEK 阻害剤である binimetinib との併用により，単剤よりも強力で持続的な抗腫瘍効果を示した．

以上より，RAF 阻害剤である encorafenib と MEK 阻害剤である binimetinib の併用は，副作用の軽減が期待されるとともに，BRAF 遺伝子変異を有する悪性黒色腫に対して高い治療効果を示す新たな薬物療法になると考えた．

### 2.4.1 非臨床試験計画概略

Encorafenib の非臨床試験は「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドラインについて」（薬食審査発 0604 第 1 号，平成 22 年 6 月 4 日）（以下，ICH S9 ガイドライン）に基づいて実施した．

薬理試験

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

Encorafenib の効力を裏付ける試験として，*in vitro* 試験では，ヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）に対する阻害活性，BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞に対する MEK 及び ERK リン酸化阻害作用，並びに増殖抑制作用を検討した．*In vivo* 試験では，BRAF 変異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ける抗腫瘍効果を検討した．

Encorafenib と binimetinib の併用の効力を裏付ける試験として，*in vitro* 試験では，BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞に対する増殖抑制作用を検討した．*In vivo* 試験では，BRAF 変異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ける抗腫瘍効果を検討した．

副次的薬理試験として，encorafenib の各種 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する作用を検討した．

安全性薬理試験として，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，*in vitro* で encorafenib 及びヒト血漿中の主な代謝物である LHY746 の hERG チャネル電流に対する作用を評価した．ラットを用いた心血管系に対する作用の評価を除き，*in vivo* のコアバッテリー試験は GLP に準拠して実施した．

薬物動態試験

薬物動態試験では，*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験で encorafenib 又は $^{14}$C-encorafenib の薬物動態を評価した．*In vivo* 試験では，有効性薬理試験及び毒性試験と同種のマウス（BALB/c

系），ラット（Wistar 系及び Wistar Hannover 系）及びサル（カニクイザル）を用いて，静脈内投与で評価した一部の試験を除き，臨床投与経路である経口投与で評価した．

生体試料中放射能濃度の分析には LSC，試料中放射能の組成分析には radio-HPLC，組織分布試験の分析には QWBA，血漿中 encorafenib 濃度の分析には LC/MS/MS を用いた．

毒性試験

毒性試験では，単回投与毒性試験，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験及びその他の毒性試験で encorafenib の安全性を評価した．主な毒性試験の投与経路は，局所刺激性試験での経皮投与を除き，臨床投与経路である経口投与とした．単回及び反復投与毒性試験では，げっ歯類はラット，非げっ歯類は *in vivo* 代謝物プロファイルがヒトと類似しているサルを用いた．単回投与毒性試験，生殖発生毒性試験の一部及びその他の毒性試験の一部を除き，反復投与毒性試験，遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験，局所刺激性試験及びその他の毒性試験は，GLP に準拠して実施した．

## 2.4.2 薬理試験

### 2.4.2.1 効力を裏付ける試験

#### 2.4.2.1.1 *In vitro* 試験

Encorafenib はヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）の活性を阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 0.35，0.47 及び 0.30 nmol/L であった［2.6.2.2.1.1］．Encorafenib は RAF 以外に STK36 を 10 nmol/L で 87%阻害したが，それ以外の 438 種類のタンパク質キナーゼ及び脂質キナーゼを阻害しなかった［2.6.2.2.1.2］．Encorafenib は BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 において MEK 及び ERK のリン酸化を阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 2.4 及び 3 nmol/L であった［2.6.2.2.1.3，2.6.2.2.1.4］．なお，MEK リン酸化阻害活性は encorafenib 除去後少なくとも 3 時間持続した［2.6.2.2.1.3］．また，encorafenib は A375 の細胞増殖を抑制し，$IC_{50}$ 値は 4 nmol/L であった［2.6.2.2.1.5］．Encorafenib は BRAF V600E，V600D 又は V600K 変異を有する種々のがん細胞株の増殖を高率に抑制したが，野生型 BRAF を有するがん細胞株の増殖を抑制しなかった［2.6.2.2.1.6］．以上より，encorafenib は RAF の活性を阻害することにより MAP キナーゼ経路の活性化を抑制し，BRAF V600E，V600D 又は V600K 変異を有するがん細胞の増殖を選択的に抑制することが示された．

LHY746 はヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）の活性を阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 9.3，15.5 及び 9.1 nmol/L であった［2.6.2.2.1.7］．LHY746 は BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M の増殖を抑制したが，encorafenib と比較して $IC_{50}$ 値が 30 倍以上大きく［2.6.2.2.1.8］，またヒトでの曝露量が encorafenib と同程度

であることから［2.7.2.2.1.1］，encorafenib の抗腫瘍効果の発現にはほとんど寄与しないと考えられた.

#### 2.4.2.1.2 *In vivo* 試験

Encorafenib は，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いて，6 mg/kg で腫瘍中 MEK 及び ERK リン酸化を単回経口投与 6 時間後に 70%以上，24 時間後に 50%以上阻害した［2.6.2.2.2.1］．また，MAP キナーゼ経路の活性化により誘導される DUSP6 及び SPRY4 の遺伝子発現を抑制した［2.6.2.2.2.1］．Encorafenib 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，一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼすことなく抗腫瘍効果を示した［2.6.2.2.2.2，2.6.2.2.2.3，2.6.2.2.2.4］．このうち，Malme-3M 細胞移植マウスを用いた検討では，encorafenib は 3 mg/kg の 1 日 1 回反復経口投与により抗腫瘍効果を示した［2.6.2.2.2.4］．以上より，encorafenib は BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞の MAP キナーゼ経路を抑制することで抗腫瘍効果を発現することが示された.

#### 2.4.2.1.3 *In vitro* 試験（併用）

Encorafenib 及び binimetinib は，BRAF V600E 又は V600K 変異を有する種々の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［2.6.2.2.3.1］．したがって，encorafenib と binimetinib の併用は，MAP キナーゼ経路上の RAF と MEK を同時に阻害することにより，BRAF V600E 又は V600K 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞の増殖を強力に抑制することが示された.

#### 2.4.2.1.4 *In vivo* 試験（併用）

Encorafenib 及び 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，併用により単剤よりも強い抗腫瘍効果を示した［2.6.2.2.4.1, 2.6.2.2.4.2，2.6.2.2.4.3］．特に，長期的な抗腫瘍効果を評価したモデルにおいて，encorafenib 及び binimetinib の単剤投与は短期的な効果を示したが，獲得耐性の出現により腫瘍は再増殖した［2.6.2.2.4.1］．これに対して両剤の併用投与は，一般状態及び体重推移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，獲得耐性の出現による腫瘍の再増殖を抑制し，生存を改善させた［2.6.2.2.4.1］．なお，併用時にそれぞれの単剤では認められない肝臓への影響（小葉辺縁部への炎症細胞浸潤）が認められたが，本変化は肝細胞壊死等の傷害性変化や血液学的検査値の変動を伴わないことから重篤な毒性を示唆する

ものではないと判断した［2.6.2.2.4.1，2.6.6.8.5］．以上より，encorafenib と binimetinib の併用は MAP キナーゼ経路の再活性化に基づく獲得耐性の出現を抑制することが示された.

### 2.4.2.2　副次的薬理試験

143 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，encorafenib が 10 μmol/L で 50%以上阻害したのは PDE4D のみであり，$IC_{50}$ 値は 4.4 μmol/L であった［2.6.2.3.1］．また，56 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，LHY746 が 10 μmol/L で 50%以上阻害又は活性化したのは，キナーゼ KDR，PDE4D 及び核内受容体 PXR のみであった［2.6.2.3.2］．LHY746 の KDR 及び PDE4D に対する $IC_{50}$ 値はそれぞれ 1.8 及び 4.2 μmol/L，PXR に対する $EC_{50}$ 値は 3.8 μmol/L であった［2.6.2.3.2］．Enocorafenib 及び LHY746 の各種分子標的に対する作用は，$IC_{50}$ 値又は $EC_{50}$ 値の比較で，enocorafenib の RAF 阻害活性とは 1000 倍以上乖離していた.

### 2.4.2.3　安全性薬理試験

安全性薬理試験として，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，*in vitro* で encorafenib 及び LHY746 の hERG チャネル電流に対する作用を評価した.

Encorafenib の 50 mg/kg 以上で，サルの安静時（夜間）の心拍数が高値を示したが，活動期（日中）と同程度の値であり，血圧変動を伴わない生理的変動の範囲内の軽度な変化であった［2.6.2.4.2.3］．ラットにおいても血圧変動を伴わない心拍数の高値が 60 mg/kg で認められた．Encorafenib 及び LHY746 は 10 μmol/L 以上で hERG チャネル電流を阻害したが，その $IC_{50}$ 値はそれぞれ 73.4 及び 69.0 μmol/L（39.64 及び 29.32 μg/mL）であり［2.6.2.4.2.1，2.6.2.4.2.2］，サルの心電図においても encorafenib は最高投与量の 200 mg/kg まで QTc を延長させなかった［2.6.2.4.2.3］．Encorafenib のサル及びラットにおける心血管系に対する無影響量はそれぞれ 50 mg/kg 未満及び 6 mg/kg であった［2.6.2.4.2.3，2.6.2.4.2.4］.

また，encorafenib はラット又はサルにおいて中枢神経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，サルにおける体温に対する無影響量は 200 mg/kg であった.

## 2.4.3 薬物動態試験

### 2.4.3.1 吸収

マウス，ラット及びサルに encorafenib 又は $^{14}$C-encorafenib を単回経口投与したとき，BA はそれぞれ 42.6，42 及び 22%であった．T1/2 はマウス，ラット及びサルでそれぞれ 1.42，2.37～7.6 及び 1.4 時間であった．マウス，ラット及びサルに encorafenib 又は $^{14}$C-encorafenib を単回静脈内投与したとき，CL はそれぞれ 4.34，1.42 及び 20.0 mL/min/kg，Vss はそれぞれ 0.10，0.31 及び 1.0 L/kg であった［2.6.4.3.1］．ラット及びサルに encorafenib を反復経口投与したとき，encorafenib の血漿中曝露量は概ね投与量に比例して増加し，蓄積性は認められなかった［2.6.4.3.2］．

Encorafenib は P-gp の基質であったものの，Caco-2 細胞における encorafenib の頂端膜側から基底膜側への透過係数が P-gp 阻害剤存在下で $67.4\times10^{-5}$～$76.0\times10^{-5}$ cm/min であり，膜透過性の高いプロプラノロール（$79.2\times10^{-5}$ cm/min）と同程度であることから，受動的膜透過性が高いことが示された［2.6.4.7.1］．

### 2.4.3.2 分布

有色ラットに $^{14}$C-encorafenib を単回経口投与したとき，放射能は組織に広く分布し，放射能濃度の Tmax はほとんどの組織で 0.25～2 時間であった．脳及び脊髄への移行性は低かった．また，放射能はメラニン含有組織に残留しなかった［2.6.4.4.1］．

Encorafenib の血漿蛋白結合率はマウス，ラット，サル及びヒトでそれぞれ 98.6，98.1，74.6 及び 86.1%であった［2.6.4.4.2］．また，Rb はラット，サル及びヒトでそれぞれ 0.61，0.76 及び 0.75 であった［2.6.4.4.3］．

LHY746 の血漿蛋白結合率はラット，サル及びヒトでそれぞれ 95.8～97.1，89.6～89.7 及び 88.6~89.4%であった［2.6.4.8.1.1］．

### 2.4.3.3 代謝

Encorafenib の推定代謝経路を図 2.4.3.3-1 に示した．Encorafenib は水酸化，*N*-脱アルキル化及び*N*-脱アルキル化後のグルクロン酸抱合を含む複数の代謝経路で代謝され，推定代謝経路は動物種間で類似していた．

ラット，サル及びヒトの肝細胞と $^{14}$C-encorafenib をインキュベーションしたときの主な代謝物は，ラットで *N*-脱アルキル化体（M32.7 及び M23.8），サルで *N*-脱アルキル化体（M32.7，M23.8 及び LHY746）並びに水酸化体（M36.5）であった．ヒトでは M32.7 のグルクロン酸抱合体である M17.3 が最も多く，*N*-脱アルキル化体（LHY746，M32.7 及び M23.8）並びに水酸化体（M42.5B，M46.3 及び M36.5）も検出された．他の動物種と比較してヒトで

は未変化体及び代謝物のグルクロン酸抱合体が多く検出された．M46.3，グルクロン酸抱合体（M35 及び M39.4），代謝物のグルクロン酸抱合体（M12.8，M31A，M33.8 及び M38），グルコース抱合体（M31.8）及び代謝物のグルコース抱合体（M19.6）はヒト肝細胞でのみ検出された［2.6.4.5.1.1］．

ラットに $^{14}$C-encorafenib を経口投与したとき，血漿中には主に未変化体が存在し，血漿中総放射能の 85%であった．ラット血漿中の主な代謝物は *N*-脱アルキル化体（M23.8，M32.7 及び LHY746）であり，いずれも血漿中総放射能の 3.8%以下であった［2.6.4.5.2.1］．サルに $^{14}$C-encorafenib を経口投与したとき，未変化体は血漿中総放射能の 10%であり，血漿中の主な代謝物は M22.5A 及び *N*-脱アルキル化体（M23.8，M32.7 及び LHY746）であった．血漿中総放射能に占める M22.5A，M23.8，M32.7 及び LHY746 の割合はそれぞれ 42，12，6.1 及び 4.9%であった．［2.6.4.5.2.2］．未変化体から M22.5A への代謝には *in vitro* で推定された代謝経路（*N*-脱アルキル化，水酸化，加水分解及び酸化的脱アミノ化）が複合的に関与していると考えられた．

$^{14}$C-encorafenib を経口投与したとき，LHY746 はヒト血漿中総放射能の 15.5%を占めたが［2.7.2.2.1.2］，ラット及びサルではそれぞれ 1.9 及び 4.9%であった．

Encorafenib は主に CYP3A4，CYP2C19 及び CYP2D6 により代謝され，ヒト肝ミクロソームにおける encorafenib の代謝への寄与率はそれぞれ 83.3，16.0 及び 0.71%と推定された［2.6.4.5.3.1］．LHY746 は主に CYP2C19，CYP2C9 及び CYP3A4 により代謝され，ヒト肝ミクロソームにおける LHY746 の代謝への寄与率はそれぞれ 70.1，20.8 及び 9.1%と推定された［2.6.4.8.1.2］．

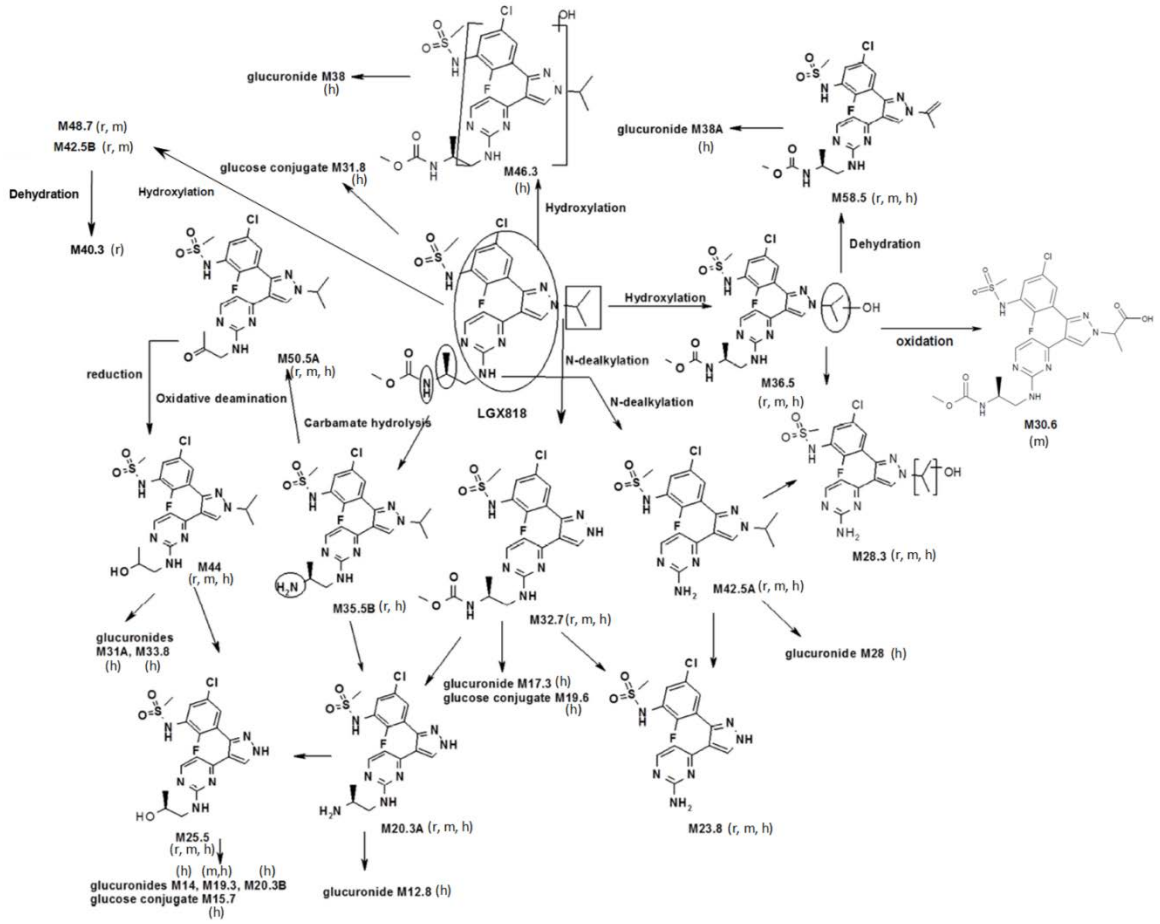



**図 2.4.3.3-1　Encorafenib の主な推定代謝経路（*in vivo*）**
LGX818：encorafenib，M42.5A：LHY746
r：ラット，m：サル，h：ヒト

### 2.4.3.4　　排泄

ラットに $^{14}$C-encorafenib を経口投与したとき，尿及び糞中に投与放射能量の 12.2 及び 85.1%が排泄され，未変化体排泄率はそれぞれ 0.05 及び 45.7%であった．ラットに $^{14}$C-encorafenib を静脈内投与したとき，尿及び糞中に投与放射能量の 24.3 及び 74.1%が排泄され，未変化体排泄率はそれぞれ 0.20 及び 9.96%であった．いずれの投与経路でも尿中の主な代謝物は M23.8，糞中の主な代謝物は M32.7 であった．尿及び糞中の *N*-脱アルキル化体（M23.8 及び M32.7）の総和が投与放射能量に占める割合は経口投与時が 35.1%，静脈内投与時が 61.3%であった［2.6.4.6.1.1］．胆管カニューレ処置したラットに $^{14}$C-encorafenib を経口及び静脈内投与したとき，胆汁中に投与放射能量の 28.2 及び 41.5%が排泄され，未変化体排泄率はそれぞれ 0.87 及び 1.33%であった［2.6.4.6.2］．胆汁中の主な代謝物は M23.8 及び M32.7 であった［2.6.4.5.2.1］．

サルに $^{14}$C-encorafenib を経口投与したとき，尿及び糞中に投与放射能量の 17.4 及び 59.7%が排泄され，未変化体排泄率はそれぞれ 0.16 及び 6.03%であった．サルに $^{14}$C-encorafenib を

静脈内投与したとき，尿及び糞中に投与放射能量の 14.4 及び 68.2%が排泄され，未変化体排泄率はそれぞれ 0.08 及び 2.43%であった．いずれの投与経路でも，尿中の主な代謝物は *N*-脱アルキル化体（M23.8 及び M32.7）並びに水酸化と *N*-脱アルキル化の両方を受けた代謝物（M28.3），糞中の主な代謝物は水酸化体（M36.5），*N*-脱アルキル化体（M32.7）及び M36.5 の酸化体（M30.6）であった．尿及び糞中の 5 種の主な代謝物（M23.8，M32.7，M28.3，M36.5 及び M30.6）の総和が投与放射能量に占める割合は経口投与時が 44.3%，静脈内投与時が 50.1%であった［2.6.4.6.1.2］．

### 2.4.3.5 薬物動態学的薬物相互作用

ヒト肝ミクロソームにおいて，encorafenib は CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A を可逆的に阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 22，1，20～30，5，50，25 及び 8～15 μmol/L であった．また，encorafenib は CYP3A を時間依存的に阻害し，$K_I$ 値は 20.5 μmol/L，$k_{inact}$ 値は 0.0527 $min^{-1}$ であった［2.6.4.5.5］．ヒト肝ミクロソームにおいて，encorafenib は UGT1A1 を阻害し，$IC_{50}$ 値は 1～7 μmol/L であった［2.6.4.5.6］．Encorafenib は PXR のアゴニストであり，ヒト肝細胞において CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9 及び CYP3A4 を誘導した．CYP3A4 mRNA の発現誘導に対する $EC_{50}$ 値は 10.2 μmol/L，Emax 値は 169 倍であった［2.6.4.5.7］．Encorafenib は BCRP，OCT1，OATP1B1，OATP1B3，OCT2，OAT1 及び OAT3 を阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 10～25，12.7，5.35，6.16，2.05，4.20 及び 0.92 μmol/L であった［2.6.4.7.2］．

ヒト肝ミクロソームにおいて，LHY746 は CYP2C8 及び CYP2C9 を阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 9.5 及び 8.3 μmol/L であった［2.6.4.8.1.3］．LHY746 は P-gp，BCRP，OATP1B1，OCT2 及び OAT3 を阻害し，$IC_{50}$ 値はそれぞれ 69.4，22.6，46.6，66.3 及び 9.44 μmol/L であった［2.6.4.8.1.4］．

### 2.4.3.6 Encorafenib と binimetinib の併用

Binimetinib は *in vitro* で encorafenib の主代謝酵素である CYP3A4 を誘導した．しかし，臨床において binimetinib は encorafenib の血漿中曝露量に大きな影響を及ぼさなかった［2.7.2.2.3.2］

Encorafenib は *in vitro* で binimetinib の主代謝酵素である UGT1A1 を阻害した［2.6.4.5.6］．また，encorafenib は *in vitro* で binimetinib の輸送に関与する BCRP を阻害した［2.6.4.7.2］．しかし，臨床において encorafenib は binimetinib の血漿中曝露量に大きな影響を及ぼさなかった［2.7.2.2.3.2］．

### 2.4.4 毒性試験

#### 2.4.4.1 単回投与毒性試験

げっ歯類については単回投与毒性試験を実施しなかったため，ラットを用いた 2 日間反復経口投与による小核試験の結果に基づき急性毒性を評価した．また，非げっ歯類としてサルを用いた用量漸増による単回経口投与毒性試験を実施した．

ラットの小核試験では，1000 mg/kg 以上で最終投与日（投与 2 日）の翌日に体重減少がみられたが，最高投与量である 2000 mg/kg まで死亡例及び状態悪化例は認められず，一般状態にも変化はなかった［2.6.6.2.1］．サルの単回投与毒性試験では，100 mg/kg 以上で嘔吐がみられたが，最高投与量である 200 mg/kg まで死亡例及び状態悪化例は認められなかった［2.6.6.2.2］．

以上より，単回経口投与による概略の致死量は，ラットで 2000 mg/kg を超える量，サルで 200 mg/kg を超える量と判断した．

#### 2.4.4.2 反復投与毒性試験

ラット及びサルを用いて，3 カ月間までの反復投与毒性試験を経口投与により実施した．

ラットの 1 カ月間反復投与毒性試験では，最高投与量である 400 mg/kg で投与 8 日以降に自発運動減少，削痩，摂餌量の低値や体重減少を伴った死亡例及び切迫剖検例が認められた．最低投与量の 20 mg/kg 以上で体重増加抑制，皮膚の扁平上皮過形成，過角化及び炎症細胞浸潤，精巣の精細管変性及び空胞化，精巣上体の重量低値を伴う精子減少，100 mg/kg 以上で好中球数，リンパ球数及び好酸球数の高値，前胃の扁平上皮過形成及び過角化が認められたことから，無毒性量は 20 mg/kg 未満と判断した［2.6.6.3.1］．ラットの 3 カ月間反復投与毒性試験では，最低投与量の 6 mg/kg 以上で体重増加抑制，好酸球数の高値，皮膚の扁平上皮過形成及び過角化，精巣の精細管変性及び精巣上体の精子減少，20 mg/kg 以上で摂餌量の低値，精巣上体重量の低値，前胃の扁平上皮過形成及び過角化，60 mg/kg で好中球数の高値及び精巣重量の低値が認められたことから，無毒性量は 6 mg/kg 未満と判断した．最高投与量の 60 mg/kg まで死亡例及び状態悪化例は認められず，回復性に乏しい重篤な毒性変化も認められなかった［2.6.6.3.2］．

サルの 1 カ月間反復投与毒性試験では，最高投与量である 100 mg/kg で軟便，下痢，血便，嘔吐などの消化器症状，摂餌量の低値及び体重減少が認められ，無毒性量は 20 mg/kg と判断した．最高投与量の 100 mg/kg まで死亡例及び状態悪化例は認められず，回復性に乏しい重篤な毒性変化も認められなかった［2.6.6.3.3］．サルの 3 カ月間反復投与毒性試験では，最高投与量である 60 mg/kg で嘔吐，流涎及び体重減少，また眼科学的検査及び病理組織学的検査で網膜黄斑部に滲出性の網膜剥離を示唆する変化が認められ，無毒性量は 20 mg/kg と判断

した．最高投与量の 60 mg/kg まで死亡例及び状態悪化例は認められず，回復性に乏しい重篤な毒性変化も認められなかった［2.6.6.3.5］．

#### 2.4.4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いた復帰突然変異試験［2.6.6.4.1.1］，ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験［2.6.6.4.2.1］及びラットを用いた小核試験［2.6.6.4.3.1］を実施した結果，いずれも陰性であり，encorafenib は遺伝毒性を有さないと判断した．

#### 2.4.4.4 がん原性試験

Encorafenib は進行がん患者の治療を目的として開発した医薬品であることから，ICH S9 ガイドラインに基づき，がん原性試験は実施しなかった．

#### 2.4.4.5 生殖発生毒性試験

ラット及びウサギを用いて，胚・胎児発生に関する試験を経口投与により実施した．

妊娠ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験において，母動物では最高投与量である 20 mg/kg まで毒性変化は認められなかった．胚・胎児では 20 mg/kg で体重の低値及び骨化遅延を示唆する変化が認められた［2.6.6.6.2.1］．妊娠ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験において，母動物では 75 mg/kg で摂餌の廃絶や消化器症状を伴う切迫剖検例，胚・胎児では同投与量で体重の低値及び骨化遅延を示唆する変化が認められた［2.6.6.6.2.3］．いずれの動物種においても催奇形性は認められず，ラット及びウサギの胚・胎児に対する無毒性量はそれぞれ 5 及び 25 mg/kg と判断した．

Encorafenib は進行がん患者の治療を目的として開発した医薬品であることから，ICH S9 ガイドラインに基づき，雌雄の受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験，出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験は実施せず，一般毒性試験で生殖器に対する影響を評価した．その結果，ラットの反復投与毒性試験において，最低投与量である 6 mg/kg から精巣の精細管変性及びこれに関連した精巣上体の精子減少が認められたが，いずれも休薬による回復性が確認された［2.6.6.3.2］．

#### 2.4.4.6 局所刺激性試験

ウサギの皮膚刺激性試験において，ウサギの胴体背部の皮膚に encorafenib を塗布した結果，0.5 g（1 mL の水に混和）で皮膚刺激性は認められなかった［2.6.6.7.1］．一方，マウスの耳介皮膚に encorafenib を塗布した結果，50%の濃度で耳介重量の高値が認められたことから，

encorafenib は軽度な皮膚刺激性を有すると判断した．5%以下の濃度では刺激性を示唆する変化は認められなかった［2.6.6.8.1.1］．

#### 2.4.4.7 その他の毒性試験

##### 2.4.4.7.1 皮膚感作性試験

マウス局所リンパ節増殖試験において，マウスの耳介皮膚に encorafenib を塗布した結果，最高濃度である 50%まで皮膚感作性は認められなかった［2.6.6.8.1.1］．

##### 2.4.4.7.2 光毒性試験

Balb/c 3T3 細胞を用いた光毒性試験の結果，PIF は 82 を超える値と算出され，光毒性陽性の判断基準（PIF＞5）を上回ったことから，encorafenib は光毒性陽性と判断した［2.6.6.8.2.1］．

##### 2.4.4.7.3 代謝物の安全性評価

Encorafenib は進行がん患者の治療を目的として開発した医薬品であることから，ICH S9 ガイドラインに基づき，個別の代謝物の毒性試験は実施しなかった．

##### 2.4.4.7.4 不純物の安全性評価

原薬及び製剤中において，ICH Q3A(R2)「新有効成分含有医薬品のうち原薬の不純物に関するガイドライン」（医薬審発第 1216001 号，平成 14 年 12 月 16 日）及び ICH Q3B(R2)「新有効成分含有医薬品のうち製剤の不純物に関するガイドライン」（医薬審発第 0624001 号，平成 15 年 6 月 24 日）における安全性確認の必要な閾値を超える不純物は認められないことから，不純物の安全性評価は実施しなかった．

### 2.4.5 総括及び結論

Encorafenib はヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）を選択的に阻害し，BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞において MEK 及び ERK のリン酸化を阻害することで増殖抑制作用を示した．また，BRAF V600 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 1 日 1 回の反復経口投与により抗腫瘍効果を示した．一方，encorafenib は野生型 BRAF を発現するヒト悪性黒色腫細胞の増殖を抑制しなかったことから，BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫患者で高い抗腫瘍効果を示すと考えられた．

安全性薬理試験では，encorafenib はラット又はサルにおいて中枢神経系及び呼吸系に対して影響しなかったが，臨床用量（450 mg/person q.d.）における血漿中濃度（Cmax：6.65 μg/mL）付近においてサルの安静時（夜間）における心拍数を活動期（日中）と同程度に推移させた．しかし，血圧の変動を伴わない生理的変動の範囲内の軽度な変化であり，サルに encorafenib を 3 カ月間反復投与しても心臓に病理組織学的変化や心電図の異常も認められなかった．また，encorafenib 及びヒト代謝物である LHY746 の hERG チャネル電流に対する $IC_{50}$ 値は 73.4 及び 69.0 μmol/L であり，臨床用量（450 mg/person q.d.）における encorafenib 及び LHY746 の血漿中濃度に対してそれぞれ 40 倍以上及び 100 倍以上の乖離があった．したがって，臨床において encorafenib が心機能に重大な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた．

*In vitro* 試験の結果から，encorafenib の主代謝酵素は CYP3A4 と考えられた．臨床薬物相互作用試験において，encorafenib の AUCinf は encorafenib 単剤投与時と比較して強い CYP3A 阻害剤の併用投与時は 283.41%，中程度の CYP3A 阻害剤の併用投与時は 183.01%であった［2.7.2.2.1.2］．また，CYP3A 誘導剤との臨床薬物相互作用試験は実施していないものの，CYP3A 阻害剤との併用が encorafenib の血漿中曝露量に影響を及ぼしたことから，CYP3A 誘導剤との併用は encorafenib の血漿中曝露量を低下させる可能性があると考えられた．

Encorafenib は *in vitro* で CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 及び CYP3A を可逆的に阻害し，CYP3A を時間依存的に阻害した．また，CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9 及び CYP3A4 を誘導した．しかし，生理学的薬物速度論モデルを用いて評価した結果，encorafenib は CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP2D6 を介した重大な薬物相互作用を引き起こさないと予測された［2.7.2.3.1.3］．一方，encorafenib は CYP3A 基質の Cmax 及び AUC をそれぞれ最大で 1.72 及び 1.79 倍に増加させると予測された［2.7.2.3.1.3］．したがって，encorafenib は臨床で CYP3A 基質の血漿中曝露量に影響を及ぼす可能性があると考えられた．

Encorafenib は *in vitro* で UGT1A1 を阻害した．生理学的薬物速度論モデルを用いて予測した結果，encorafenib は UGT1A1 基質の Cmax 及び AUC をそれぞれ約 1.5 倍に増加させると予測され［2.7.2.3.1.3］，encorafenib は臨床で UGT1A1 基質の血漿中曝露量に影響を及ぼす可能性があると考えられた．なお，encorafenib は *in vitro* で UGT1A1 を介した binimetinib のグルクロン酸抱合活性を阻害したが，臨床試験において binimetinib の血漿中曝露量に大きな影響を及ぼさなかった［2.7.2.2.3.2］．

Encorafenib は P-gp の基質であるが，受動的膜透過性が高く，ヒトにおける吸収率が 86%以上である［2.7.2.2.1.2］ことから，P-gp 阻害剤との併用により encorafenib の血漿中曝露量が大きな影響を受ける可能性は低いと考えられた．

Encorafenib は *in vitro* で BCRP，OCT1，OATP1B1，OATP1B3，OCT2，OAT1 及び OAT3 を阻害した．薬物相互作用ガイドライン [14) 15) 16)] に従い検討した結果，臨床において encorafenib が各トランスポーターを阻害する可能性を否定できなかった．

LHY746 は CYP2C8，CYP2C9，P-gp，BCRP，OATP1B1，OCT2 及び OAT3 を阻害した．ヒトに $^{14}$C-encorafenib（100 mg）を単回経口投与したときの LHY746 の Cmax を考慮すると，臨床用量（450 mg/person q.d.）においても LHY746 の Cmax は各 CYP 及びトランスポーターに対する $IC_{50}$ 値よりも小さいと考えられ，臨床において LHY746 が CYP 及びトランスポーターを介した薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられた．

ラット及びサルを用いた毒性試験では，主に encorafenib の薬理作用に関連した毒性変化が認められた．主要な毒性標的器官は，扁平上皮（皮膚及び前胃），消化管，精巣及び網膜であった．扁平上皮（皮膚及び前胃）に対する毒性として，ラットにおいて皮膚及び前胃の扁平上皮過形成及び過角化が認められ，扁平上皮組織に対する細胞増殖亢進作用と考えられた．消化管に対する毒性として，サルにおいて軟便，下痢，血便及び嘔吐などの消化器症状が認められ，消化管の粘膜バリア機能に対する影響に基づく変化と考えられた．精巣に対する毒性として，ラットにおいて精巣の精細管変性及び空胞化，精巣上体の精子減少が認められ，雄受胎能に対する影響が示唆された．網膜に対する毒性として，サルにおいて網膜の黄斑部に滲出性の網膜剥離を示唆する変化が認められ，視覚機能への影響に繋がる変化と考えられた．Encorafenib による毒性変化はいずれも回復性が確認されたが，ラット及びサルの無毒性量における血漿中 encorafenib 曝露量（AUC）は，臨床用量（450 mg/person q.d.）における曝露量と比較してラットで 3.3 倍未満，サルで 1 倍未満であったことから，臨床では皮膚の増殖性病変，消化器症状，滲出性の網膜剥離及び男性の受胎能に対する影響に留意する必要があると考えられた．

Encorafenib は，細菌を用いた復帰突然変異試験，ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験及びラットを用いた *in vivo* 小核試験でいずれも陰性であったことから，遺伝毒性を有さないと判断した．

Encorafenib は，ラット及びウサギにおいて催奇形性を示さなかった．ラットでは，母動物に毒性は認められなかったが，胎児体重の低値及び骨化遅延が認められた．ウサギでは，母動物に対する毒性の二次的変化と考えられる胎児体重の低値及び骨化遅延が認められた．胚・胎児に対する無毒性量における血漿中 encorafenib 曝露量（AUC）は，臨床用量（450 mg/person q.d.）における曝露量と比較してラットで 6.5 倍，ウサギで 73 倍であった．ラットにおいて母動物に対する毒性を示さない投与量から胎児毒性が認められており，十分な安全域がないことから，臨床では妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には投与しないことが望ましいと考えられた．

Encorafenib は，*in vitro* 光毒性試験において陽性を示したが，臨床試験における光線過敏症の発現頻度は低かった［2.7.4.2.1.5］ことから，臨床使用により重篤な光毒性が発現するリスクは低いと考えられた.

臨床において encorafenib は MEK 阻害剤である binimetinib と併用投与される．効力を裏付ける試験において encorafenib と binimetinib の併用は，MAP キナーゼ経路上の RAF と MEK を同時に阻害することで BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞に対して強力な増殖抑制作用を示した．また，マウス異種移植モデルにおいて単剤よりも強力に腫瘍を縮小させるとともに，獲得耐性の出現による腫瘍の再増殖を抑制した．一方，*in vivo* での両剤の併用は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼすことはなかったが，それぞれの単剤投与ではみられない肝臓への影響（小葉辺縁部への炎症細胞浸潤）が認められた．本変化は肝細胞壊死等の傷害性変化や血液学的検査値の変動を伴わないことから重篤な毒性を示唆するものではないと判断した.

Encorafenib 及び binimetinib の単剤投与時の毒性標的臓器やそれぞれの毒性発現機序を踏まえると，併用投与時に毒性が重複する可能性のある臓器は皮膚，消化管及び網膜と考えられる．Encorafenib 及び binimetinib のラット反復投与毒性試験において，いずれも単剤投与で皮膚の病理組織学的変化がみられたが，encorafenib では扁平上皮の過形成性変化に伴う皮膚傷害であったのに対し，binimetinib では扁平上皮に対する直接的な細胞増殖亢進作用を示唆する変化は認められなかった [17) 18)]．RAF 阻害剤による扁平上皮の過形成性変化には，RAF 阻害作用によるパラドキシカルな MAP キナーゼ経路の活性化が関与しており [11) 12) 13)]，MEK 阻害剤を併用することで RAF 阻害剤による皮膚の過形成性変化が軽減することが報告されている [8) 9) 10)]．したがって，encorafenib による皮膚の過形成性変化は，binimetinib との併用により軽減する可能性があると考えられた．Encorafenib のサル反復投与毒性試験において，軟便，下痢，血便及び嘔吐が認められ，RAF 阻害作用に基づく変化である可能性が考えられる．また，binimetinib のサル反復投与毒性試験において，大腸粘膜の傷害性を示唆する変化が認められ，MEK 阻害作用に基づく変化の可能性が考えられる．したがって，RAF 及び MEK が同じ MAP キナーゼ経路にあることを併せて考察すると，併用投与時に消化管に対する影響が増強する可能性が考えられた．しかし，臨床試験では，併用群とそれぞれの単剤群における消化管障害の発現率及び重篤度に明らかな差は認められない［2.7.4.2］ことから，臨床使用において encorafenib と binimetinib の併用により消化管障害が増悪する可能性は低いと考えられた．Encorafenib のサル反復投与毒性試験において，黄斑部における滲出性の網膜剥離を示唆する変化が認められ，MAP キナーゼ経路の阻害に関連して発現した可能性が考えられた．Binimetinib の毒性試験において網膜に対する影響はみられていない [17) 18) 19) 20)] が，臨床試験において滲出性の網膜剥離が認められており，MEK 阻害作用に関連した変

化と考えられている［2.7.4.2.1.5］．RAF 及び MEK が同じ MAP キナーゼ経路にあることも併せて考察すると，併用投与時に網膜に対する影響が増強する可能性があり，臨床において網膜毒性に留意する必要があると考えられた.

これまでに得られている非臨床試験成績から，encorafenib は BRAF 遺伝子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．また，encorafenib と binimetinib の併用は網膜毒性の増強に留意する必要があるものの，強力かつ持続的な抗腫瘍効果を示す新たな治療選択肢になると考えられた.

### 2.4.6 参考文献一覧

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） 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.

8） Anforth R, Fernandez-Peñas P, Long GV. Cutaneous toxicities of RAF inhibitors. Lancet Oncol. 2013;14:e11-8.

9） Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. N Engl J Med. 2014;371:1877-88.

10） Livingstone E, Zimmer L, Vaubel J, Schadendorf D. BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: adverse events and their management. Chin Clin Oncol. 2014;3:29.

11） Carnahan J, Beltran PJ, Babij C, Le Q, Rose MJ, Vonderfecht S, et al. Selective and potent Raf inhibitors paradoxically stimulate normal cell proliferation and tumor growth. Mol Cancer Ther. 2010;9:2399-410.

12） Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. Nature. 2010;464:431-5.

13） Gibney GT, Messina JL, Fedorenko IV, Sondak VK, Smalley KS. Paradoxical oncogenesis and the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. Nat Rev Clin Oncol. 2013;10:390-9.

14） Guideline on the Investigation of Drug Interactions (Final). European Medicines Agency, 2012

15） Guidance for Industry (DRAFT GUIDANCE): Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Clinical Pharmacology, February 2012

16） 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（最終案），厚生労働省, 2014 年 7 月

17） 社内資料：28-day repeat-dose oral toxicity study of ARRY-215311 in rats followed by a 4-week recovery. 最終報告書, 1140-007

18） 社内資料：26-week repeat-dose oral toxicity study of ARRY-438162 in rats followed by a 4-week recovery. 最終報告書, 1140-029

19） 社内資料：A 4-week toxicity study of ARRY-215311 administered by nasogastric intubation to Cynomolgus Monkeys, with a 4-week recovery period. 最終報告書, [redacted]00028

20） 社内資料：A 9-month toxicity study of ARRY-438162 administered by nasogastric intubation to Cynomolgus Monkeys, with a 3−month recovery period. 最終報告書, [redacted]00117