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

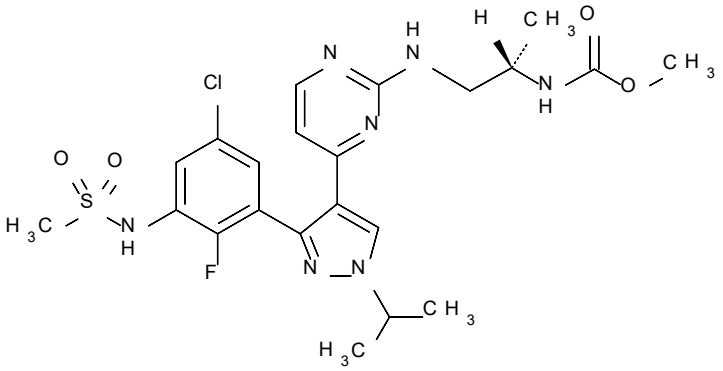
Encorafenib は強力かつ選択的な BRAF 阻害剤である．

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 を阻害する薬剤は，本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．

Encorafenib は，ヒト変異型 BRAF のキナーゼ活性を阻害することで MEK 及び 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，encorafenib と MEK 阻害剤である binimetinib 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，encorafenib 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】

Methyl *N*-{(2*S*)-1-[(4-{3-[5-chloro-2-fluoro-3-(methanesulfonamido)phenyl]-1-(propan-2-yl)-1*H*-pyrazol-4-yl}pyrimidin-2-yl)amino]propan-2-yl}carbamate

2.6.1 緒言
エンコラフェニブ

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）】

ビニメチニブとの併用において，通常，成人にはエンコラフェニブとして 1 回 450mg を 1 日 1 回経口投与する.

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 23
2.6.2.4 安全性薬理試験 23
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 26
2.6.2.6 考察及び結論 26
2.6.2.7 図表 30
2.6.2.8 参考文献 30

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
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株
CI	コンビネーションインデックス
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
EC_{50}	50%有効濃度
Encorafenib	エンコラフェニブ
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FOB	機能観察総合評価法
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
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPMC	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IC_{50}	50%阻害濃度
KDR	Kinase insert domain receptor
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase
mRNA	メッセンジャーRNA
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	ホスフォジエステラーゼ
PEG	ポリエチレングリコール
pERK	リン酸化 ERK
pMEK	リン酸化 MEK
PXR	Pregnane X receptor
QTc	心拍数で補正した QT
SCID	重症複合免疫不全
SPRY4	Protein sprouty homolog 4
SS	シナジースコア
STK36	Serine/threonine kinase 36
TGI	腫瘍増殖抑制率
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
Encorafenib	LGX818
LHY746	Encorafenib の代謝物
Binimetinib	MEK162

2.6.2.1 まとめ

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．

効力を裏付ける試験（Encorafenib 単剤）

In vitro 試験では，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．Encorafenib は RAF 以外に STK36 を 10 nmol/L で 87%阻害したが，それ以外の 400 種類以上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．Encorafenib は，BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞に対して，MAP キナーゼ経路（図 2.6.2.1-1）で RAF の下流に存在する MEK 及び ERK のリン酸化を阻害し，細胞増殖を抑制した．また，encorafenib は野生型 BRAF を有するがん細胞には作用せず，BRAF V600 変異（V600E，V600D 又は V600K）を有するがん細胞の増殖を選択的に抑制した．

In vivo 試験では，encorafenib は BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞を用いた種々のマウス異種移植モデルにおいて，腫瘍中の MEK 及び 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 及び SPRY4 の腫瘍中での遺伝子発現は，encorafenib の抗腫瘍効果に応じて減少した．

効力を裏付ける試験（Encorafenib 及び binimetinib 併用）

Encorafenib と binimetinib 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，encorafenib 及び binimetinib 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，encorafenib と binimetinib 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

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 は PDE4D のみを 10 μmol/L で 50%以上阻害した．PDE4D に対する IC_{50} 値は 4.4 μmol/L であり，RAF に対する IC_{50} 値と比較して 1000 倍以上乖離していた．

安全性薬理試験

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，活動時（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．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 及びヒト血漿中の主な代謝物である 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，サルの心電図において encorafenib は最高投与量の 200 mg/kg まで QTc を延長させなかった．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．

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．

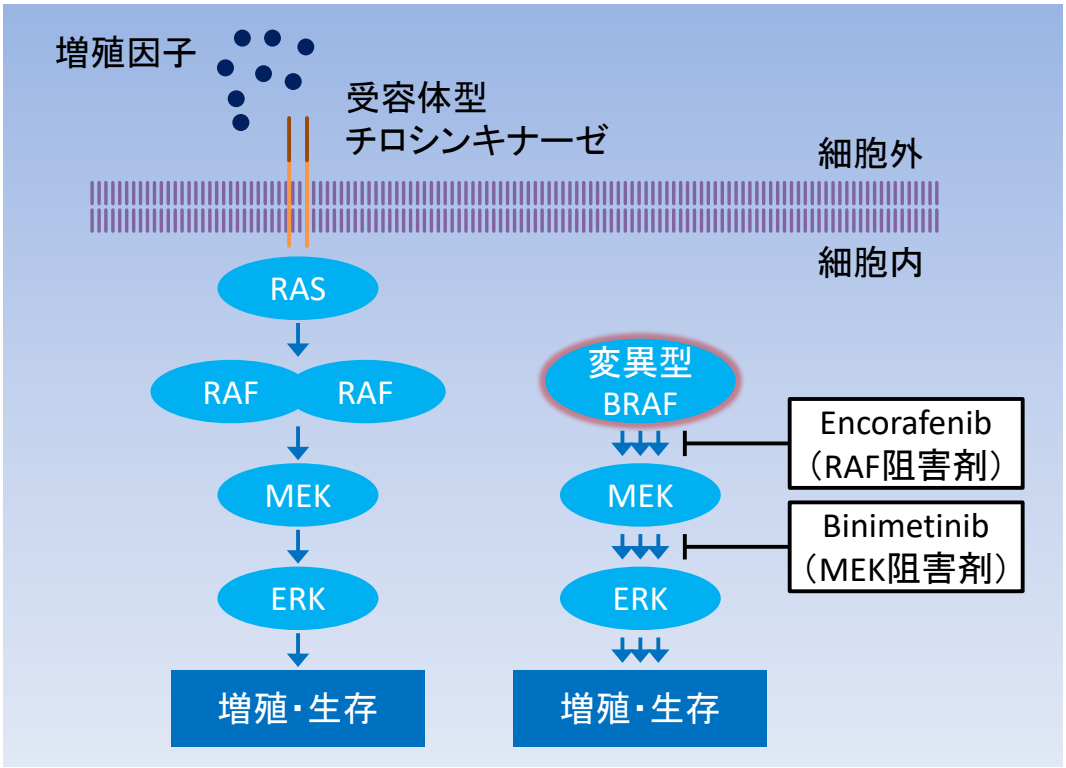


図 2.6.2.1-1　MAP キナーゼ経路の概略

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)]．

2.6.2 薬理試験の概要文
エンコラフェニブ

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

Encorafenib の RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）に対する阻害活性，RAF 以外のキナーゼに対する阻害活性，BRAF 変異悪性黒色腫を含む各種ヒトがん細胞株に対する 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．また，encorafenib の代謝物である LHY746 の RAF に対する阻害活性及び 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．

2.6.2.2.1.1 RAF に対する阻害活性

［評価資料：4.2.1.1-1］

RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）に対する encorafenib の阻害活性を検討した．

ヒト由来の部分配列をバキュロウイルスに発現させて作製した各 RAF に，encorafenib，ATP 及び MEK1 を含む緩衝液を添加し，3 時間（CRAF のみ 1 時間）反応させた．Amplified luminescence proximity homogeneous アッセイにより，RAF の基質タンパク質である MEK1 のリン酸化を測定し，encorafenib の阻害活性を評価した．

Encorafenib は変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF 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．

2.6.2.2.1.2 RAF 以外のキナーゼに対する阻害活性

［参考資料：4.2.1.1-2 及び 4.2.1.1-3］

[redacted] テクノロジーを用いて，RAF 以外の 439 種類のタンパク質キナーゼ及び脂質キナーゼに対する encorafenib の阻害活性を検討した．

Encorafenib は 10 μmol/L で 37 種類のキナーゼを 90%以上阻害した．これら 37 種類のキナーゼに encorafenib を 0.01，0.1，1 及び 10 μmol/L の 4 濃度で処置し，阻害活性を検討した結果，encorafenib が 0.01 μmol/L で 50%以上の阻害率を示したキナーゼは STK36（87%阻害）のみであった．

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

［評価資料：4.2.1.1-4］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を用いて，RAF の基質タンパク質である MEK のリン酸化に対する encorafenib の阻害作用を検討した．

Encorafenib を含む培地中で A375 を 3 時間培養した．Encorafenib を含まない培地に交換後，更に 1 又は 3 時間培養した．細胞を可溶化し，電気化学発光免疫測定法により pMEK 量を測定し，encorafenib のリン酸化阻害作用を評価した．

Encorafenib 除去直後，除去 1 及び 3 時間後の IC_{50} 値は，それぞれ 2.4，3 及び 4.2 nmol/L であった．MEK リン酸化阻害作用は encorafenib 除去後も大きく減弱せず，少なくとも 3 時間まで作用が持続していた．

2.6.2.2.1.4 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 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 を用いて，RAF の下流に位置する ERK のリン酸化に対する encorafenib の阻害作用を検討した．

Encorafenib を含む培地中で A375 を 3 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，encorafenib のリン酸化阻害作用を評価した．

Encorafenib は処置濃度に応じて ERK リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 3 nmol/L であった．

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

［評価資料：4.2.1.1-4］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 A375 に対する encorafenib の増殖抑制作用を検討した．

Encorafenib を含む培地中で A375 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，encorafenib の増殖抑制作用を評価した．

Encorafenib は処置濃度に応じて細胞増殖を抑制し，IC_{50} 値は 4.4 nmol/L であった．

2.6.2.2.1.6 各種ヒトがん細胞株に対する増殖抑制作用

［参考資料：4.2.1.1-5］

BRAF 変異の有無が確認されている 512 種類の細胞株で構成されるパネルを用いて，各種ヒトがん細胞株に対する encorafenib の増殖抑制作用を検討した．

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，encorafenib の増殖抑制作用を評価した．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．

Encorafenib は，BRAF V600 変異（V600E，V600D 又は V600K）を有するがん細胞 38 株中の 28 株（74%）に対して増殖抑制作用を示した．このうち BRAF V600 変異を有する悪性黒色腫細胞 26 株中では 19 株に対して増殖抑制作用を示した．一方，野生型 BRAF を有する 455 細胞株中に encorafenib が増殖抑制作用を示した株はほとんどなかった．

2.6.2.2.1.7 LHY746 の RAF に対する阻害活性

［参考資料：4.2.1.1-6］

RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）に対する LHY746 の阻害活性を検討した．

各 RAF に，LHY746，[γ-^{33}P]ATP 及び MEK1 を含む緩衝液を添加し，2 時間反応させた．基質タンパク質である MEK1 に取り込まれた[γ-^{33}P]ATP の放射活性を RAF のキナーゼ活性の指標として，LHY746 の阻害活性を評価した．

LHY746 は変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF 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．各 RAF に対する LHY746 の阻害活性は，encorafenib の阻害活性と比較して 10 倍以上弱かった．

2.6.2.2.1.8 LHY746 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

［参考資料：4.2.1.1-7］

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M を用いて，LHY746 の ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用を検討した．

LHY746 又は encorafenib を含む培地中で Malme-3M を 1 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，LHY746 及び encorafenib のリン酸化阻害作用を評価した．LHY746 及び encorafenib は処置濃度に応じて ERK リン酸化を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 76 及び 33 nmol/L であった．

LHY746 又は encorafenib を含む培地中で Malme-3M を 72 時間培養した後，CellTiter 96 AQueous アッセイ法により生細胞数を測定し，LHY746 及び encorafenib の増殖抑制作用を評価した．LHY746 及び encorafenib は処置濃度に応じて細胞増殖を抑制し，IC_{50} 値はそれぞれ 119 及び 3.7 nmol/L であった．

以上より，LHY746 は BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株において，ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用を示したが，増殖抑制作用の IC_{50} 値は encorafenib と比較して 30 倍以上大きかった．

2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

Encorafenib のマウス異種移植モデルにおける腫瘍中 MEK 及び ERK リン酸化阻害作用，並びに抗腫瘍効果を検討した．媒体には 3 vol%ETPGS 含有 20 vol%PEG 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 MEK 及び ERK リン酸化阻害作用

［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 encorafenib の腫瘍中 MEK 及び 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（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 encorafenib を 0.6，6 及び 60 mg/kg で単回投与した．投与 1，6，24 及び 72 時間後に血液及び腫瘍を採取し，血漿及び腫瘍中 encorafenib 濃度を分析した．腫瘍中の pMEK 量及び 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，同経路の不活性化に関わる DUSP6[7] 及び SPRY4[8] の mRNA 量は，定量的リアルタイム PCR 法により測定した．

結果を図 2.6.2.2.2.1-1 に示した．Encorafenib は，腫瘍の縮小効果が認められる 6 mg/kg で腫瘍中 MEK 及び ERK リン酸化を投与 6 時間後に 70%以上，24 時間後に 50%以上阻害した．また，DUSP6 及び SPRY4 の腫瘍中での遺伝子発現を持続的に抑制した．なお，encorafenib を 6 mg/kg で投与したときの血漿及び腫瘍中の Tmax は 1 時間であり，24 時間後までに検出限界（血漿中では約 0.012 μmol/L，腫瘍中では約 0.037 μmol/L）未満となった．

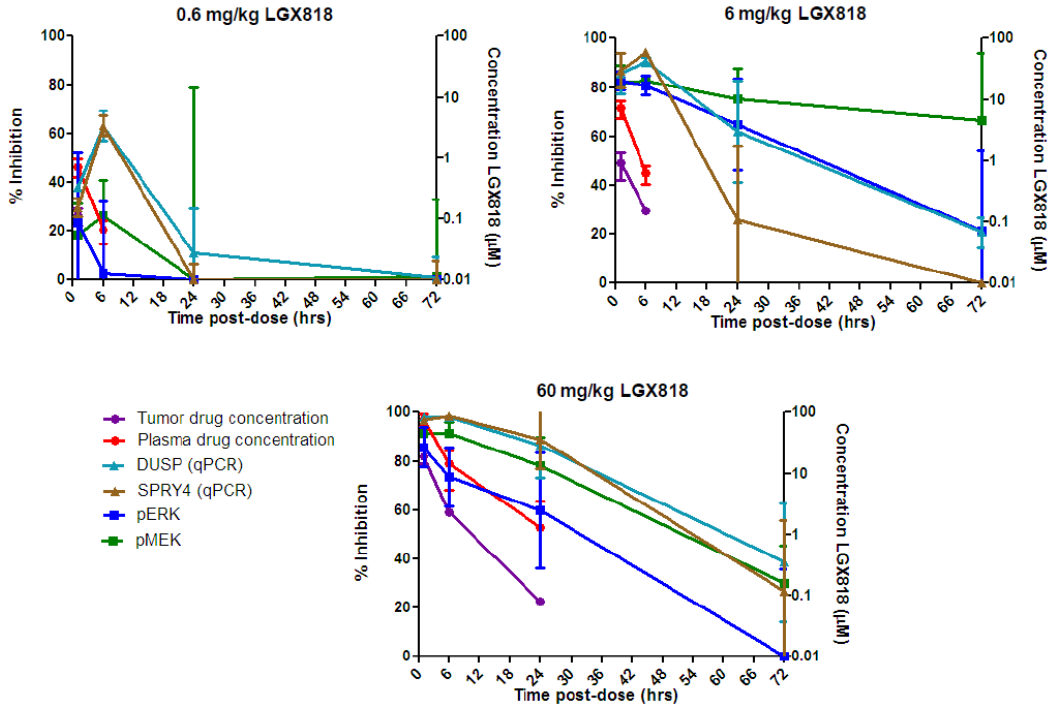


図 2.6.2.2.2.1-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける腫瘍中 MEK 及び ERK リン酸化阻害作用

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．腫瘍が定着した時点で encorafenib（LGX818）を 0.6，6 及び 60 mg/kg で単回投与した．投与 1，6，24 及び 72 時間後に血液及び腫瘍を採取し，血漿及び腫瘍中 encorafenib 濃度を分析した．腫瘍中の pMEK 量及び pERK 量は電気化学発光免疫測定法により測定した．腫瘍中の DUSP6 及び SPRY4 の mRNA 量は定量的リアルタイム PCR 法により測定した．データは 4 例の平均値及び標準誤差を示した．Encorafenib を 0.6 mg/kg で投与した際の腫瘍中濃度は，いずれの時点でも検出限界未満であった．

2.6.2.2.2.2　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

［評価資料：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 encorafenib の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（Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，11 日後に 1 群当たり 5 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体あるいは encorafenib を 0.6，6，60 及び 300 mg/kg で 1 日 2 回，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 2.6.2.2.2.2-1 及び表 2.6.2.2.2.2-1 に示した．Encorafenib 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，encorafenib はすべての投与量で腫瘍の増殖を抑制し，6 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた．

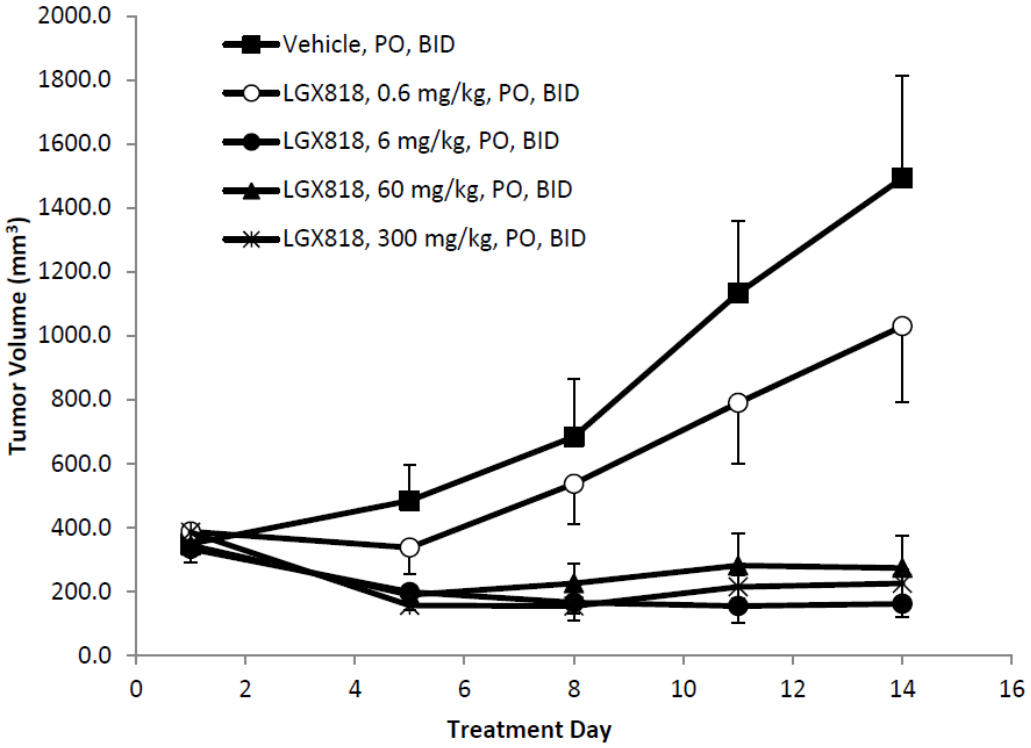


図 2.6.2.2.2.2-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果

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 11 日後から，encorafenib（LGX818）を 0.6，6，60 及び 300 mg/kg で 1 日 2 回，14 日間反復投与した．データは 5 例の平均値及び標準誤差を示した．

表 2.6.2.2.2.2-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける腫瘍縮小率及び体重変化率

投与物質	投与量（mg/kg）	腫瘍体積変化（mm^3）	ΔT/ΔC（%）	腫瘍縮小率（%）	体重変化率（%）
媒体	0	1144±79	100	-	8.4±1.4
LGX818	0.6	642±206	56	-	5.1±2.3
LGX818	6	-172±15	-	51.45	4.3±0.7
LGX818	60	-70±79	-	20.42	0.5±0.9
LGX818	300	-160±36	-	41.50	0.4±2.6

ΔC 及び ΔT は，それぞれ媒体投与マウス及び encorafenib（LGX818）投与マウスの投与開始日から最終評価日までの腫瘍体積変化（平均値及び標準誤差）を示した．腫瘍縮小率は，腫瘍体積の減少（-ΔT）を投与開始日の腫瘍体積に対する割合として示した．体重変化率は，投与開始日から最終評価日までの体重変化を投与開始日の体重に対する割合（平均値及び標準誤差）として示した．

2.6.2.2.2.3　　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

［参考資料：4.2.1.1-8］

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 encorafenib の抗腫瘍効果を検討した．

ドナーマウスより摘出した腫瘍組織片（継代回数 5 回）を雌性ヌードマウス（Crl:NU(NCr)-Foxn1^{nu}）の皮下に移植し，22 日後に 1 群当たり 10 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体あるいは encorafenib を 1，5 及び 20 mg/kg で 1 日 2 回，26 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 2.6.2.2.2.3-1 及び表 2.6.2.2.2.3-1 に示した．Encorafenib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさず，5 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた．

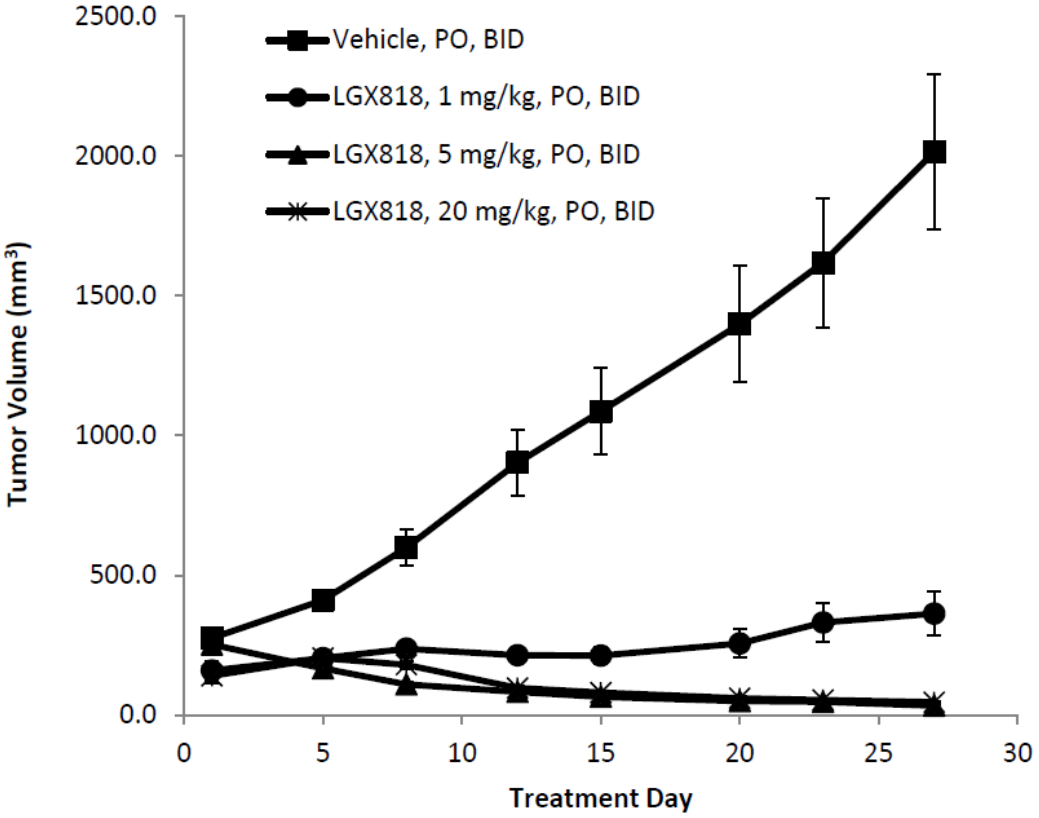


図 2.6.2.2.2.3-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける抗腫瘍効果

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 22 日後から，encorafenib（LGX818）を 1，5 及び 20 mg/kg で 1 日 2 回，26 日間反復投与した．データは 10 例の平均値及び標準誤差を示した．

表 2.6.2.2.2.3-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける腫瘍縮小率及び体重変化率

投与物質	投与量（mg/kg）	腫瘍体積変化（mm^3）	ΔT/ΔC（%）	腫瘍縮小率（%）	体重変化率（%）
媒体	0	1739±272	100	-	4.3±1.4
LGX818	1	426±67	25	-	2.3±1.1
LGX818	5	-218±23	-	86.29	4.2±2.4
LGX818	20	-258±20	-	95.02	0.2±1.8

ΔC 及びΔT は，それぞれ媒体投与マウス及び encorafenib（LGX818）投与マウスの投与開始日から最終評価日までの腫瘍体積変化（平均値及び標準誤差）を示した．腫瘍縮小率は，腫瘍体積の減少（-ΔT）を投与開始日の腫瘍体積に対する割合として示した．体重変化率は，投与開始日から最終評価日までの体重変化を投与開始日の体重に対する割合（平均値及び標準誤差）として示した．

2.6.2.2.2.4　　ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M 移植マウスにおける抗腫瘍効果

［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 Malme-3M を用いたマウス異種移植モデルにおける encorafenib の抗腫瘍効果を検討した．

5×10^6 個の Malme-3M を雌性 C.B-17 SCID マウスの皮下に移植し，11 日後に 1 群当たり 5 例を無作為に割り付けた．割り付け後，媒体あるいは encorafenib を 0.5，3 及び 20 mg/kg で 1 日 1 回，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 及び表 2.6.2.2.2.4-1 に示した．Encorafenib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさず，3 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた．

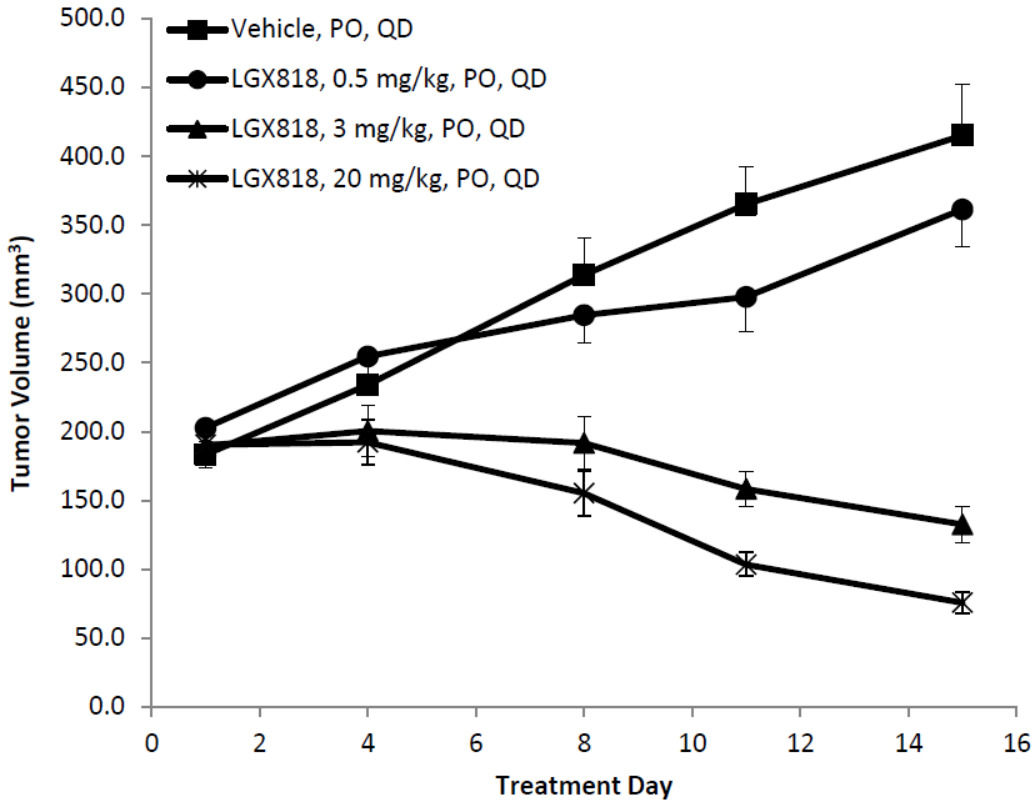


図 2.6.2.2.2.4-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M 移植マウスにおける抗腫瘍効果

BRAF V600E 変異を有するヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M を雌性 C.B-17 SCID マウスの皮下に移植した．移植 11 日後から，encorafenib（LGX818）を 0.5，3 及び 20 mg/kg で 1 日 1 回，14 日間反復投与した．データは 5 例の平均値及び標準誤差を示した．

表 2.6.2.2.2.4-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M 移植マウスにおける腫瘍縮小率及び体重変化率

投与物質	投与量（mg/kg）	腫瘍体積変化（mm^3）	ΔT/ΔC（%）	腫瘍縮小率（%）	体重変化率（%）
媒体	0	233±31	100	-	-2.2±0.5
LGX818	0.5	160±22	68	-	-0.2±0.6
LGX818	3	-57±9	-	30.12	0.9±0.9
LGX818	20	-116±9	-	60.23	-0.1±0.7

ΔC 及び ΔT は，それぞれ媒体投与マウス及び encorafenib（LGX818）投与マウスの投与開始日から最終評価日までの腫瘍体積変化（平均値及び標準誤差）を示した．腫瘍縮小率は，腫瘍体積の減少（-ΔT）を投与開始日の腫瘍体積に対する割合として示した．体重変化率は，投与開始日から最終評価日までの体重変化を投与開始日の体重に対する割合（平均値及び標準誤差）として示した．

2.6.2.2.3 *In vitro* 試験（併用）

Encorafenib 及び binimetinib 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，encorafenib と binimetinib の併用による増殖抑制作用を検討した.

Encorafenib 及び binimetinib 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 [9] 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．Encorafenib 及び binimetinib 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．Encorafenib と binimetinib 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）

Encorafenib 及び binimetinib 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 encorafenib と binimetinib 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[10]．

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），encorafenib 単剤（3 mg/kg， 1 日 2 回），binimetinib 単剤（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）あるいは encorafenib（3 mg/kg，1日 2 回）と binimetinib（3 及び 10 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．Encorafenib 及び binimetinib 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．Encorafenib 及び binimetinib 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，encorafenib（3 mg/kg）と binimetinib（3 及び 10 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，encorafenib（3 mg/kg）と binimetinib（10 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，encorafenib 及び binimetinib 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．

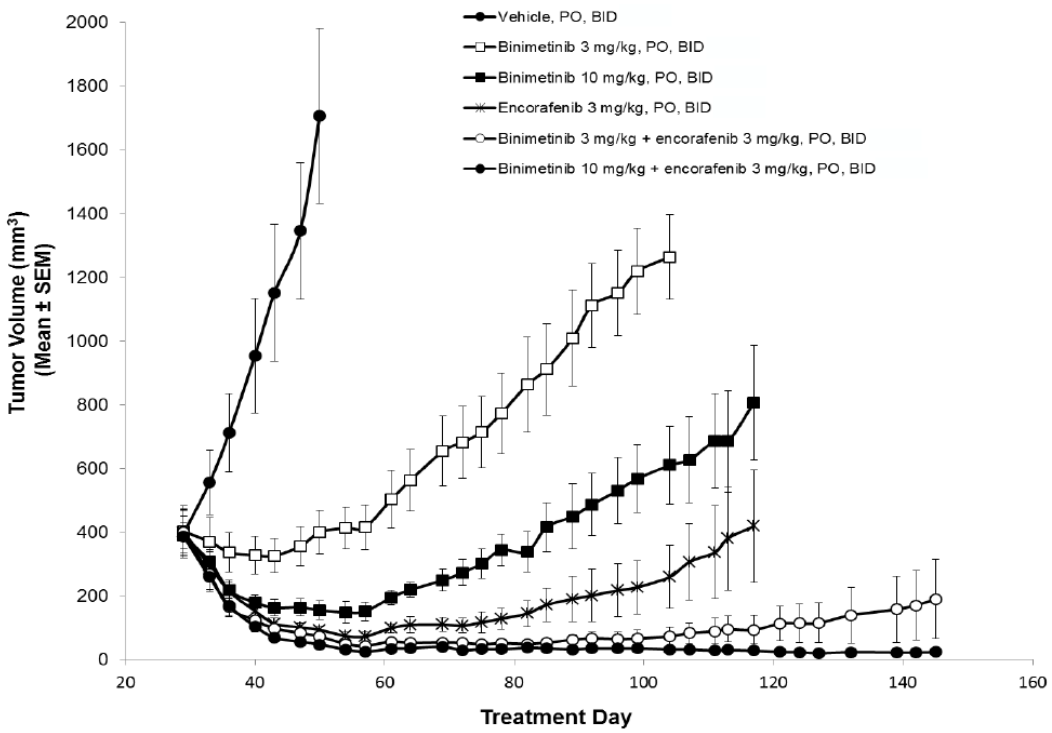


図 2.6.2.2.4.1-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

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，encorafenib 単剤（3 mg/kg，1 日 2 回），binimetinib 単剤（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）あるいは encorafenib（3 mg/kg，1 日 2 回）と binimetinib（3 及び 10 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．

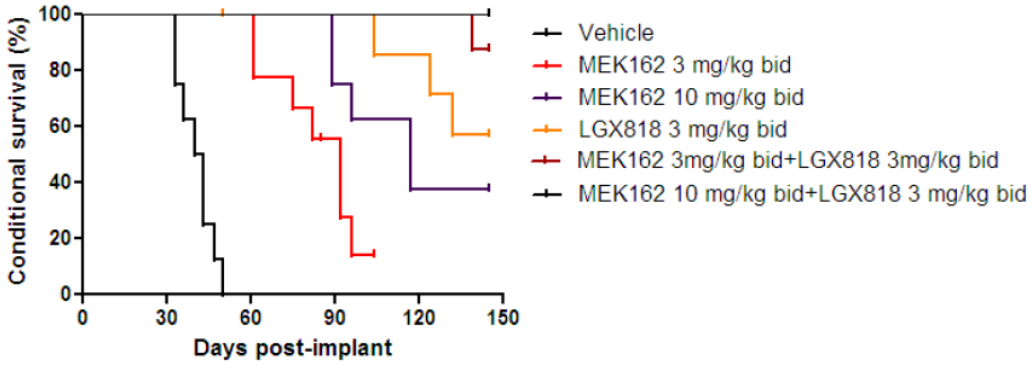


図 2.6.2.2.4.1-2　ヒト悪性黒色腫由来細胞 HMEX1906 移植マウスにおける生存率（併用）

腫瘍体積が 750 mm^3 未満の個体の生存率を示した．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．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．

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 encorafenib と binimetinib 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），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 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．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 単剤投与での TGI は 40.2%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，encorafenib の 6 mg/kg に binimetinib を併用すると抗腫瘍効果が増強した．

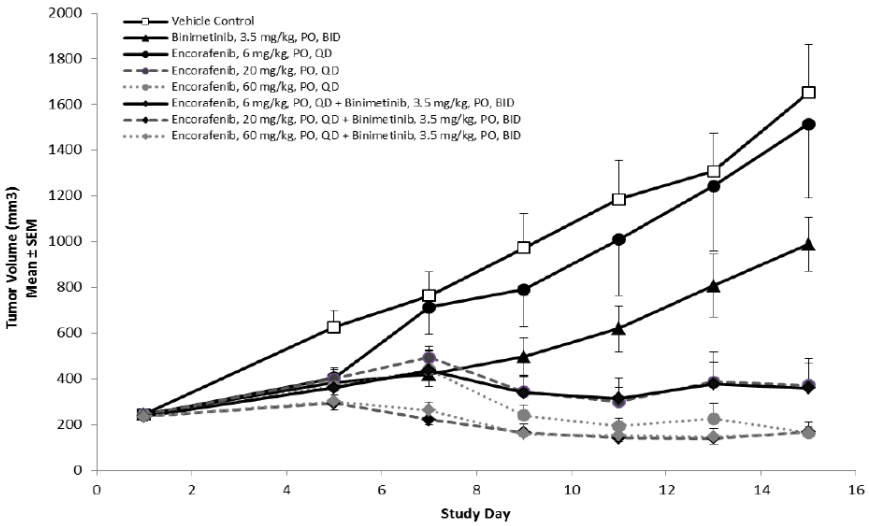


図 2.6.2.2.4.2-1　ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

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，encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 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 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 encorafenib と binimetinib 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），encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 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．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 単剤投与時の TGI は 31%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．

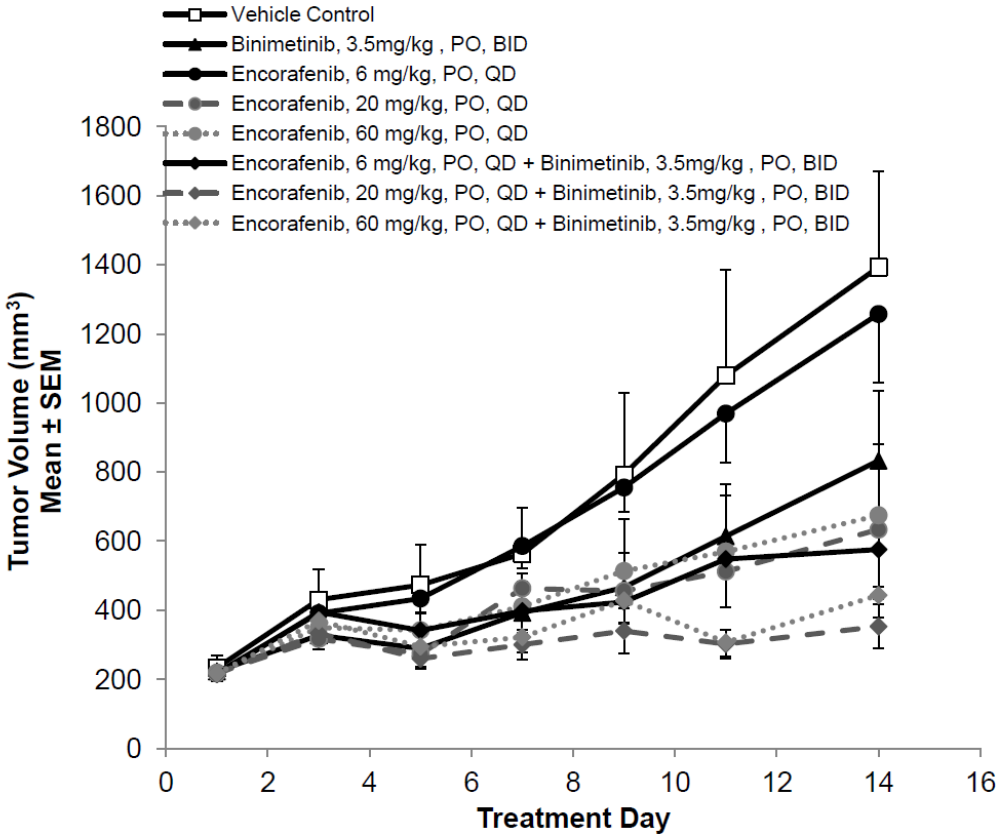


図 2.6.2.2.4.3-1　ヒト悪性黒色腫由来細胞 MEL13B4 移植マウスにおける抗腫瘍効果（併用）

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，encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 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］

Encorafenib の各種分子標的に対する作用を 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て検討した．Encorafenib は PDE4D を除く分子標的を 10 μ mol/L で 50%以上阻害又は活性化しなかった．PDE4D に対する encorafenib の IC_{50} 値は 4.4 μ mol/L であった．

2.6.2.3.2 LHY746 の各種分子標的に対する作用

［参考資料：4.2.1.2-2］

LHY746 の各種分子標的に対する作用を 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て検討した．LHY746 はキナーゼ KDR，PDE4D，核内受容体 PXR を除く分子標的を 10 μ mol/L で 50%以上阻害又は活性化しなかった．KDR 及び PDE4D に対する LHY746 の IC_{50} 値は，それぞれ 1.8 及び 4.2 μ mol/L であった．PXR に対する LHY746 の EC_{50} 値は 3.8 μ mol/L であった．

2.6.2.4 安全性薬理試験

Encorafenib の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．いずれも GLP に準拠して実施した．

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，ラットを用いて encorafenib の心血管系に対する作用も評価したが，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 ラットにおける中枢神経系に対する作用

［評価資料：4.2.1.3-1］

Crl:WI(Han)系ラット（雄 10 例／群）に encorafenib を 100 mg/kg で単回経口投与し，FOB 法により encorafenib の中枢神経系に対する影響を検討した．投与前，投与後 1，3 及び 24 時間における一般症状，行動，握力，後肢開脚度及び体温を観察又は測定した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 vol%Tween 80 含有 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．その結果，encorafenib は 100 mg/kg でいずれの評価項目にも影響しなかった．ラットにおける encorafenib 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4例／群）に，encorafenibを50，100及び200 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encorafenibの体温に対する影響を検討した．投与前から投与後 24 時間までの体温を経時的に測定し，15 分毎の平均体温を評価した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%HPMC 溶液を投与した．

その結果，encorafenib は最高投与量である 200 mg/kg まで体温に影響しなかった．サルにおける encorafenib の体温に対する無影響量は 200 mg/kg と判断した．

2.6.2.4.2 心血管系に対する作用

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

［参考資料：4.2.1.3-2］

hERG 遺伝子を導入した HEK293 細胞（3 標本／濃度）を用いて，encorafenib の hERG チャネル電流に対する影響をマニュアルによるパッチクランプ法により検討した．DMSO に溶解させた encorafenib を灌流液に添加し，10，30 及び 100 μmol/L の濃度で適用した．

その結果，encorafenib の hERG チャネル電流に対する阻害率は 10，30 及び 100 μmol/L の濃度でそれぞれ 13.5，26.6 及び 58.7%であり，その IC_{50} 値は 73.4 μmol/L（39.64 μg/mL）であった．

2.6.2.4.2.2 LHY746 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 CHO-K1 細胞（2 標本／濃度）を用いて，LHY746 の hERG チャネル電流に対する影響を全自動によるパッチクランプ法により検討した．DMSO に溶解させた LHY746 を灌流液に添加し，1，3，10，30 及び 100 μmol/L の濃度で適用した．

その結果，LHY746 の hERG チャネル電流に対する阻害率は 10，30 及び 100 μmol/L の濃度でそれぞれ 6.1，28.1 及び 60.6%であり，その IC_{50} 値は 69.0 μmol/L（29.32 μg/mL）であった．

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4例／群）に，encorafenibを50，100及び200 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encorafenib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 24 時間まで経時的に測定し，血圧（収

縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧，脈圧），心拍数及び心電図（PR 間隔，QRS 幅，QT 間隔及び QTc）について 15 分毎の平均値を評価した．また，心電図検査として，投与前から投与後 24 時間にかけて心電図波形の異常や不整脈の有無を評価した．投与容量は 10 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 w/v%HPMC 溶液を投与した．

心拍数の経時的な推移を図 2.6.2.4.2.3-1 に示した．

50 mg/kg 以上の投与後 0.5 時間から 23 時間にかけて心拍数の持続的な高値が認められ，主に投与後 6 時間から 18 時間の夜間における心拍数の推移が対照群と比較して高値であった．対照群に対する心拍数の増加率は 50，100 及び 200 mg/kg でそれぞれ最大 73%（投与後 11 時間），82%（投与後 12.5 時間）及び 68%（投与後 12.75 時間）であったが，その時の心拍数は 177，181 及び 167 beats/min であり，生理的変動の範囲内の軽度な変化と考えられた．また，心拍数の増加に伴い，50 mg/kg 以上で PR 間隔及び QT 間隔の短縮が認められたが，QTc 及び QRS 幅の変動や心電図の異常波形は認められなかった．また，最高投与量である 200 mg/kg まで収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧及び脈圧に対する影響は認められなかった．その他，一般状態変化として，200 mg/kg で流涎及び嘔吐が認められた．

以上，50 mg/kg 以上で心拍数が高値を示したことから，サルにおける心血管系に対する無影響量は 50 mg/kg 未満と判断した．

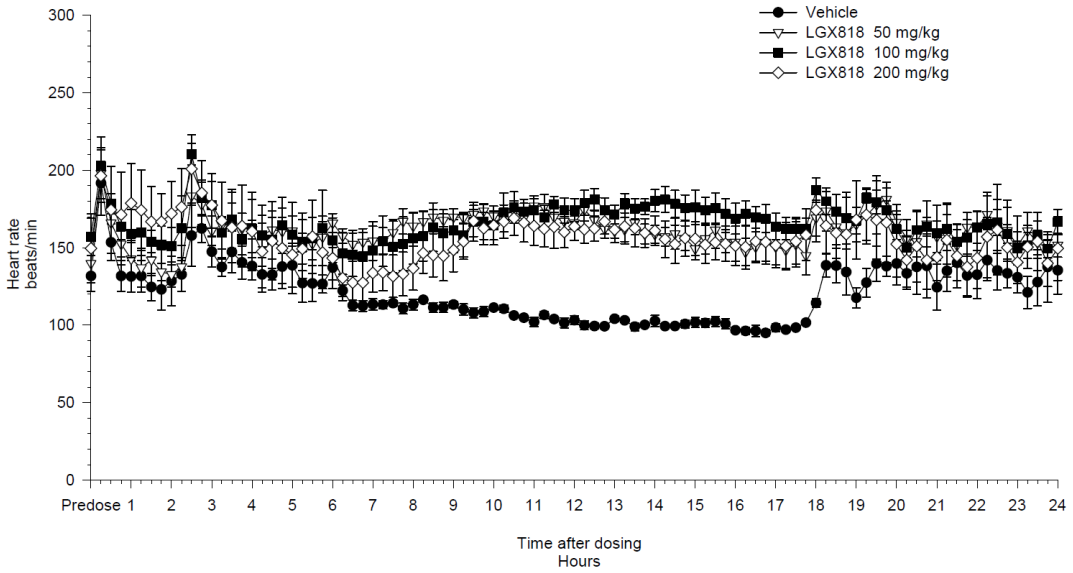


図 2.6.2.4.2.3-1　カニクイザルの心拍数に対する影響
カニクイザルに encorafenib（LGX818）を 50，100 及び 200 mg/kg で単回経口投与し，投与後 24 時間まで経時的に心拍数を測定した．データは 4 例の平均値及び標準誤差を示した．

2.6.2.4.2.4　　ラットにおける心血管系に対する作用

［参考資料：4.2.1.3-5］

Crl:WI(Han)系ラット（雄 6 例／群）に encorafenib を 6 及び 60 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 encorafenib の血圧及び心拍数に対する影響を検討した．血圧を投与前から投与後 24 時間まで経時的に測定し，血圧（収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧，脈圧）及び心拍数について 15 分毎の平均値を評価した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 vol%Tween 80 含有 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，60 mg/kg で投与後 1 及び 8～16.5 時間に心拍数が高値を示し，対照群に対する心拍数の増加率はそれぞれ約 6%及び 7～30%であった．一方，最高投与量である 60 mg/kg まで収縮期血圧，拡張期血圧，平均血圧及び脈圧に対する影響は認められなかった．

以上，60 mg/kg で心拍数の増加が認められたことから，ラットにおける encorafenib の心血管系に対する無影響量は 6 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：4.2.1.3-1］

Crl:WI(Han)系ラット（雄 5 例／群）に encorafenib を 100 mg/kg で単回経口投与し，encorafenib の呼吸系に対する影響を検討した．投与前，投与直後，投与後 0.5，1，3，7 及び 24 時間における呼吸数，1 回換気量及び分時換気量をプレチスモグラフにより測定した．投与容量は 5 mL/kg とし，対照群には媒体である 0.5 vol%Tween 80 含有 0.5 w/v%CMC 溶液を投与した．

その結果，encorafenib は 100 mg/kg でいずれの評価項目にも影響しなかった．ラットにおける encorafenib の呼吸系に対する無影響量は 100 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（Encorafenib 単剤）

Encorafenib は，ヒト RAF を用いた *in vitro* の検討において，変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF を阻害した．また，encorafenib は，BRAF V600E 変異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 MEK 及び ERK のリン酸化を阻害し，細胞増殖を抑制した．なお，encorafenib は BRAF V600 変異（V600E，V600D 又は V600K）を有する各種ヒトがん細胞株の増殖も抑制したが，野生型 BRAF を有するがん細胞株の増殖

を抑制しなかった．図 2.6.2.1-1 に示したように，変異型 BRAF が単量体として MAP キナーゼ経路を活性化できるのに対して，野生型 BRAF 及び CRAF は RAS の活性化条件下で二量体を形成してシグナルを伝達する．RAF 阻害剤は二量体中で一方の RAF にのみしか結合できないため，野生型 BRAF 又は CRAF を発現する細胞では MAP キナーゼ経路の活性化を十分に抑制できないことが報告されており [11) 12) 13)]，encorafenib も同様の機構により，野生型 BRAF を有する細胞の増殖を抑制しなかったと考えられた．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 V600 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明らかになった．

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を用いた *in vivo* の検討において，encorafenib は腫瘍中で MEK 及び ERK のリン酸化を阻害し，MAP キナーゼ経路の活性化により誘導される DUSP6[7)] 及び SPRY4[8)] 遺伝子の発現を抑制した．これらの作用の発現は，血漿及び腫瘍中の encorafenib 濃度が検出限界未満となる単回投与後 24 時間でも持続していた．*In vitro* でも，MEK リン酸化阻害作用は encorafenib 除去後少なくとも 3 時間まで持続しており，encorafenib による作用発現の持続性が支持された．

Encorafenib は，BRAF V600 変異を有するヒト悪性黒色腫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，Malme-3M 細胞移植マウスを用いた検討では，encorafenib は 1 日 1 回反復経口投与により腫瘍縮小効果を示した．したがって，encorafenib は臨床においても 1 日 1 回の投与で有効性を発揮できる可能性があると考えられた．

RAF 以外のキナーゼに対する選択性の検討において，encorafenib は STK36 を除く 400 種類以上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．STK36 の遺伝子欠損マウスは正常に発生するものの，脳脊髄液の循環障害に起因すると考えられる水頭症により生後 3 週間以内に死亡する [14)]．しかし，ラット及びサルを用いた encorafenib の毒性試験において脳や脊髄に異常所見は認められなかったことから，encorafenib は STK36 の阻害活性に基づく薬理作用を発現しないと考えられた．

代謝物である LHY746 は，ヒトでの曝露量が反復経口投与時は未変化体と同程度であるが，encorafenib と比較して細胞増殖に対する IC_{50} 値が 30 倍以上大きいことから，encorafenib の抗腫瘍効果の発現に寄与しないと考えられた．

<u>効力を裏付ける試験（Encorafenib 及び binimetinib 併用）</u>

Encorafenib 及び binimetinib 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，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 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．

Encorafenib と binimetinib 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，encorafenib 及び binimetinib 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 [10]．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 [15]．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) 15)]．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

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 のみであった．一方，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，代謝物である 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．Encorafenib 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．また，ヒトに encorafenib を 450 mg で経口投与したときの血漿中 encorafenib の非結合型 Cmax 及び LHY746 の非結合型 Cmax（推定値）とは 2 倍以上乖離していた．したがって，これらの分子標的を介した薬理作用を示す可能性は低いと考えられた．

安全性薬理試験

心血管系に対する作用を評価した結果，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．また，ラットにおいても 60 mg/kg で心拍数の高値が認められ，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．Encorafenib の臨床用量（450 mg/person q.d.）における血漿中 encorafenib 濃

度（Cmax：6.65 μg/mL）は，サルにおいて心拍数に対する影響が認められる血中濃度であり，その安全域は 1 倍未満であった．ラットの心拍数に対する無影響量とは 1.5 倍の安全域があった（表 2.6.2.6-1）．なお，サルにおける対照群に対する心拍数の増加率は，50，100 及び 200 mg/kg の投与後 12 時間付近（夜間）で，それぞれ最大 73，82 及び 68%であり，いずれも活動時（日中）の心拍数と大きく変わらず，生理的変動の範囲内の軽度な変化であった．また，心拍数の変動に伴って二次的に PR 間隔及び QT 間隔の短縮が認められたが，最高投与量の 200 mg/kg（Cmax：6.87 μg/mL）まで血圧や QTc の変動は認められなかった．更に，サルに encorafenib を 3 カ月間反復投与しても，最高投与量の 60 mg/kg まで心臓に病理組織学的変化は認められず，心電図検査で明らかな心拍数や心電図異常も認められなかった［2.6.6.3.5］．以上のことから，encorafenib の心拍数に対する影響は軽度であり，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．

Encorafenib は *in vitro* で hERG チャネル電流を 10 μmol/L 以上で阻害したが，その IC_{50} 値は 73.4 μmol/L（39.64 μg/mL）であり，サルの心電図においても最高投与量の 200 mg/kg（Cmax：6.87 μg/mL）まで QTc の延長は認められなかった．また，ヒト血漿中の主な代謝物である LHY746 は *in vitro* で hERG チャネル電流を 10 μmol/L 以上で阻害し，その IC_{50} 値は 69.0 μmol/L（29.32 μg/mL）であった．臨床用量（450 mg/person q.d.）における血漿中 encorafenib 濃度（Cmax：6.65 μg/mL，非結合型 Cmax：0.92 μg/mL）及び血漿中 LHY746 濃度の推定値（Cmax：2.33 μg/mL（ヒトに encorafenib（100 mg/person）を単回経口投与した時の血漿中 LHY746 濃度［2.7.2.3.1.3］から算出），非結合型 Cmax：0.27 μg/mL）は，hERG チャネルに対する IC_{50} 値に対してそれぞれ 40 倍以上及び 100 倍以上の乖離があった．したがって，encorafenib 及び LHY746 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．

中枢神経系及び呼吸系に対する作用を評価した結果，encorafenib はラットにおいて 100 mg/kg（Cmax：83.8 μg/mL）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 200 mg/kg（Cmax：6.87 μg/mL）まで体温に対する影響を示さなかった．Encorafenib の臨床用量（450 mg/person q.d.）における血漿中濃度（Cmax：6.65 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 13 倍，サルの体温に対する無影響量と 1.0 倍の安全域があった（表 2.6.2.6-1）．

以上，encorafenib は臨床血中濃度より低い血中濃度からサルの安静時（夜間）における心拍数を高く推移させたが，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．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して影響しなかった．

以上の非臨床試験成績から，encorafenib 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 encorafenib 濃度の比較

動物種	試験項目	臨床用量	無影響量（mg/kg）	Cmax（μg/mL）	動物／ヒト濃度比 [a]
ヒト	-	450 mg/person（q.d.）	-	6.65[b]	-
ラット	中枢神経系，呼吸系，		100	83.8[c]	13
	心血管系		6	9.82[d]	1.5
サル	体温		200	6.87[e]	1.0
	心血管系		<50	<1.65[e]	<0.25

a：臨床用量における encorafenib 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）の比
b：BRAF 変異メラノーマ患者に encorafenib を 450 mg/person q.d.で 28 日間反復経口投与したときの投与 1 日における encorafenib の Cmax（CLGX818X2101 試験）［2.7.2.2.1.2］
c：ラット 1 カ月間反復経口投与毒性試験の初回投与時（雄）における encorafenib の Cmax［2.6.7.3］
d：ラット 3 カ月間反復経口投与毒性試験の初回投与時（雄）における encorafenib の Cmax［2.6.7.3］
e：サルの漸増経口投与毒性試験の初回投与時（雄）における encorafenib の Cmax［2.6.7.5］

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） 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.

8） Mason JM, Morrison DJ, Basson MA, Licht JD. Sprouty proteins: multifaceted negative-feedback regulators of receptor tyrosine kinase signaling. Trends Cell Biol. 2006;16:45-54.

9） 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.

10） 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.

11） Karoulia Z, Wu Y, Ahmed TA, Xin Q, Bollard J, Krepler C, et al. An integrated model of RAF inhibitor action predicts inhibitor activity against oncogenic BRAF signaling. Cancer Cell. 2016;30:501-503.

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） 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.

14） Merchant M, Evangelista M, Luoh SM, Frantz GD, Chalasani S, Carano RA, et al. Loss of the serine/threonine kinase fused results in postnatal growth defects and lethality due to progressive hydrocephalus. Mol Cell Biol. 2005;25:7054-68.

15） 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: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

LHY746 (primary metabolite of encorafenib)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
RAF に対する阻害活性	ヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50048	4.2.1.1-1
RAF 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（439 種類）	*In vitro*	[redacted]	[redacted]及び	4.2.1.1-2 及び 4.2.1.1-3
BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する MEK リン酸化阻害作用	ヒト悪性黒色腫細胞株 A375	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50039	4.2.1.1-4
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 A375	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50039	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 A375	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50039	4.2.1.1-4
各種ヒトがん細胞株に対する増殖抑制作用	各種ヒトがん細胞株（512 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50435	4.2.1.1-5
LHY746 の RAF に対する阻害活性	ヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）	*In vitro*	Array BioPharma Inc.	LGX818-Enz-1	4.2.1.1-6
LHY746 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	ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M	*In vitro*	Array BioPharma Inc.	818-CBiology-0117	4.2.1.1-7

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腫瘍中 MEK 及び 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]-50045	4.2.1.1-8
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	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50045	4.2.1.1-8
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	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]-50045	4.2.1.1-8
ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M 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 Malme-3M モデル：マウス皮下移植	経口	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-50045	4.2.1.1-8
Primary Pharmacodynamics (Combination with binimetinib)					
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: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

LHY746 (primary metabolite of encorafenib)

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（143 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.及び [redacted]	RD-20[redacted]-00386	4.2.1.2-1
LHY746 の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（56 種類）	*In vitro*	Novartis Pharma.	RD-20[redacted]-00327	4.2.1.2-2

2.6.3.1 Pharmacology: Overview (continued)

Test Article: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

LHY746 (primary metabolite of encorafenib)

Type of Study	Test System[3)]	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Safety Pharmacology					
Central nervous system	Rat, Wistar Hannover [1)]	PO	[redacted]	694466	4.2.1.3-1
	Monkey, Cynomolgus [1)]	PO	[redacted]	694467	4.2.1.3-4
Cardiovascular function	HEK293 cells [2)]	*In vitro*	[redacted]	[redacted]0926.[redacted]	4.2.1.3-2
	HEK293 cells [2)] LHY746 (primary metabolite)	*In vitro*	[redacted]	100033086	4.2.1.3-3
	Monkey, Cynomolgus [1)]	PO	[redacted]	694467	4.2.1.3-4
	Rat, Wistar Hannover	PO	[redacted]	521-1205	4.2.1.3-5
Respiratory function	Rat, Wistar Hannover [1)]	PO	[redacted]	694466	4.2.1.3-1

1) Study conducted in accordance with Good Laboratory Practices (21CFR§58)
2) Human embryonic kidney cell line
3) Studies were conducted using encorafenib unless specified otherwise.

2.6.3.2 Primary Pharmacodynamics: Overview of the data

Test Article: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

LHY746 (primary metabolite of encorafenib)

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Primary Pharmacodynamics					
RAF に対する阻害活性	ヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）	*In vitro*	0.8 pmol/L～25 μ mol/L	Encorafenib は変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF 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.	RD-20[redacted]-50048
RAF 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（439 種類）	*In vitro*	10 nmol/L～10 μ mol/L	Encorafenib が 10 nmol/L で 50%以上の阻害率を示したキナーゼは，STK36（87%阻害）のみであった.	[redacted]及び
BRAF 変異ヒト悪性黒色腫細胞株に対する MEK リン酸化阻害作用	ヒト悪性黒色腫細胞株 A375	*In vitro*	0.3 nmol/L～10 μ mol/L	Encorafenib は処置濃度に応じて MEK リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 2.4 nmol/L であった．MEK リン酸化阻害作用は encorafenib 除去後も大きく減弱せず，少なくとも 3 時間まで作用が持続していた.	RD-20[redacted]-50039
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 A375	*In vitro*	3 nmol/L～10 μ mol/L	Encorafenib は処置濃度に応じて ERK リン酸化を阻害し，IC_{50} 値は 3 nmol/L であった.	RD-20[redacted]-50039
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 A375	*In vitro*	1.5 nmol/L～0.37 μ mol/L	Encorafenib は処置濃度に応じて細胞増殖を抑制し，IC_{50} 値は 4.4 nmol/L であった.	RD-20[redacted]-50039

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
各種ヒトがん細胞株に対する増殖抑制作用	各種ヒトがん細胞株（512 種類）	*In vitro*	2.5 nmol/L～8 μ mol/L	Encorafenib は，BRAF V600 変異を有するがん細胞 38 株中の 28 株（74%）に対して増殖抑制作用を示した．一方，野生型 BRAF を有する 455 細胞株中に encorafenib が増殖抑制作用を示した株はほとんどなかった．	RD-20[redacted]-50435
LHY746 の RAF に対する阻害活性	ヒト RAF（変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF）	*In vitro*	4 pmol/L～10 μ mol/L（LHY746）	LHY746 は変異型 BRAF（V600E），野生型 BRAF 及び CRAF 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．	LGX818-Enz-1
LHY746 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	ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M	*In vitro*	0.2 nmol/L～10 μ mol/L（LHY746 及び encorafenib）	LHY746 及び encorafenib は処置濃度に応じて ERK のリン酸化を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 76 及び 33 nmol/L であった． LHY746 及び encorafenib は処置濃度に応じて細胞増殖を抑制し，IC_{50} 値はそれぞれ 120 及び 3.7 nmol/L であった．	818-CBiology-0117
ヒト悪性黒色腫細胞株 A375 移植マウスにおける腫瘍中 MEK 及び 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	0.6，6，60 mg/kg（単回投与）	Encorafenib は 6 mg/kg で腫瘍中 MEK 及び ERK リン酸化を投与 6 時間後に 70%以上，24 時間後に 50%以上阻害した．また，DUSP6 及び SPRY4 の腫瘍中での遺伝子発現を持続的に抑制した．	RD-20[redacted]-50045

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	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	0.6，6，60，300 mg/kg（1 日 2 回，14 日間反復投与）	Encorafenib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさず，6 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた.	RD-20[redacted]-50045
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	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	1，5，20 mg/kg（1 日 2 回，26 日間反復投与）	Encorafenib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさず，5 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた.	RD-20[redacted]-50045
ヒト悪性黒色腫細胞株 Malme-3M 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 Malme-3M モデル：マウス皮下移植	経口	0.5，3，20 mg/kg（1 日 1 回，14 日間反復投与）	Encorafenib は一般状態及び体重推移に明らかな影響を及ぼさず，3 mg/kg 以上で腫瘍を投与開始日よりも縮小させた.	RD-20[redacted]-50045
Primary Pharmacodynamics (Combination with binimetinib)					
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*	encorafenib：0.037～2.7 μmol/L binimetinib：0.037～2.7 μmol/L	Encorafenib と binimetinib 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

Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
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	encorafenib 単剤（3 mg/kg，1 日 2 回）， binimetinib 単剤（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）， encorafenib（3 mg/kg，1 日 2 回）と binimetinib（3 及び 10 mg/kg，1 日 2 回）の併用（最長 117 日間反復投与）	Encorafenib 及び binimetinib 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． Encorafenib 及び binimetinib 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，encorafenib（3 mg/kg）と binimetinib（3 及び 10 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，encorafenib（3 mg/kg）と binimetinib（10 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	encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），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（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． 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 単剤投与での TGI は 40.2%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	encorafenib 単剤（6，20 及び 60 mg/kg，1 日 1 回），binimetinib 単剤（3.5 mg/kg，1 日 2 回），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（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． 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 単剤投与時の TGI は 31%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: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

LHY746 (primary metabolite of encorafenib)

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（143 種類）	*In vitro*	10 nmol/L～30 μmol/L	Encorafenib は，PDE4D を除く分子標的を 10 μmol/L で 50%以上阻害又は活性化しなかった．PDE4D に対する encorafenib の IC_{50} 値は 4.4 μmol/L であった．	RD-20[redacted]-00386
LHY746 の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（56 種類）	*In vitro*	10～30 μmol/L	LHY746 は，キナーゼ KDR，PDE4D，核内受容体 PXR を除く分子標的を 10 μmol/L で 50%以上阻害又は活性化しなかった．KDR 及び PDE4D に対する LHY746 の IC_{50} 値は，それぞれ 1.8 及び 4.2 μmol/L であった．一方，PXR に対する LHY746 の EC_{50} 値は 3.8 μmol/L であった．	RD-20[redacted]-00327

2.6.3.4 Safety Pharmacology: Overview of the data

Test Article: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

LHY746 (primary metabolite of encorafenib)

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
Central nervous system	Rat, Wistar Hannover	PO	0 or 100	10M	·No significant effects at 100 mg/kg ·NOEL = 100 mg/kg	GLP	694466
	Monkey, Cynomolgus	PO	0, 50, 100 or 200	4M	·No significant effects on body temperature	GLP	694467
Cardiovascular function	HEK293 cells	*In vitro*	Up to 100 μ M	NA	·hERG channel inhibition ·IC50 = 73.4 μ M	Non-GLP	[redacted]0926.[redacted]
	HEK293 cells	*In vitro*	Up to 100 μ M (LHY746)	NA	·hERG channel inhibition ·IC50 = 69.0 μ M	Non-GLP	100033086
	Monkey, Cynomolgus	PO	0, 50, 100 or 200	4M	·No significant effects on systemic blood pressures (systolic, diastolic, mean arterial and pulse pressure), electrocardiographic intervals (PR, QT, QTc, QRS) or ECG waveforms ·Higher heart rates at all dose levels with no diurnal shift ·NOEL<50 mg/kg	GLP	694467
	Rat, Wistar Hannover	PO	0, 6 or 60	6M	·Higher heart rates at 60 mg/kg. NOEL= 6 mg/kg	Non-GLP	521-1205

HEK: Human embryonic kidney cell line.

1) Single dose unless specified otherwise

2) Studies were conducted using encorafenib 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: Encorafenib; Internal code names: LGX818, NVP-LGX818, LGX818-NX

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
Respiratory Function	Rat, Wistar Hannover	PO	0 or 100	5M	·No significant effects at 100 mg/kg ·NOEL = 100 mg/kg	GLP	694466

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