ロズリートレクカプセル100 mg
ロズリートレクカプセル200 mg
（エヌトレクチニブ）

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

2.4 非臨床試験の概括評価

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
AKT	protein kinase B	プロテインキナーゼ B
ALK	anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度–時間曲線下面積
BID	bis in die	1日2回投与
CD	cluster of differentiation	白血球分化抗原
C_{max}	maximum (peak) plasma concentration	最高血漿中薬物濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CV	cardiovascular system	心血管系
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
FISH	fluorescence in situ hybridization	蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
hERG	human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go-関連遺伝子
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
LC-MS/MS	liquid chromatography–tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム型質量分析
LOEL	lowest observed effect level	最小影響量
Luc	luciferase	ルシフェラーゼ
MAPK	mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ
MRHD	maximum recommended human dose	最高推奨臨床用量
MTD	maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
nd	not done	未実施
NOEL	no observed effect level	無影響量
NTRK	neurotrophic tyrosine receptor kinase	神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体
PDX	patient-derived xenograft	患者由来腫瘍移植モデル
P-gp	p-glycoprotein	P-糖蛋白
PLC	phospholipase C	ホスホリパーゼ C
QD	quaque die	1日1回投与
QTc	corrected QT	補正 QT
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
ROS1	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	—
STAT	signal transducer and activator of transcription	シグナル伝達兼転写活性化因子
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖阻害率
TRK	tropomyosin receptor kinase	トロポミオシン受容体キナーゼ
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase	UDP–グルクロノシルトランスフェラーゼ

UVR	ultraviolet radiation	紫外線照射

目次

頁

2.4 非臨床試験の概括評価 8
2.4.1 緒言 8
2.4.2 非臨床試験計画概略 8
2.4.2.1 薬理試験 8
2.4.2.2 薬物動態試験 8
2.4.2.3 毒性試験 9
2.4.2.4 GLP 及びガイドラインへの適合性 10
2.4.3 薬理試験 10
2.4.3.1 *In vitro* 薬理試験 10
2.4.3.1.1 キナーゼ阻害活性と *in vitro* 細胞増殖抑制活性 10
2.4.3.1.2 作用機序 10
2.4.3.2 *In vivo* 薬理試験 11
2.4.3.2.1 TRK 及び ROS1 融合蛋白質依存性モデルでの抗腫瘍活性 11
2.4.3.2.2 頭蓋内移植モデルでの抗腫瘍活性 13
2.4.3.3 副次的薬理試験 13
2.4.3.4 安全性薬理試験 14
2.4.3.4.1 中枢神経系 14
2.4.3.4.2 心血管系 15
2.4.3.4.3 呼吸器系 15
2.4.4 薬物動態試験 15
2.4.4.1 分析法 15
2.4.4.2 吸収 15
2.4.4.3 分布 16
2.4.4.3.1 血漿蛋白結合及び血球移行性 16
2.4.4.3.2 組織分布 16
2.4.4.3.3 脳への移行性 16
2.4.4.4 代謝 17
2.4.4.5 排泄 17
2.4.4.6 薬物動態学的薬物相互作用 17
2.4.5 毒性試験 17
2.4.5.1 急性毒性 18
2.4.5.2 反復投与毒性 18
2.4.5.2.1 中枢神経系への影響 19
2.4.5.2.2 皮膚への影響 19
2.4.5.2.3 血液系への影響 19

2.4.5.2.4 肝臓への影響 20
2.4.5.2.5 消化管への影響 20
2.4.5.2.6 QT 及び QTc 間隔の延長 20
2.4.5.2.7 角膜への影響 21
2.4.5.2.8 その他の影響 21
2.4.5.3 遺伝毒性 22
2.4.5.4 がん原性 22
2.4.5.5 生殖発生毒性 22
2.4.5.6 新生児を用いた試験 22
2.4.5.7 その他の毒性 23
2.4.5.7.1 光毒性試験 23
2.4.5.7.2 不純物の安全性評価 23
2.4.5.8 動物からヒトへの外挿 23
2.4.6 総括及び結論 24
2.4.6.1 薬効 24
2.4.6.2 薬物動態 25
2.4.6.3 安全性薬理及び毒性 26
2.4.6.4 結論 28
2.4.7 参考文献一覧 28

図一覧

該当なし。

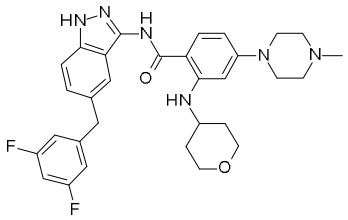
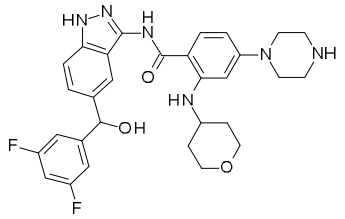
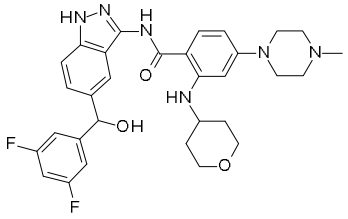
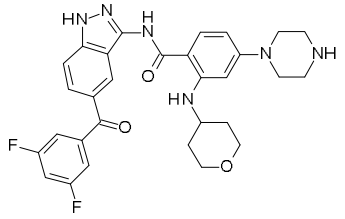
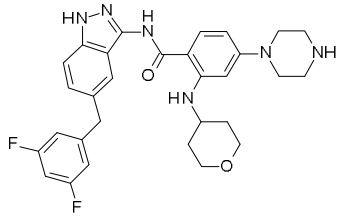
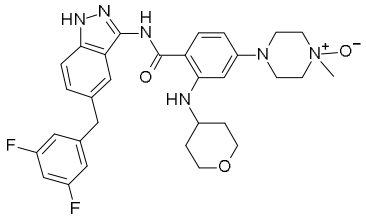
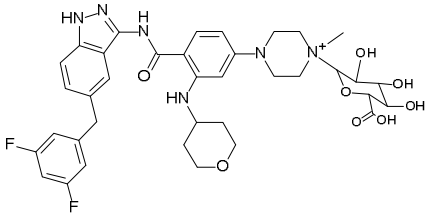
表一覧

表 2.4.3.2.1-1 マウス皮下移植モデルにおけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性 - *NTRK* 融合遺伝子陽性細胞株 12
表 2.4.3.2.1-2 マウス皮下移植モデルにおけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性 - *ROS1* 融合遺伝子陽性細胞株 13
表 2.4.3.4-1 エヌトレクチニブの安全性薬理試験とヒト臨床用量との曝露マージン 14
表 2.4.5-1 エヌトレクチニブの反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験とヒト臨床用量との 曝露マージン 18
表 2.4.5.8-1 エヌトレクチニブの *in vivo* 毒性試験における毒性，最小影響量（LOEL）とヒト臨床用量との曝露マージン 24

添付資料一覧

該当なし。

Entrectinib 関連物質の名称一覧

名称	化学構造式	化学名
エヌトレクチニブ (RO7102122; MW: 560.64 Da)		*N*-[5-(3,5-difluorobenzyl)-1*H*-indazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(tetrahydro-2*H*-pyran-4-ylamino) benzamide
M1 (MW: 562.61 Da)		N-[5-[(3,5-difluorophenyl)-hydroxy-methyl]-1H-indazol-3-yl]-4-piperazin-1-yl-2-(tetrahydropyran-4-ylamino) benzamide
M2 (MW: 576.64 Da)		N-[5-[(3,5-difluorophenyl)-hydroxy-methyl]-1H-indazol-3-yl]-4-(4-methylpiperazin-1-yl)-2-(tetrahydropyran-4-ylamino) benzamide
M3 (MW: 560.59 Da)		N-[5-(3,5-difluorobenzoyl)-1H-indazol-3-yl]-4-piperazin-1-yl-2-(tetrahydropyran-4-ylamino) benzamide
M5 (RO7278378; MW: 546.62 Da)		N-[5-[(3,5-difluorophenyl)methyl]-1H-indazol-3-yl]-4-piperazin-1-yl-2-(tetrahydropyran-4-ylamino) benzamide
M7 (MW: 576.64 Da)		N-[5-[(3,5-difluorophenyl)methyl]-1H-indazol-3-yl]-4-(4-methyl-4-oxido-piperazin-4-ium-1-yl)-2-(tetrahydropyran-4-ylamino) benzamide
M11 (RO7293615; MW: 737.77 Da)		rac-(2S,3S,4S,5R,6R)-6-[4-[4-[[5-[(3,5-difluorophenyl)methyl]-1H-indazol-3-yl]carbamoyl]-3-(tetrahydropyran-4-ylamino) phenyl]-1-methyl-piperazin-1-ium-1-yl]-3,4,5-trihydroxy-tetrahydropyran-2-carboxylic acid

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 緒言

エヌトレクチニブ（entrectinib，RXDX-101，RO7102122，NMS-1191372）[1]は，受容体型チロシンキナーゼであるTRKA，TRKB，TRKC（それぞれ*NTRK1*，*NTRK2*及び*NTRK3*の遺伝子産物）[2]，ROS1及びALKに対し選択的で強力な阻害剤である[3]。これらのチロシンキナーゼ遺伝子は，染色体の転座等により，種々のパートナー遺伝子と融合し，発癌に寄与することが知られており[4),5]，エヌトレクチニブは，*NTRK*又は*ROS1*融合遺伝子を発現しているヒト腫瘍細胞をマウス皮下に移植したモデルにおいて著明な腫瘍増殖抑制活性を示した。また，腫瘍をマウス頭蓋内に移植したモデルでは，生存期間の延長が認められたことから，中枢神経系での活性も示唆される。臨床では，*NTRK1/2/3*又は*ROS1*遺伝子再構成（遺伝子融合）を有する固形がん（*NTRK1/2/3*）及び肺癌（*ROS1*）の患者に有効性を示した。

エヌトレクチニブの非臨床試験は，ICH S9（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）に準拠し，適切な動物種を用いて実施した。*In vivo*の安全性薬理試験及び毒性試験では，げっ歯類としてラットを，また，非げっ歯類としてヒトに近い代謝プロファイル持つイヌを選択した。TRK，ALK，ROS1は，哺乳類細胞の多くに発現しており，ラット及びイヌは，エヌトレクチニブに薬理学的に反応するため，薬理学的作用及び化合物関連毒作用を評価するのに適した動物種である。エヌトレクチニブは患者に経口投与されることから，多くの動物試験でも経口にて投与した。

非臨床薬理試験，薬物動態試験及び毒性試験から得られた結果は，エヌトレクチニブの臨床推奨用量（1日1回経口投与600 mg/日）を支持する。

2.4.2 非臨床試験計画概略

2.4.2.1 薬理試験

エヌトレクチニブの薬理作用を評価するため，*NTRK1/2/3*又は*ROS1*融合遺伝子を発現する細胞株を用いて，*in vitro*での増殖抑制活性を検討した。また，標的となるTRK及びROS1，並びに下流シグナル伝達分子のリン酸化に対するエヌトレクチニブの作用と細胞増殖抑制活性との相関性，融合蛋白質を発現する腫瘍細胞株の細胞周期に対する作用及びアポトーシス誘導について調べた。また，エヌトレクチニブのヒトにおける主な代謝物であるM5についてTRK，ROS1及びALKキナーゼに対する阻害活性を評価した。

*In vivo*では，代表的ないくつかの組織に由来し，*NTRK*又は*ROS1*と種々のパートナー遺伝子が融合した遺伝子を発現するヒト腫瘍細胞又は融合遺伝子を導入したBa/F3細胞をマウスに移植したモデルを用いて，エヌトレクチニブの腫瘍増殖に対する抑制活性を評価した。また，融合蛋白質陽性の腫瘍をマウス頭蓋内に移植したモデルを用いて，脳などの中枢神経系におけるエヌトレクチニブの抗腫瘍活性を評価した。

副次的薬理作用を調べるために，293種のキナーゼから成るキナーゼパネルを用いてエヌトレクチニブのキナーゼ阻害活性を調べた。また，エヌトレクチニブ及びその代謝物M5に関して，それぞれ89種のターゲット（受容体，イオンチャネル及びトランスポーター）へのリガンドの結合に対する作用を*in vitro*で評価した。

エヌトレクチニブの安全性薬理試験は，コアバッテリー試験としてラットを用いた中枢神経系，呼吸器系機能に対する試験，*in vitro*ヒトether-a-go-go関連遺伝子(hERG)アッセイ，イヌを用いた心血管テレメトリー試験を実施した。中枢神経系，呼吸器系に対する試験では，雄ラットに比較し，より高い全身曝露を示す雌ラットを用いた。

2.4.2.2 薬物動態試験

エヌトレクチニブの吸収，分布，代謝及び排泄の評価は，主として非臨床毒性試験に使用し

たラット及びイヌを用い，一部の試験では，薬効薬理で使用したマウスを用いて評価した。投与経路としては，臨床投与経路に準じて経口投与を選択した。なお，バイオアベイラビリティ算出などを目的として，一部の試験ではエヌトレクチニブの静脈内投与を実施した。エヌトレクチニブ及び活性代謝物 M5（脱メチル体）のヒトにおける血漿蛋白結合，代謝並びに薬物相互作用はヒト由来試料を用いて *in vitro* で評価した。生体試料中のエヌトレクチニブ及び M5の測定のため，液体クロマトグラフィータンデム型質量分析（LC-MS/MS）法を開発した。バリデートした LC-MS/MS 法は GLP 準拠の毒性試験の一環である TK 試験に適用した。

単回経口及び静脈内投与並びに反復経口投与時の血漿中濃度推移をマウス，ラット及びイヌで評価した。

組織分布は，[^{14}C]エヌトレクチニブを白色ラット及び有色ラットに単回経口投与して放射能の分布を定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）で評価した。脳への移行性は単回あるいは反復投与後に採取した脳組織中の濃度を LC-MS/MS 法で測定して評価した。エヌトレクチニブ及び M5の *in vitro* 血漿蛋白結合は平衡透析法で評価した。

In vitro 代謝では，動物及びヒト肝細胞又は肝ミクロソームを用いて，生成する代謝物等を評価した。*In vivo* 代謝は[^{14}C]エヌトレクチニブを単回経口及び静脈内投与後のラットあるいはイヌの血漿及び糞中の放射能のプロファイルより確認した。尿糞中排泄は[^{14}C]エヌトレクチニブをラット及びイヌに単回経口及び静脈内投与して評価した。ヒトの循環血中で投与薬物由来物質の10%を超える代謝物，あるいは排泄物中で投与量の10%を超える代謝物に関しては構造を同定し，評価した。

代謝関与酵素はヒトチトクロム P450（CYP）あるいは UDP–グルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）発現系を用いて評価した。薬物相互作用は，CYP に対してはヒト肝ミクロソームあるいはヒト肝細胞を用いて阻害能あるいは誘導能を確認し，トランスポーターに対しては Caco-2細胞及びヒトトランスポーター発現系を用いて基質となる可能性及び阻害能を評価した。

なお，ラット胚・胎児発生毒性試験で胎児への影響が明らかなことから，エヌトレクチニブの胎児移行性の検討は不要と判断した。

2.4.2.3 毒性試験

エヌトレクチニブの毒性評価に用いた試験は，ラット及びイヌを用いた3カ月間までの反復経口投与毒性試験，*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験，ラットを用いた胚･胎児発生に関する試験と幼若ラット毒性試験であり，*in vivo* 各試験は TK 評価を含んでいる。ラット及びイヌの反復投与毒性試験では，エヌトレクチニブは，2週間投与の2サイクルで4週間と4及び13週間の連日で投与した。生殖発生毒性試験としてラットの胚･胎児発生毒性試験を実施したが，催奇形性及び胎児への影響が認められたことから，ICH S9の考え方に基づき，ウサギの胚・胎児発生毒性試験は実施しなかった。エヌトレクチニブは進行癌の患者を対象としているため，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は要求されていない（ICH S9）。一般毒性試験における血液学及び病理学的パラメータの評価において，エヌトレクチニブは免疫系に対して薬理学的性質に基づく影響を示さなかったことから，免疫毒性に関する試験は実施しなかった。また，*in vitro* 光毒性試験の結果から，*in vivo* 光毒性試験を実施した。開発中に検出されたエヌトレクチニブ原薬及び製剤中の不純物の安全性を確認するための試験（細菌を用いた変異原性試験及び反復投与毒性試験）も実施した。更に，ウサギの皮膚及び眼の刺激性試験を実施した。

使用した用量は，用量制限毒性，標的器官，及び無毒性量（NOAEL）を同定するために選択した。非臨床毒性試験に使用した動物種において，エヌトレクチニブと主要代謝物である M5の投与用量に応じた全身曝露（$AUC_{0\text{-}t}$ 及び C_{max}）の関係が明らかになった。

NOAEL 投与における動物種別，雌雄別のエヌトレクチニブの曝露及びヒト曝露の比較を表 2.4.5-1に示す。

2.4.2.4 GLP 及びガイドラインへの適合性

臨床試験をサポートするための，主要な毒性試験及び安全性薬理試験は，ICH ガイドラインに沿って設計され，米国 FDA の GLP 規制（21 CFR Part 58）又は OECD GLP 原則[C(97)186/最終]に従い，OECD のデータ相互受入制度のメンバー国において実施した。

また，追加の補足的な毒性，薬理及び薬物動態試験については，科学的かつ綿密な非 GLP 試験として実施した。

2.4.3 薬理試験

2.4.3.1 *In vitro* 薬理試験

2.4.3.1.1 キナーゼ阻害活性と *in vitro* 細胞増殖抑制活性

エヌトレクチニブは，チロシンキナーゼ，セリン-スレオニンキナーゼから成るキナーゼパネルでの試験及び標的キナーゼに対する阻害試験の結果から，受容体型チロシンキナーゼ TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に選択的な阻害剤であることが示され，各キナーゼに対する50%阻害濃度（IC_{50}）は，順に1.7，0.1，0.1，0.2及び1.6 nmol/L であった。また，エヌトレクチニブのヒトにおける主な代謝物である M5の TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に対する IC_{50}は，順に2.5，0.1，0.2，0.2及び1.9 nmol/L であった。

エヌトレクチニブは，*NTRK* 融合遺伝子を有する細胞株に作用して，増殖抑制活性を示した。各細胞株の増殖に対する IC_{50}は，*TPM3-NTRK1*融合遺伝子を有する結腸直腸癌細胞株 KM12[6)]では17 nmol/L，*MPRIP-NTRK1*融合遺伝子を有する非小細胞肺癌細胞株 CUTO-3[7)]では1.255 nmol/L，*ETV6-NTRK3*融合遺伝子を有する急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2[8)]では0.47 nmol/L であり，13種の *NTRK1/2/3*融合遺伝子を導入して作製した Ba/F3細胞では，融合パートナー遺伝子に関わらず，いずれも6 nmol/L 未満であった。また，エヌトレクチニブは，*ROS1*融合遺伝子を有する細胞株に対して増殖抑制活性を示し，*TPM3-ROS1*を有する非小細胞肺癌細胞株 CUTO-28に対する IC_{50}は20.1 nmol/L，*TEL-ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞（Ba/F3_*TEL-ROS1*）に対する IC_{50}は5 nmol/L であった。腫瘍細胞株パネルを用いた試験では，エヌトレクチニブが阻害活性を示すキナーゼの遺伝子変異（融合，増幅）が認められている細胞株に対し，エヌトレクチニブ及び代謝物 M5による選択的な増殖抑制活性が認められ，両化合物の活性はほぼ同程度であった。

2.4.3.1.2 作用機序

TRK 融合蛋白質依存的に増殖する結腸直腸癌細胞株 KM12を用いて，TRKA 及び下流のシグナル伝達分子（PLCγ，AKT 及び MAPK）のリン酸化，細胞周期に対する作用などについて評価した。また，ROS1融合蛋白質依存的に増殖する Ba/F3_*TEL-ROS1*を用いて，ROS1リン酸化に対する作用を調べた。

エヌトレクチニブは，10 nmol/L 以上の濃度で，KM12細胞における TRKA のリン酸化を完全に阻害し，同時に下流のシグナル伝達分子のリン酸化も阻害した。また，Ba/F3_*TEL-ROS1* における ROS1のリン酸化を阻害した。したがって，エヌトレクチニブによる腫瘍細胞の増殖抑制活性は，標的分子である TRK 又は ROS1融合蛋白質のリン酸化阻害活性と相関すると考えられた。また，標的キナーゼを阻害することで，シグナルの下流に位置し，腫瘍の生存と増殖を担うシグナル伝達分子のリン酸化も阻害することが明らかになった。

KM12細胞の細胞周期に対するエヌトレクチニブの作用を24～72時間培養後に解析したところ，G1期に細胞が集積するとともに，アポトーシス誘導を示す sub-G1ピーク及びカスパーゼ3/7の活性化が認められた。また，この期間における TRKA 及びその下流のシグナル伝達分子である PLCγ のリン酸化阻害が認められた。*ETV6-NTRK3*を発現する急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91においても，エヌトレクチニブによる G1期での細胞周期停止とアポトーシス誘導が示された。エヌトレクチニブの代謝物 M5について解析したところ，代謝物 M5は，

エヌトレクチニブと同様，KM12細胞の細胞周期を G1期で停止させ，アポトーシス（カスパーゼ3/7を活性化）を誘導した。

NTRK 等のドライバー癌遺伝子に依存して生存・増殖している腫瘍細胞では，エヌトレクチニブによるキナーゼ活性阻害により，生存・増殖に関わるシグナル伝達が遮断され，細胞周期進行は G1期で停止し，アポトーシスを誘導することが示された。

2.4.3.2 *In vivo* 薬理試験

2.4.3.2.1 TRK 及び ROS1融合蛋白質依存性モデルでの抗腫瘍活性

エヌトレクチニブは，TRK 又は ROS1融合蛋白質依存的に増殖するヒト腫瘍細胞株，患者由来腫瘍及び *ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞のマウス皮下移植モデルにおいて，強い腫瘍増殖抑制活性を示した。

(1) TRK 融合蛋白質依存性モデル

NTRK 融合遺伝子を有するヒト腫瘍細胞株又は患者由来腫瘍のマウス皮下移植モデルを用いて，エヌトレクチニブ投与による腫瘍増殖抑制活性を評価した（表 2.4.3.2.1-1）。これら7種の皮下移植モデルにおいて，エヌトレクチニブは用量依存的な腫瘍増殖抑制活性を示し，概ね1日1回3 mg/kg 以上の経口投与により，腫瘍の増殖を抑制し，高用量では腫瘍を退縮させた。また，エヌトレクチニブは，1日2回60 mg の経口投与であっても，マウスに対し良好な忍容性を示した。

*TPM3-NTRK1*融合遺伝子を有する結腸直腸癌細胞株 KM12のマウス皮下移植モデルを用いた試験では，エヌトレクチニブ0.3，1.5，3，15及び30 mg/kg を1日1回経口投与した。0.3 mg/kg 投与の腫瘍増殖阻害率（TGI）は19%であり，わずかな活性しか示さなかったが，1.5 mg/kg 投与では36%，3 mg/kg 投与では64%，15及び30 mg/kg 投与では，> 100%となって腫瘍の退縮が認められたことから，エヌトレクチニブによる用量依存的な腫瘍増殖抑制活性が明らかとなった。

KM12-Luc 細胞（ルシフェラーゼ遺伝子を導入した KM12細胞）を用いて，エヌトレクチニブの1日1回経口投与（0.1，1，3，10及び30 mg/kg）と1日2回経口投与（0.05，0.5，1.5，5及び15 mg/kg）による腫瘍増殖抑制活性を比較した試験では，エヌトレクチニブの1日投与量が同じ投与群間でほぼ同程度の活性を示し，いずれも用量依存的であった。1日1回1 mg/kg 未満では，活性を示さなかったが，1日1回10 mg/kg 投与及び1日2回5 mg/kg 以上の投与では腫瘍の退縮が認められ，KM12移植モデルとほぼ同様の腫瘍増殖抑制活性が認められた。

KM12-Luc 細胞のマウス皮下移植モデルを用いて，TRK 下流シグナル伝達分子（PLCγ，AKT 及び S6）のリン酸化に対する作用を調べたところ，エヌトレクチニブ1日2回5 mg/kg 以上の投与で TRK 下流シグナル分子のリン酸化を阻害した。したがって，エヌトレクチニブによる腫瘍増殖抑制活性は，TRK 下流シグナルの抑制と連関していることが示唆された。また，臨床と同様の曝露条件下で活性の発現が認められた。

*MPRIP-NTRK1*融合遺伝子を有する非小細胞肺癌細胞株 CUTO-3のマウス皮下移植モデルでは，エヌトレクチニブ0.1，0.3，1，3，10及び30 mg/kg を1日1回経口投与することで，エヌトレクチニブによる用量依存的な腫瘍増殖抑制活性が示された。本試験では，エヌトレクチニブ0.1及び0.3 mg/kg 投与での活性はわずかであったものの（TGI は順に16%及び14%），1 mg/kg 投与での TGI は37%，3，10及び30 mg/kg 投与での TGI は，いずれも> 100%であった。

*ETV6-NTRK3*融合遺伝子を有する急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91を用いて，エヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性を調べた試験では，エヌトレクチニブ3，10及び30 mg/kg を1日1回経口投与し，すべての投与量において，強い腫瘍増殖抑制活性を示した。IMS-M2細胞株移植モデルでは，いずれも投与量においても腫瘍の退縮が認められ，MO-91細胞株移植モデルでは，10及び30 mg/kg 投与で腫瘍が退縮した。両細胞株では抗腫瘍試験に合わせ，薬力学的な作用を調べる試験を実施し，エヌトレクチニブの抗腫瘍活性は，TRK の下流シグナルに

対する抑制作用（PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化抑制）と相関することを示した。更に，IMS-M2腫瘍移植モデルでは，骨髄中に浸潤して増殖するヒト CD45陽性細胞（急性骨髄性白血病細胞）が，エヌトレクチニブ投与により消失することを明らかにした。

NTRK 融合遺伝子を有する患者由来腫瘍（*ETV6-NTRK3*融合遺伝子を有する頭頸部癌 CTG-0798，*TPM3-NTRK1*融合遺伝子を有する肉腫 G002）をマウス皮下に移植し，エヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性を調べた。頭頸部癌 CTG-0798を移植したモデルでは，エヌトレクチニブ15及び60 mg/kg の1日2回経口投与により，TGI は ＞ 100%となり，腫瘍は退縮した。肉腫 G002を移植したモデルでは，1 mg/kg 投与の TGI は22%であったが，3 mg/kg 投与の TGI は84%であり，10及び30 mg/kg 投与では腫瘍退縮が認められた。

表 2.4.3.2.1-1 マウス皮下移植モデルにおけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性 -*NTRK* 融合遺伝子陽性細胞株

移植細胞	融合遺伝子	腫瘍増殖抑制活性（TGI） 投与量（mg/kg，経口投与，QD 又は BID）					
		0.3	3	10	15	30	60
結腸直腸癌細胞株 KM12	*TPM3-NTRK1*	19% (QD)	64% (QD)	nd	>100% (QD)	>100% (QD)	nd
結腸直腸癌細胞株 KM12-Luc	*TPM3-NTRK1*	nd	39% (QD)	>100% (QD)	>100% (BID)	>100% (QD)	nd
非小細胞肺癌細胞株 CUTO-3	*MPRIP-NTRK1*	14% (QD)	>100% (QD)	>100% (QD)	nd	>100% (QD)	nd
急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2	*ETV6-NTRK3*	nd	>100% (QD)	>100% (QD)	nd	>100% (QD)	nd
急性骨髄性白血病細胞株 MO-91	*ETV6-NTRK3*	nd	91% (QD)	>100% (QD)	nd	>100% (QD)	nd
頭頸部癌 CTG-0798 (PDX)	*ETV6-NTRK3*	nd	nd	nd	>100% (BID)	nd	>100% (BID)
肉腫 G002 (PDX)	*TPM3-NTRK1*	23% (QD)	84% (QD)	>100% (QD)	nd	>100% (QD)	nd

本表は，各試験データの抜粋であり，上記以外の投与量が設定されている場合もある。
QD：1日1回投与，BID：1日2回投与，PDX：患者由来腫瘍移植モデル，TGI：腫瘍増殖阻害率，
nd：未実施（用量未設定）

(2) ROS1融合蛋白質依存性モデル

*TEL-ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞（Ba/F3_*TEL-ROS1*）並びに患者由来非小細胞肺癌（*CD74-ROS1*を有する CTG-0848及び *SDC4-ROS1*を有する LU-01-0414）のマウス皮下移植モデルを用いて，エヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性を評価した（表 2.4.3.2.1-2）。

Ba/F3_*TEL-ROS1*移植モデルにエヌトレクチニブ60 mg/kg を1日2回10日間経口投与したところ，腫瘍の退縮が認められた。また，CTG-0848移植モデルにエヌトレクチニブを1日2回30及び60 mg/kg 経口投与した試験においても，両投与量において腫瘍の退縮が認められた。LU-01-0414移植モデルにエヌトレクチニブ1.5，5，15，45 mg/kg を1日2回経口投与した試験での TGI は，順に44%，70%，111%，113%であり，用量依存的な腫瘍増殖抑制活性が認められた。

表 2.4.3.2.1-2 マウス皮下移植モデルにおけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性 -*ROS1*融合遺伝子陽性細胞株

移植細胞	融合遺伝子	腫瘍増殖抑制活性（TGI） 投与量（mg/kg，経口投与，BID）					
		0.3	3	10	15	30	60
Ba/F3_*TEL-ROS1*	*TEL-ROS1*	nd	nd	nd	nd	nd	>100%[#] (BID)
非小細胞肺癌 CTG-0848 (PDX)	*CD74-ROS1*	nd	nd	nd	nd	>100% (BID)	>100% (BID)
非小細胞肺癌 LU-01-0414 (PDX)	*SDC4-ROS1*	nd	70%* (BID)	nd	>100% (BID)	nd	>100%[$] (BID)

本表は，各試験データの抜粋であり，上記以外の投与量が設定されている場合もある。

BID：1日2回投与，PDX：患者由来腫瘍移植モデル，TGI：腫瘍増殖阻害率，

nd：未実施（用量未設定），*：5 mg/kg 投与での TGI，[$]：45 mg/kg 投与での TGI，[#]：報告書に TGI の記載はないが，腫瘍退縮が認められていることから，TGI > 100%と表示した。

2.4.3.2.2 頭蓋内移植モデルでの抗腫瘍活性

エヌトレクチニブの中枢神経系での抗腫瘍活性を評価するため，頭蓋内移植モデルを用いた試験を実施した。

*BCAN-NTRK1*をマウス神経幹細胞に導入して神経膠腫細胞株 BNN4及び BNN2を作製し，本細胞をマウス頭蓋内に同所性移植したモデルでは，エヌトレクチニブ（50 mg/kg，1日1回14日間）の経口投与により生存期間の延長が示された。*TPM3-NTRK1*融合遺伝子を有する KM12-Luc 細胞をマウス頭蓋内に移植したモデルでは，エヌトレクチニブを経口投与することにより，頭蓋内での腫瘍増殖を用量依存的に抑制し，マウスの生存期間を延長した。エヌトレクチニブ1日2回投与では5 mg/kg 以上，1日1回投与では10 mg/kg 以上で腫瘍の増殖抑制活性が認められ，1日2回60 mg/kg 投与で最大活性を示した。また，溶媒投与群では，17日目までに全例が腫瘍死又は体重減少が20%に達し安楽死の対象になったのに対し，エヌトレクチニブ1日2回15 mg/kg 以上，又は1日1回30 mg/kg 以上では，試験終了の28日目まで全個体が生存した。本モデルを用いて，TRK の下流シグナル伝達分子（PLCγ，AKT 及び S6）のリン酸化抑制を検討し，エヌトレクチニブ5 mg/kg 以上の投与において，用量依存的な阻害が認められ，頭蓋内移植モデルにおいても TRK の下流シグナルの抑制と腫瘍増殖抑制活性との間での連関が示唆された。また，*EML4-ALK* を有する非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228をマウス頭蓋内に移植したモデルでは，エヌトレクチニブ（60及び120 mg/kg，1日2回10日間）の経口投与により頭蓋内での腫瘍増殖の抑制と生存期間の延長が認められた。

2.4.3.3 副次的薬理試験

セリンースレオニン・サブファミリーを含む多様な蛋白キナーゼに対する選択性を評価するため，293種のキナーゼから成るキナーゼパネルを用いてエヌトレクチニブのキナーゼ阻害活性を調べた。その結果，エヌトレクチニブは，100 nmol/L において6種のキナーゼ（TRKA，TRKB，TRKC，ROS1，ALK 及び TXK）のみに95％以上の阻害を示し，2種のキナーゼ（CSF1R 及び JAK2）に80%以上，4種のキナーゼ（ITK，LTK，MuSK 及び TYK2）に60%以上，18種のキナーゼに40％以上の阻害を示した。残りの256種のキナーゼにはほとんど阻害作用を示さず，TRK 等のキナーゼに選択性を示した。

89種のターゲット（受容体，イオンチャネル及びトランスポーター）へのリガンドの結合に対するエヌトレクチニブ及びその主要代謝物である M5の作用を *in vitro* で評価した。濃度は10 μmol/L に設定したが，ヒト（最高推奨臨床用量：600 mg）におけるエヌトレクチニブの非結

合型の平均 C_{max}（0.0157 µmol/L［エヌトレクチニブの蛋白結合率を99.5 %として算出］）と比較して500倍以上の濃度に相当する。その結果，エヌトレクチニブ及び／又は M5に50%以上の結合阻害活性を示したターゲットは，α_{1A}，α_{2A}，α_{2C}，CB2，D1，D2s，D3，D5，δ（DOP），GR，sigma2，OX_1，H_1，H_2，kappa (KOP)，M_1，M_4，M_5，µ (MOP)，PPAR-γ，$5\text{-}HT_{1B}$，$5\text{-}HT_{2A}$，$5\text{-}HT_{2B}$，$5\text{-}HT_{5A}$，$5\text{-}HT_6$，$5\text{-}HT_7$，sst_4，L-type カルシウムチャネル (dihydropyridine 及び verapamil sites)，カリウムチャネル（hERG），ナトリウムチャネル (site 2)，ノルエピネフリン，ドーパミン，コリン及びセロトニントランスポーターであった。更に，エヌトレクチニブ及び M5が酵素阻害活性を示したターゲットは COX2のみであった。

2.4.3.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験として，ラットを用いた中枢神経系（ラットを用いた4週間間欠投与試験［2週間 × 2サイクル］に組み込み），呼吸器系に対する試験，*in vitro* hERG アッセイ（代謝物 M5の評価を含む）及びイヌを用いた心血管テレメトリー試験を実施した。

安全性薬理の主要な試験は ICH ガイドライン（ICH S7A/B）に準拠して実施した。これらの試験の無影響量（NOEL）投与時の曝露と最高推奨臨床用量（MRHD，600 mg）投与時の曝露との比較を表 2.4.3.4-1 に示す。

表 2.4.3.4-1 エヌトレクチニブの安全性薬理試験とヒト臨床用量との曝露マージン

In Vitro 試験					
	濃度（µmol/L）			MRHD における C_{max} とのマージン [a]	
hERG アッセイ IC_{50}	エヌトレクチニブ：0.6			エヌトレクチニブ：38	
In Vivo 試験					
	投与量 (mg/kg)	C_{max} (µmol/L)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (µmol/L•h)	MRHD における C_{max} とのマージン [a]	
				C_{max}	AUC
NOEL イヌ CV （単回）	120	3.96 [b]	50.7 [b]	1.3	1.1
NOEL ラット CNS（単回）	200	4.60 [c]	86.7 [c]	1.5	1.8
NOEL ラット呼吸器系（単回）	200	4.60 [c]	86.7 [c]	1.5	1.8

CNS: 中枢神経系，CV: 心血管系，hERG: ヒト ether-a-go-go-関連遺伝子, IC_{50}: 50%阻害濃度，MRHD:最高推奨臨床用量，NOEL: 無影響量，

[a] 最高推奨臨床用量（600 mg/body）投与時曝露（C_{max} 3.13 µmol/L 及び AUC 48.0 µmol/L•h）とのマージン（hERG アッセイにおける非結合型から血漿中 Total 量への換算は，エヌトレクチニブの蛋白結合率を99.5%として算出した）

[b] イヌを用いた4週間間欠投与試験成績から（day 1 雌雄平均値）

[c] ラットを用いた4週間間欠投与試験成績から（day 1 雌データ）

2.4.3.4.1 中枢神経系

ラットを用いた4週間間欠投与毒性試験（2週間 × 2サイクル）において，1群あたり雌5例を用いて，最初の投与サイクルにおける投与初日と最終日（14日目）に Irwin 変法（一般行動観察）及び体温測定を行った。投与初日には一般行動に変化はみられなかったが，反復投与14日目の投与3 時間後には，200 mg/kg/日のすべての動物で異常歩行が認められた。単回投与による NOEL は200 mg/kg（投与初日 C_{max} = 4.60 µmol/L），14日間反復投与による NOEL は100 mg/kg（42日目 C_{max} = 6.44 µmol/L）であった。

Irwin 変法で得られた反復投与による中枢神経系での NOEL である100 mg/kg/日は，1日1回連日投与のラット4週間反復投与毒性試験における中枢神経系での NOEL と一致しており，100 mg/kg/日以下の連投では中枢神経系への影響はみられなかった。安全性薬理試験の一環として実施はしていないが，イヌの反復投与では，60 mg/kg/日以上で中枢神経系への影響（よろめき歩行，後肢の協調運動障害，活動性低下等）が認められた。

2.4.3.4.2 心血管系

エヌトレクチニブは，*in vitro* で hERG テール電流を0.6 µmol/L（非結合型濃度）の IC_{50}濃度で阻害したが，この濃度は，ヒト血中トータル薬物濃度120 µmol/L に相当し（蛋白結合率を99.5%として算出），MRHD における C_{max}（3.13 µmol/L）の38倍であった。

代謝物 M5の hERG アッセイの IC_{50}濃度は10.4 µmol/L であり，心血管系へのリスクは無いと判断した。

非 GLP で実施したイヌを用いた心血管テレメトリー試験では，エヌトレクチニブを300 mg/kg まで単回投与したが，ECG を含む心血管パラメータに影響は認められなかった（イヌを用いた単回経口投与毒性試験 300 mg/kg 単回投与時の雌雄平均 C_{max} = 2.06 µmol/L）。また，GLP で実施したイヌ心血管テレメトリー試験（120 mg/kg まで単回投与, C_{max} = 3.96 µmol/L［イヌ4週間間欠投与試験の初回投与の雌雄平均］）でも影響は認められなかった。

しかし，イヌを用いた反復投与毒性試験（CTD 2.4.5.2.6参照）では QT 及び QTc 間隔の延長が認められた。イヌを用いた14日間用量設定試験では，240 mg/kg/日を投与した2例の雌で，投与前と比較して平均 +65及び +87 msec の QT 及び QTc 間隔の延長が認められた。4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）では，120 mg/kg/日の用量（C_{max}：雌雄それぞれ7.52及び7.43 µmol/L）で，中程度の QT 及び QTc 間隔の延長が認められた。なお，イヌを用いた4週間連日投与試験の15 mg/kg/日以上を投与した雌で軽度の QT 及び QTc 間隔の延長（10%以下の変化で有害ではない）がみられたが，30 mg/kg/日までの投与用量で実施した13週間試験では QT 及び QTc 間隔の延長は認められなかった。

2.4.3.4.3 呼吸器系

ラット（雌8例/用量）にエヌトレクチニブ 0，50，100 又は200 mg/kg を単回経口投与し，呼吸機能に及ぼす影響を評価した。全身プレチスモグラフィーを用いて呼吸パラメータを収集した。いずれの投与量においても呼吸パラメータに影響はみられず，NOEL は200 mg/kg であった。

2.4.4 薬物動態試験

エヌトレクチニブの吸収，分布，代謝及び排泄の評価は，マウス，ラット及びイヌを用いて実施した。主要な投与経路としては，臨床投与経路に準じて経口投与を選択した。TK はすべての反復投与試験で実施した。なお，*in vivo* 遺伝毒性試験，生殖発生毒性試験の TK の評価結果は2.6.6及び2.6.7に記載した。

2.4.4.1 分析法

ラット及びイヌでの TK 試験における血漿中濃度測定には，バリデートした LC-MS/MS 法を使用した。マウス，ラット及びイヌでの初期及び各種検討の PK 試験においては，主にバリデートしていない LC-MS/MS 法を用いて，血漿中及び脳組織中濃度を測定した。更に，ラット及びイヌのマスバランス試験において，血液，血漿，尿及び糞中の放射能を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。用いた測定法はそれぞれの試験報告書に記載している。

2.4.4.2 吸収

エヌトレクチニブあるいは[^{14}C] エヌトレクチニブをマウス（10及び100 mg/kg），ラット（10，20 及び30 mg/kg）及びイヌ（10及び60 mg/kg）に単回経口投与後，エヌトレクチニブはいずれの動物種においても多くの投与群で投与後3時間前後に最高血漿中濃度（C_{max}）に達し，終末相における消失半減期（$t_{1/2}$）は2～4時間であった。エヌトレクチニブの経口投与後の吸収は比較的良好であり，バイオアベイラビリティは31～76%の範囲にあった。エヌトレク

チニブ 10 mg/kg の単回静脈内投与試験において，全身クリアランスは肝血流量に対してマウス，ラット及びイヌでそれぞれ約0.15倍，0.3～0.4倍及び0.55倍であったことから，エヌトレクチニブのクリアランスはマウスでは小さく，ラット及びイヌでは中程度であることが示唆された。

マウス，ラット及びイヌの反復経口投与において，全身曝露量は概ね用量に比例して増加した。ラット及びイヌにおいて最長で3カ月間（13週間）の反復投与により，エヌトレクチニブの曝露量（AUC）の軽度な上昇（多くの投与群で約2倍以内）がみられた。ラットでのエヌトレクチニブの曝露量は，雌のほうが雄よりも2倍以内の高値を示したが，イヌではエヌトレクチニブの曝露量に明らかな性差は認められなかった。これらの反復投与試験において，M5の曝露量はエヌトレクチニブとの AUC 比でマウスでは約0.1，ラットでは0.13以下及びイヌでは1～3であり，M5がイヌ循環血中の主要な代謝物であることが示唆された。

13週間の幼若ラットの反復経口投与において，初回投与である出生後7日ではエヌトレクチニブの曝露量は概ね用量比例的に増加した。成熟に伴うクリアランスの上昇により，出生後97日では出生後7日と比較してエヌトレクチニブ及び M5の曝露量の低下が認められた。エヌトレクチニブに対する M5の AUC 比は成熟ラットと同程度であった。

2.4.4.3 分布

2.4.4.3.1 血漿蛋白結合及び血球移行性

エヌトレクチニブ及び M5の *in vitro* 血漿蛋白結合率を平衡透析法で評価した。ヒト血漿では，エヌトレクチニブ及び M5の非結合型分率（fu）は濃度によらず1%未満であり，動物血漿においてもほぼ同様な値を示した。また，ヒト全血を用いた *in vitro* 試験において，エヌトレクチニブ及び M5の血液/血漿分配比はそれぞれ1.3及び1.0であり，いずれも血球への移行性が示唆された。

2.4.4.3.2 組織分布

白色ラット又は有色ラットを用いた[^{14}C]エヌトレクチニブ（20 mg/kg）単回経口投与 QWBA 試験では，メラニン含有組織を除き，いずれの系統のラットにおいても放射能は広く同程度に組織に分布した。放射能は，ほとんどの組織で投与後8時間以内に C_{max} に達したのち緩徐に低下し，評価した組織の半数程度で投与後72時間まで確認された。有色ラットではメラニン含有組織，特に眼のブドウ膜で放射能が著しく高く，エヌトレクチニブ由来物質とメラニンの結合性が示唆されたが，放射能が緩やかに低下したことから，メラニン含有組織への移行は可逆的であることが推察された。本 QWBA 試験では検出感度（179 ng eq/g，0.32 µmol/L）が低いため脳組織に放射能が認められなかったが，2.4.4.3.3に示すようにエヌトレクチニブを単回あるいは反復経口投与した際の脳組織を LC-MS/MS 法で測定した場合には，脳組織にエヌトレクチニブが検出された。

2.4.4.3.3 脳への移行性

ラットにエヌトレクチニブ（20 mg/kg）を単回経口投与した際のエヌトレクチニブ及び M5の脳組織中 C_{max} はそれぞれ0.15 µmol/L 及び0.0084 µmol/L，また，脳／血漿 AUC 比はそれぞれ0.219及び0.315であったことより，エヌトレクチニブ及び M5が脳組織に移行することが認められた。マウス2週間連日投与試験，ラット4週間間欠投与試験及びイヌ4週間間欠投与試験において，定常状態である反復最終投与後24時間で採取した脳組織中エヌトレクチニブの脳／血漿濃度比は，それぞれ0.38~0.43，0.57~1.1及び 1.4~2.2であった。更に，エヌトレクチニブをラットに点滴持続静脈内投与した試験では，定常状態には到達していないものの，点滴開始後6時間でエヌトレクチニブの脳組織中／血漿中濃度比は0.6に達しており，その際の血漿中濃度は約1.4 µmol/L であった。確認された脳脊髄液（CSF）中エヌトレクチニブ濃度及び予想され

る脳組織の非結合型濃度は1~3 nmol/L の範囲であり，これは目標とするエヌトレクチニブの TRK 及び ROS1に対する IC_{50}値（2.4.3.1.1）を超えるものであった。

2.4.4.4 代謝

ヒト及び動物の肝細胞あるいは肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験では，エヌトレクチニブは穏やかに代謝され，酸化的代謝物，脱メチル体及び N–グルクロン酸抱合体の生成が確認された。ヒト血漿中の主要代謝物である M5及び M11はそれぞれエヌトレクチニブの N–脱メチル体及び N–グルクロン酸抱合体である。ヒト排泄物中に M1，M2及び M5が投与量の10%以上検出されたが，M1及び M2はヒト血漿中には確認されなかった。M11を除き，ヒト試料で確認された主要代謝物は毒性試験の動物種であるラット及びイヌでも確認された。エヌトレクチニブ経口投与後の主要代謝物は，ラット血漿中及び糞中でそれぞれラット特異的な N–グルクロン酸抱合体である M12及び M5であり，イヌではともに M5であった。ヒト肝細胞を用いた検討では，M5の固有クリアランスはエヌトレクチニブの約1/2であった。

発現系ヒト CYP を用いた *in vitro* 試験より，ヒトでのエヌトレクチニブの代謝において主要な役割を果たすとともに，M5の生成に主として関与する代謝酵素は CYP3A4であること，また，CYP3A4の他にも多くの CYP 分子種（1A1，1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，2E1及び CYP3A5）が，エヌトレクチニブの代謝に関与していることが示唆された。更に，発現系 UGT を用いた *in vitro* 試験より，M11の生成には UGT1A4が関与することが示唆された。

2.4.4.5 排泄

ラット及びイヌにおける[^{14}C]エヌトレクチニブ単回経口及び静脈内投与後の放射能の尿糞中排泄より，エヌトレクチニブは吸収後，エヌトレクチニブ及び代謝物としてそのほとんどが糞中に排泄されること，並びにそれらの体内からの消失に腎排泄の寄与は小さいことが示唆された。

2.4.4.6 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験より，CYP3A4がエヌトレクチニブの主要代謝関与酵素であること，また M5の生成への関与が示唆されたことから，CYP3A の強い阻害剤あるいは誘導剤がエヌトレクチニブの曝露量に影響を与える可能性がある。また，*In vitro* 試験より，エヌトレクチニブは CYP3A4を阻害する可能性があること，及び CYP3A4を誘導する可能性があることが示唆された。なお，他の CYP 分子種に対して，エヌトレクチニブ及び M5は臨床での血漿中濃度を考慮すると阻害能を示さないと考えられた。

In vitro 試験において，エヌトレクチニブはヒト及びげっ歯類の P-糖蛋白（P-gp）の基質としては弱く，これがエヌトレクチニブの脳移行性の一因である可能性が示唆された。一方，M5は P-gp 及び乳癌耐性蛋白（BCRP）の基質であると考えられた。また，エヌトレクチニブの投与により，P-gp，BCRP ，有機アニオン輸送ポリペプチド1B1（OATP1B1）並びに multidrug and toxin extrusion 1（MATE1）による輸送が阻害される可能性が示唆された。

臨床薬物相互作用試験として，itraconazol（CYP3A4阻害薬）及び riphampicin（CYP3A4誘導薬）との併用によるエヌトレクチニブの薬物動態への影響，midazolam（CYP3A4基質）との併用による midazolam の薬物動態への影響，digoxin（P-gp 基質）との併用による digoxin の薬物動態への影響が評価されている（2.7.2.2.2.2）。

2.4.5 毒性試験

エヌトレクチニブは，GLP 及び ICH ガイドラインに準拠した反復投与毒性，遺伝毒性，生殖発生及び発達に対する影響，並びに光毒性試験を含む包括的毒性プログラムにより評価した。不純物の遺伝毒性ポテンシャルを評価するために *in silico* 評価及び細菌を用いた復帰突然変異

試験を実施した。また，開発中に検出された不純物の評価のために当該不純物のラット4週間試験を実施した。

NOAEL 又は MTD における曝露及び最高推奨臨床用量（MRHD，600 mg）投与時の曝露との比較を表 2.4.5-1に示した。

表 2.4.5-1 エヌトレクチニブの反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験とヒト臨床用量との曝露マージン

動物種	試験の種類	NOEL/NOAEL 又は MTD (mg/kg/日)	C_{max} [a] (μmol/L)	AUC [a] (μmol/L•h)	ヒト臨床用量との曝露マージン [b]	
					C_{max}	AUC
反復投与毒性						
ラット	4週間の間欠投与（2週間サイクル×2回）	MTD: 100	3.46 (雄) 6.44 (雌)	54.0 (雄) 111 (雌)	1.1 (雄) 2.1 (雌)	1.1 (雄) 2.3 (雌)
	4週間連日投与	NOAEL: < 25	< 1.17 (雄) < 1.51 (雌)	< 11.3 (雄) < 18.4 (雌)	< 0.4 (雄) < 0.5 (雌)	< 0.2 (雄) < 0.4 (雌)
	3カ月間連日投与	NOAEL: 7.5	0.631 (雄) 0.629 (雌)	5.98 (雄) 6.71 (雌)	0.2 (雄) 0.2 (雌)	0.1 (雄) 0.1 (雌)
イヌ	4週間の間欠投与（2週間サイクル×2回）	MTD: 60	2.98(雌雄)	37.6(雌雄)	1.0 (雌雄)	0.8(雌雄)
	4週間連日投与	NOAEL: < 15	< 0.384 (雌雄)	< 2.60 (雌雄)	< 0.1 (雌雄)	< 0.1 (雌雄)
	3カ月間連日投与	NOAEL: <7.5	< 0.251 (雌雄)	< 1.87 (雌雄)	< 0.1 (雌雄)	< 0.04 (雌雄)
生殖発生及び発達に対する影響						
ラット	胚・胎児発生	NOAEL: 12.5	0.82	10.2	0.3	0.2
ラット	13週間幼若毒性	NOAEL: < 4	< 0.343 (雌雄)	< 2.66 (雌雄)	< 0.1 (雌雄)	< 0.1 (雌雄)
		MTD: 8	0.763 (雌雄)	6.93 (雌雄)	0.2 (雌雄)	0.1 (雌雄)

MRHD：最高推奨臨床用量，NOAEL：無毒性量，MTD：最大耐量

[a] 定常状態における C_{max} ， $AUC_{0\text{-}24h}$ の平均値

[b] MRHD （600 mg）における C_{max} の平均値：3.13 μmol/L ， AUC の平均値：48.0 μmol/L•h （RXDX-101-01試験の F2A 製剤投与群から算出）

2.4.5.1 急性毒性

ラット及びイヌを用いた単回経口投与毒性試験において，概略の致死量はそれぞれ，240及び300 mg/kg（各試験の最高投与量）を超えていた。マウスでは，14日間投与試験の結果（CTD2.6.6.3.1参照）から，240 mg/kg（本試験の最高投与量）を超えると考えられた。

2.4.5.2 反復投与毒性

ラット及びイヌを用いた3カ月間までの反復経口投与毒性試験を実施し，エヌトレクチニブに関連した影響，及び回復性評価を行った。エヌトレクチニブを14日間，4週間又は13週間連日投与並びに2週間サイクル × 2回（計4週間）を間欠投与した。最大耐量（MTD）及び MTD を超える用量の投与により評価するとともに，4週間及び13週間試験では NOAEL を同定した（表 2.4.5-1参照）。更に，マウスの14日間探索的試験を実施した。 また，中枢神経系及び QT 延長に関する探索的試験として，イヌ7日間試験を実施した。

ラットでは，14日間試験の400 mg/kg/日群において8日目に， 4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）の200 mg/kg/日群において15日目に死亡が認められた。400 mg/kg/日では，呼吸困難，活動性低下及び協調運動障害といった症状に加えて，肝細胞壊死並びに造血・造リンパ系

におけるリンパ球枯渇が死因と考えられた。4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）の200 mg/kg/日では，死亡は採血中に起こり，一般状態の悪化によると考えられた。また，4週間連日投与試験の100 mg/kg/日群及び13週間投与試験の15及び30 mg/kg/日群では，用量制限毒性である皮膚病変のため，投与期間終了前に安楽死処置した。

イヌでは，中枢神経系に対する影響が4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）の120 mg/kg/日の雌で認められ，早期安楽死又は死亡の原因と考えられた。4週間連日投与試験の60 mg/kg/日群で9日目に起こった死亡については，消化管毒性が死因と考えられた。

エヌトレクチニブの主要な毒性が，ラット及びイヌにおいて，中枢神経系，皮膚，血液系及び肝臓に認められた。イヌでは，消化管毒性並びにQT及び補正QT（QTc）間隔の延長も認められた。これらの影響は用量及び投与期間依存性であり，休薬により回復性を示した。主な所見を以下に要約する（臨床用量との曝露マージンは表 2.4.5.8-1 参照）。

2.4.5.2.1 中枢神経系への影響

反復投与により，MTD を超える用量（ラットでは200 mg/kg/日以上及びイヌでは60 mg/kg/日以上）で，協調運動障害，活動性低下及び異常歩行（ラット），並びに協調運動障害，よろめき歩行，異常歩行，振戦，活動性低下及び抑うつ（イヌ）といった一般症状が観察された。これらの所見は回復性を示した。中枢への影響は，4週連日投与試験の100 mg/kg/日以下（ラット）及び45 mg/kg/日以下（イヌ）では認められず，13週試験ではラット及びイヌともに最高投与量である30 mg/kg/日まで認められなかった。

中枢神経系への影響は，モニター可能であり，用量，期間及び全身曝露に関連していた。中枢神経系症状は脳内エヌトレクチニブの検出と関連付けられたが（最終投与後24時間における脳組織中 − 血漿中本薬濃度比は， 4週間間欠投与試験［2週間×2サイクル］のラット及びイヌでそれぞれ0.57～1.1及び1.4～2.2［CTD2.4.4.3.3参照］），いずれの動物種においても脳に病理組織学的変化は認められなかった。

TRK ファミリーが成長過程及び成人脳において重要な役割を持つことを考えると，中枢神経系に対する影響は，エヌトレクチニブの薬理学的作用に関連すると考えられた。エヌトレクチニブの臨床試験では，神経学的有害作用が患者で報告されている。

2.4.5.2.2 皮膚への影響

皮膚の変化は病理組織学的変化を伴い，ラット及びイヌでみられ，ラットでは用量制限毒性となり，投与中断や早期安楽死処置に至った。ラットでは7.5 mg/kg/日以上で認められ，頭，肩及び／又は頸部における痂皮及び潰瘍性皮膚炎で特徴付けられ，病理組織学的には表皮肥厚，びらん／潰瘍，表皮表面の滲出液，血清細胞性クラスト，出血及び／又は混合細胞型炎症が観察された。イヌでは，四肢及び眼瞼に皮膚病変が認められたが，ラットの病変と比較して重症度は低かった。病理組織学的には，7.5 mg/kg/日以上でびらん／潰瘍，表皮肥厚及び／又は皮膚の混合細胞型炎症がみられた。関連する臨床病理学的変化として，炎症反応を示唆する変化（血中白血球数［白血球，単球及び好中球］の軽微から軽度の増加，赤血球系パラメータの減少，フィブリノゲン及びグロブリン濃度の増加，並びにアルブミン：グロブリン比の減少）がみられた。

ラット及びイヌで観察された皮膚病変は，エヌトレクチニブの薬理学的作用である TRK 阻害に関連している可能性がある。TRK 欠損（-/-）マウスでは，TRK 阻害による知覚欠如に起因する全身性の皮膚病変（斑状の被毛及び痂皮）が報告されている[9)]。

2.4.5.2.3 血液系への影響

ラット及びイヌで白血球の増加及び赤血球系パラメータの減少を含む血液系への影響が認められた。病理組織学的には，脾臓及び肝臓における髄外造血の亢進及び骨髄の変化が関連して

認められた。これらの変化は軽微から軽度で，用量依存性があり，重篤な変化にはならず，回復性を示した。皮膚の炎症及び／又は消化管の炎症（イヌ）に対する二次的反応と考えられたが，エヌトレクチニブによる骨髄に対する直接的な影響も否定できない。

ラット：血液学的変化が，14日間並びに4週間間欠及び連日投与毒性試験のすべての用量でみられた。13週間試験では，15 mg/kg/日以上で赤血球量（赤血球数，ヘモグロビン濃度及び／又はヘマトクリット）及び MCHC の軽微な減少，MCV 及び MCH の軽微な増加，網状赤血球の軽度から中等度の増加，白血球数（白血球，単球及び好中球）の軽微から軽度の増加並びに軽微な血小板数の増加がみられた。病理組織学的には，脾臓の髄外造血亢進及び骨髄の細胞数増加に関連付けられた。リンパ球枯渇が4週間連日投与試験の25 mg/kg/日以上で脾臓に，4週間間欠投与（2週間 × 2サイクル）の50 mg/kg/日以上で脾臓及びリンパ節に，14日間試験の200 mg/kg/日以上で脾臓，リンパ節及び胸腺にみられた。また，骨髄の細胞数減少が14日間試験の200 mg/kg/日以上で観察された。

イヌ：血液学的変化が，反復投与毒性試験のすべての用量でみられた。13週間試験では，15 mg/kg/日以上で白血球，好中球及び単球の増加が，赤血球量（赤血球数，ヘモグロビン濃度及び／又はヘマトクリット）の減少とともに認められた。病理組織学的には，30 mg/kg/日以上で肝臓及び脾臓における軽微から中等度の髄外造血亢進及び色素沈着マクロファージの増加，脾臓における軽度から重度のうっ血が観察された。4週間間欠投与試験の120 mg/kg/日の死亡例では，脾臓のリンパ球枯渇及び骨髄の細胞数減少がみられた。

2.4.5.2.4 肝臓への影響

肝トランスアミナーゼ活性，総ビリルビン及び肝重量の増加がラット及びイヌで認められ，MTD を超える用量では病理組織学的所見（肝細胞及び胆管上皮の空胞化並びに肝細胞壊死）を伴った。ラットでは，用量依存性の ALT 及び AST の増加が50 mg/kg/日以上で認められた。これらのトランスアミナーゼの増加は，雌雄ともに200 mg/kg/日以上における壊死／単細胞壊死を伴う肝細胞空胞化の発現率の増加に関連付けられた。ビリルビンの増加は軽微から軽度であり用量依存性が明らかでなかったが，肝臓の胆管上皮における軽微から中等度の空胞化に関連付けられた。イヌでは，ALT の中等度から重度の増加（4.3～29倍）並びに AST，ALP，γ-GTP 及び総ビリルビンの軽微から重度の増加（2～16倍）が，120 mg/kg/日の10又は11日間投与後にみられた。ALT の増加（2.4倍まで）が，60 mg/kg/日の14日間投与後にみられた。肝臓の病理組織学的所見として，30 mg/kg/日以上において色素沈着マクロファージの増加及び髄外造血の亢進，並びに60 mg/kg/日以上のおいて軽微から軽度の肝細胞壊死がみられた。肝重量の増加が，4週間連日投与試験の60/45及び30 mg/kg/日の雌雄並びに13週間試験の30 mg/kg/日の雄に認められたが，病理組織学的所見を伴わなかった。

2.4.5.2.5 消化管への影響

エヌトレクチニブの消化管に対する影響がイヌで認められた。嘔吐，下痢並びに体重及び摂餌量の減少が，14日間，4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）並びに4及び13週間試験の30 mg/kg/日以上において認められ，投与量の減量や投与中止の原因となった。病理組織学的には，肛門扁平上皮のびらん／潰瘍及び／又は直腸への好中球浸潤が15 mg/kg/日以上でみられた。

2.4.5.2.6 QT 及び QTc 間隔の延長

hERG データ（IC_{50}：0.6 µmol/L）から，QT 延長ポテンシャルとヒト（MRHD 600 mg）における非結合型の平均 C_{max}（0.0157 µmol/L［エヌトレクチニブの蛋白結合率を99.5 %として算出］）との間には38倍の乖離があった。

テレメトリー装着イヌにおいて，エヌトレクチニブ300 mg/kg 単回投与まで ECG 間隔も含め

た心血管系パラメータに影響を与えなかった。反復投与毒性試験におけるすべての心血管系評価は，単一測定時点に拘束下でマルチ誘導 ECG 測定により実施した。7日間探索的試験（80及び120 mg/kg/日，雌4例／群）では，120 mg/kg/日の1例で8及び9日目に QT 及び QTc 間隔の中等度の延長が認められた（投与7日における C_{max} は7.08 µmol/L）。11日目には，QT 及び QTc 間隔に対する影響は認められなかった。14日間試験において，QT 及び QTc 間隔の延長が240 mg/kg/日の2例の雌に認められた（投与前値と比較して平均してそれぞれ+65及び+87 msec の変化；8日目に測定）。4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）において，QT 及び QTc 間隔の延長が120 mg/kg/日（C_{max}：雌雄それぞれ7.52及び7.43 µmol/L）に認められた（雌は10日目及び雄は11日目に測定）。なお，4週間連日投与試験の15 mg/kg/日以上の雌において，QT 及び QTc 間隔の軽度延長（15，30及び60/45 mg/kg/日でそれぞれ+10，+23及び+22 msec）が認められたが（25日目に測定），これらの雌の変化は生理学的に重要ではあるものの，軽度であり，有害な変化ではないと判断された。13週間試験では，雌雄ともに30 mg/kg/日まで QT 及び QTc 間隔の変化は認められなかった（40及び90日目に測定）。

2.4.5.2.7 角膜への影響

後述する有色ラットを用いた光毒性試験（CTD 2.4.5.7.1参照）において，角膜固有質における好中球浸潤及び角膜上皮の単細胞壊死から成る病理組織学的所見が UVR 有り条件下の100 mg/kg/日及び UVR 有り及び無し条件下の200 mg/kg/日に認められ，エヌトレクチニブに関連する角膜への影響が示唆された。これらの所見は，8-MOP 投与ラットで示されたような生体異物誘発性の光眼毒性による病理組織学的変化とは異なっていたことから，光毒性を示唆するものではないと考えられた。なお，アルビノ SD ラット及びビーグル犬を用いた一般毒性試験では，角膜又は眼の病理組織学的所見はみられなかった。注目すべきは，眼科検査において，ラット4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）の100 mg/kg/日以上で片側又は両側性の角膜混濁領域が，4週間連日投与試験の50 mg/kg/日の3例に角膜の剥離／白色沈着物が観察された。しかし，関連する病理組織学的所見は認められず，エヌトレクチニブとは関連しない，又は毒性学的意義が低い変化と考えられた。

2.4.5.2.8 その他の影響

ラットでは，腎臓（400 mg/kg/日における尿素の増加及び病理組織学的所見として腎皮質尿細管上皮細胞の空胞化），顎下腺（100 mg/kg/日以上における腺房細胞のアポトーシス及び腺房肥大）及び切歯（100 mg/kg/日における退色）にも影響が認められた。これらの変化は，ラットの高用量のみに認められ，ヒト臨床用量に相当する曝露ではより長期間の投与も含めて認められなかったことから，本臨床投与レジメンにおいては，ヒトへの外挿性は低いと考えられた。エヌトレクチニブは，13週間試験の雄ラットに摂餌量の増加を伴う体重増加量の軽微な増加をもたらした。

また，ラットではリン脂質症に関連する可能性がある変化（200 mg/kg/日における脾臓，腸間膜及び下顎リンパ節，肝臓，並びに歯周組織で軽微から中等度の泡沫マクロファージの蓄積，200 mg/kg/日以上における肝細胞の空胞化，400 mg/kg/日における腎皮質尿細管上皮の空胞化）が認められたが，ヒト臨床用量に相当する曝露ではより長期間の投与も含めてこれらの所見は認められなかったことから，今回の投与レジメンでは，ヒトへの外挿性は低いと考えられた。

イヌの各試験において，誤嚥性肺炎の発現頻度の増加が対照群を含めて，投与用量に依存して認められた。高用量群（60 mg/kg/日以上）では，中枢神経症状が発現していることから，嚥下障害の可能性が示唆された。一方，低用量群あるいは対照群でも変化はみられていることから，中枢神経症状以外にも，カテーテル挿入による刺激性，嘔吐，薬液の胃からの逆流，あるいは長期の投与期間によるそれらの頻度上昇の可能性などにより，誤嚥性肺炎が発現したと思われる。

2.4.5.3 遺伝毒性

GLP 適用の細菌を用いた復帰突然変異試験，GLP 非適用の *in vitro* 小核試験，GLP 適用の *in vitro* 小核及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）試験並びに GLP 適用のラットを用いた *in vivo* 小核及びコメット試験を含む標準的な遺伝毒性バッテリー試験を実施した。

エヌトレクチニブは，細菌を用いた復帰突然変異試験で陰性であり，GLP 非適用のヒト末梢血リンパ球を用いた小核試験で明らかな小核増加を誘発しなかった。GLP 適用の *in vitro* 小核試験では，代謝活性化系（S9）非存在下24時間処理群で小核を誘発したために陽性となった。しかしながら，引き続き実施した FISH 解析では小核は主に異数性誘発メカニズムによることが示唆された。ラットを用いた *in vivo* 小核及びコメット試験では，2000 mg/kg/日の用量まで3日間投与した際，肝細胞での反応は陰性（DNA 非損傷性）であった。溶媒対照群と比較したとき，エヌトレクチニブを投与したラットからのいずれの標本においても，% Tail DNA に有意な増加は認められなかった。*in vivo* 小核試験においては，溶媒対照群と比較して，エヌトレクチニブは，骨髄中に小核を有する多染性赤血球を有意に増加させることはなかった。

エヌトレクチニブは，変異原性及び染色体構造異常誘発性を示さなかった。In vitro 小核試験においては，異数性誘発能を示したが，in vivo 小核試験は陰性であった。

2.4.5.4 がん原性

エヌトレクチニブは，進行がん患者の治療を意図した抗がん剤であることから，ICH S9ガイドラインに沿って，がん原性試験は実施していない。

2.4.5.5 生殖発生毒性

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験では，雌雄生殖器に投薬による病理組織学的変化は認められなかった。

ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験では，母動物に対する毒性（体重増加量減少及び摂餌量低下）及び胎児の外表及び骨格異常の増加を含む発生毒性が200 mg/kg/日（妊娠17日の $AUC_{0\text{-}24h}$：127 μmol/L•h）でみられた。胎児体重の減少が50 mg/kg/日（妊娠17日の $AUC_{0\text{-}24h}$：41.5 μmol/L•h）でみられた。胚･胎児発生毒性に関する NOAEL は12.5 mg/kg/日（妊娠17日の $AUC_{0\text{-}24h}$: 10.2 μmol/L•h）であった。

エヌトレクチニブは進行癌の患者を対象としているため，受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験及び出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は要求されていない（ICH S9）。また，ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験において，明らかな影響が認められたため，非げっ歯類での2種目の動物を用いた試験は実施しなかった。

2.4.5.6 新生児を用いた試験

エヌトレクチニブの発達に対する影響を幼若ラットを用いた毒性試験によって評価した。ラットは出生後7日（ヒトの新生児に相当）から投与を開始し，6日間忍容性試験，4週間用量設定試験の後，4週間の休薬期間を加えた13週間試験（出生後7から97日［ヒトの新生児から16歳に相当］に投与）を実施した。

血漿中薬物曝露量は，出生後7日において概ね用量比例的に増加し，出生後97日には成長に伴うクリアランスの増加を反映して中等度に減少した。出生後97日における血漿中薬物曝露量は，成熟ラットの結果と概ね同程度であった。

13週間試験において，成長遅延（体重増加抑制）が，平均摂餌量の減少に一致してすべての用量（4 mg/kg/日以上）の雌雄で認められたが，8 mg/kg/日以上では有害な作用と考えられた。雌雄の性成熟遅延が成長遅延に一致してすべての用量で認められた。大腿骨長の減少が16 mg/kg/日の投与期間及び休薬期間終了時に認められたが，病理組織学的変化は認められなかった。機能観察総合評価［FOB］のパラメータ変化が4 mg/kg/日以上，学習及び記憶への影響

（モリスの水迷路による評価）が8 mg/kg/日以上で認められた。痙攣，振戦，歩行異常及び活動性低下といった中枢神経症状が8 mg/kg/日以上で観察されたが，休薬後に概ね回復した。同様の症状が成熟ラット（200 mg/kg/日以上）でも認められている。中枢毒性は，13週間試験の16 mg/kg/日群及び4週間用量設定試験の25 mg/kg/日以上の群の死因となった。ただし，ラット及びイヌの反復投与試験と同様に，幼若ラットにおいて中枢神経系に組織学的変化は確認されなかった（幼若ラットでは詳細な神経病理組織学的評価を含む）。他に有害ではない作用として，皮膚への影響や血液系への影響（赤血球量の減少）が，成熟ラットの結果と同様に認められた。

以上より，幼若ラット試験で認められたエヌトレクチニブによる変化は成熟ラットの変化と同様であったが，特に中枢毒性が低用量でみられたことを考慮すると，幼若ラットではエヌトレクチニブによってより高い感受性で影響を受ける可能性がある。更に，体重増加抑制，摂餌量減少，大腿骨長の減少，性成熟遅延及び神経行動学的検査における反応時間の延長によって示される成長発達遅延が認められた。

2.4.5.7 その他の毒性

2.4.5.7.1 光毒性試験

BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞をエヌトレクチニブと紫外線に曝露させ *in vitro* ニュートラルレッド取込み光毒性試験を実施した（3T3 NRU PT）結果，PIF（Photoirritancy factor）とMPE（Mean photo effect）に基づきエヌトレクチニブには光毒性の可能性があることが判明した。Long-Evans 有色ラットを用いた *in vivo* 試験では，エヌトレクチニブは光毒性を有さないと結論された。しかしながら，病理組織学的検査において，角膜固有質における好中球浸潤及び角膜上皮の単細胞壊死が，UVR 有り条件下の100 mg/kg/日及び UVR 有り及び無し条件下の200 mg/kg/日で認められ，エヌトレクチニブによる影響と考えられた。

2.4.5.7.2 不純物の安全性評価

79個のエヌトレクチニブ関連不純物について，ICH ガイドライン M7（潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性［変異原性］不純物の評価及び管理ガイドライン）に準拠した2つの（Q）SAR 評価方法（専門的経験に基づくルールベースの方法及び統計ベースの方法）からなる最新版の Derek Nexus 及び Leadscope Model Applier を用いて *in silico* による変異原性評価を行った。*In silico* で陰性（クラス5）であった化合物は，非変異原性不純物と判断した。*In silico* で陽性（クラス3）であった化合物は，TTC（毒性学的懸念の閾値）アプローチ下で管理されるか，Ames アッセイによって評価された。*In silico* で陽性であった6化合物について Ames アッセイを実施した結果，陰性であったことから，非変異原性不純物と判断した。

ICH ガイドライン 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），ICH ガイドライン 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）による評価が必要となる閾値を超えた不純物は無かったが，開発中に検出された *不純物G についてはラット4週間試験を実施した。

2.4.5.8 動物からヒトへの外挿

動物試験データで認められた標的器官毒性，LOEL，血漿中薬物曝露及び MRHD との曝露マージンの一覧を表 2.4.5.8-1 に示した。

*新薬承認情報提供時に置き換え

表 2.4.5.8-1 エヌトレクチニブの *in vivo* 毒性試験における毒性，最小影響量（LOEL）とヒト臨床用量との曝露マージン

標的器官／毒性	動物種	LOEL (mg/kg/日)	曝露		ヒト臨床用量との曝露マージン[j]	
			C_{max} (μmol/L)	AUC_{0-24h} (μmol/L·h)	C_{max}	AUC
中枢神経系症状	ラット	200	5.8[a]	111[a]	1.9	2.3
	イヌ	60	3.0[b]	37.6[b]	1.0	0.8
皮膚の変化	ラット	7.5	0.6[c]	5.98[c]	0.2	0.1
	イヌ	7.5	0.3[d]	1.87[d]	0.1	0.04
血液系の変化	ラット	15	0.9[c]	10.5[c]	0.3	0.2
	イヌ	15	0.6[d]	4.22[d]	0.2	0.1
骨髄（細胞数減少）	ラット	200	4.1[e]	78.9[e]	1.3	1.6
肝臓（↑ALT/AST，臓器重量及び病理変化）	ラット	50	2.6[a]	36.3[a]	0.8	0.8
	イヌ	30	1.4[f]	9.31[f]	0.4	0.2
消化管（直腸のびらん／潰瘍）	イヌ	15	0.6[d]	4.22[d]	0.2	0.1
QTc 間隔延長	イヌ	120[k]	7.1[g]	144[g]	2.3	3.0
		15[l]	0.4[f]	2.6[f]	0.1	0.1
顎下腺（分泌物の増加）	ラット	100	4.4[h]	54.5[h]	1.4	1.1
角膜	ラット	100	4.2[i]	NA[i]	1.3	NA

[a] ラット4週間間欠投与（2週間 ×2サイクル）試験の最終日における雄の曝露を引用
[b] イヌ4週間間欠投与（2週間 ×2サイクル）試験の最終目における雌雄平均の曝露を引用
[c] ラット13週間試験の最終日における雄の曝露を引用
[d] イヌ13週間試験の最終日における雌雄平均の曝露を引用
[e] ラット14日間試験の最終日における雄の曝露を引用
[f] イヌ4週間連日投与試験の最終日における雌雄平均の曝露を引用
[g] イヌ7日間試験の7日目における曝露を引用
[h] ラット4週間連日投与試験の1日目における雄の曝露を引用
[i] *In vivo* 光毒性試験における C_{5h} を引用
[j] MRHD 600 mg における平均定常状態時の C_{max}= 3.13 μmol/L 及び AUC= 48.0 μmol/L•h （RXDX-101-01試験のF2A 製剤投与群から算出）
[k] 4週間間欠及び7日間探索試験でみられた中等度の QTc 間隔延長
[l] イヌ4週間連日投与でみられた軽度（10%以下）の QTc 間隔延長
NA=該当なし

2.4.6 総括及び結論

2.4.6.1 薬効

エヌトレクチニブは，受容体型チロシンキナーゼ TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に対し，ナノモルレベルの低濃度で阻害活性を示す選択的な阻害薬である。これらのキナーゼの融合遺伝子等に基づく様々ながん[4)]に対する薬理作用，抗腫瘍活性を評価した。

エヌトレクチニブは，マウス Ba/F3細胞に13種の *NTRK* 融合遺伝子を導入して作製した細胞株に対し，強い細胞増殖抑制活性を示し，IC_{50}は，いずれも6 nmol/L 未満であったことから，融合パートナー遺伝子の種類に関わらず，細胞増殖を抑制すると考えられた。同様に，*NTRK* 融合遺伝子を有するヒト腫瘍細胞株に対し，強い増殖抑制活性を示した。また，*ROS1*融合遺伝子を有する腫瘍細胞株及び *ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞の増殖に対して強い抑制活性を示した。このようなエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性は，TRK 及び ROS1分子のリン酸化阻害活性，並びに TRK シグナル経路下流のシグナル伝達分子（PLCγ，MAPK 及び AKT）の活性化阻害活性と相関が認められた。更に，エヌトレクチニブは，*NTRK1*融合遺伝子陽性の細胞株に作用して，細胞周期の進行を停止させ，アポトーシスを誘導した。エヌトレク

チニブのヒトにおける主な代謝物 M5は，エヌトレクチニブと同等のキナーゼ阻害活性を示し，*in vitro* での腫瘍増殖抑制活性においても同様であった。

In vivo 試験において，エヌトレクチニブは，結腸直腸癌（*NTRK1*融合遺伝子陽性），肉腫（*NTRK1*融合遺伝子陽性），非小細胞肺癌（*NTRK1*又は *ROS1*融合遺伝子陽性），頭頸部癌（*NTRK3*融合遺伝子陽性），急性骨髄性白血病（*NTRK3*融合遺伝子陽性）の5種類のがんを用いたマウス皮下移植モデルにおいて，用量依存的な腫瘍増殖抑制活性を示し，腫瘍の退縮を誘導した。また，皮下移植モデルで示された腫瘍増殖抑制活性が，エヌトレクチニブによる TRK 下流シグナルの抑制と連関していること，臨床と同様の本薬曝露条件下で活性を発現することが認められた。

中枢神経系に発生あるいは転移した腫瘍に対する活性を検討するため，*BCAN-NTRK1*融合遺伝子陽性の神経膠腫細胞株，*TPM3-NTRK1*陽性の結腸直腸癌細胞株，及び *EML4-ALK* 陽性の非小細胞肺癌細胞株を用いた頭蓋内移植モデルにて評価し，エヌトレクチニブの経口投与による頭蓋内腫瘍の増殖抑制と生存期間の延長がもたらされた。また，頭蓋内移植モデルにおいても，エヌトレクチニブによる TRK 下流シグナルの抑制と抗腫瘍効果との連関が示された。したがって，エヌトレクチニブは，TRK を阻害することにより，中枢神経系内に腫瘍を有する患者に対し治療効果を示す可能性が示唆された。

非臨床薬理試験の結果は，エヌトレクチニブの広範な *NTRK* 又は *ROS1*陽性がんに対する腫瘍増殖抑制活性を示しており，臨床において，頭蓋内腫瘍を含む様々な種類の *NTRK* 又は *ROS1*融合遺伝子陽性腫瘍に対し，有効な治療オプションになることを支持している。

2.4.6.2 薬物動態

エヌトレクチニブの薬物動態学的特徴は *in vitro* では動物及びヒト由来試料，並びにヒト CYP や UGT などの発現系で評価し，*in vivo* では主に毒性試験で用いられた動物種で評価した。

毒性を評価したいずれの動物種でもエヌトレクチニブのバイオアベイラビリティは比較的良好であった。経口投与後の曝露量はラット及びイヌいずれも概ね用量比例的な増加を示した。反復投与により曝露量の軽度な上昇（多くの投与群で約2倍以内）がみられた。反復投与試験において，活性代謝物 M5の曝露量はエヌトレクチニブとの AUC 比でマウスでは約0.1，ラットでは0.13以下及びイヌでは1～3であった。イヌではエヌトレクチニブ及び M5の曝露量に明らかな性差は認められなかったが，ラットではエヌトレクチニブの曝露量は雄より雌で高かった。投与量に応じてエヌトレクチニブの曝露量が上昇することにより，毒性試験での死亡や用量制限毒性が認められた。毒性試験で用いられた用量範囲は，標的組織での用量関連毒性の特定並びに胚・胎児発生毒性の評価に適切であった。幼若ラットでの13週間毒性試験では，出生後7日及び出生後97日でのエヌトレクチニブ並びに M5の曝露量を評価し，ラットの成熟による薬物動態の変化を確認した。

ラット（100及び200 mg/kg/日）及びイヌ（30及び60 mg/kg/日）での4週間間欠反復投与試験において，最終投与後24時間での脳組織中エヌトレクチニブ濃度は用量増加に伴い上昇した。脳／血漿中濃度比はラットで0.57～1.1，イヌで1.4～2.2であった。エヌトレクチニブをラットに点滴持続静脈内投与した試験では，点滴開始後6時間で脳組織/血漿中濃度比が0.6に達した際の血漿中濃度は約1.4 μmol/L であり，臨床で600 mg を連日投与した際の平均濃度2.0 μmol/L（RXDX-101-01試験における F2A 製剤600 mg 投与群での定常状態時 AUC 平均値 48.0 μmol/L•h /24h より算出）と同程度であった。確認された CSF 中エヌトレクチニブ濃度及び予想される脳組織の非結合型濃度は1~3 nmol/L の範囲であり，目標とする TRK 及び ROS1の IC_{50}値を上回った。このことは KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルマウスで腫瘍増殖抑制及び生存率の改善が1日1回30 mg/kg 投与（$AUC_{0\text{-}24h}$/24h として算出した平均血漿中濃度約2 μmol/L）で認められたこと（2.4.3.2.2）と一致すると考えられた。以上から，臨床相当の曝露量で，薬効が発現する量のエヌトレクチニブが脳へ移行することが示唆される。

ヒト血漿中で認められた主要代謝物は，M5（脱メチル体）及び M11（N–グルクロン酸抱合

体）であった。M5はヒト及び動物の肝細胞を用いた *in vitro* 試験及び毒性試験の動物種を用いた *in vivo* 試験において認められた。M11はヒト特異的な代謝物であるが，エヌトレクチニブは進行がんの患者を対象としているため，M11の安全性評価のための試験は実施していない（ICH S9）。M5は TRKA，TRKB，TRKC 及び ROS1に対しエヌトレクチニブと同程度のキナーゼ阻害活性を示し，*in vitro* での腫瘍増殖抑制活性においても同様であった。また，エヌトレクチニブ及び M5のヒト血漿蛋白結合率は同程度（> 99%）であり，他の動物血漿においても同様に蛋白結合率は高かった。したがって，*in vivo* の薬理効果への M5の寄与は，エヌトレクチニブに対する血漿中曝露量比をもとに推察可能と考えられる。

In vitro 試験より，エヌトレクチニブの代謝において主要な役割を果たし，M5の生成に関与するのは CYP3A4であることが示唆された。また，エヌトレクチニブの代謝には CYP3A4の他にも多くの CYP 分子種（1A1，1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，2E1及び CYP3A5）及び UGT1A4が関与することが示唆された。

エヌトレクチニブが CYP3A4を阻害する，あるいは CYP3A4を誘導する可能性があることが示唆された。midazolam 併用の臨床薬物相互作用試験では，エヌトレクチニブ投与により CYP3A4が軽度に阻害されることが確認された（2.7.2.2.2.2）。更に，トランスポーターに関しては，*in vitro* 試験よりエヌトレクチニブ及び M5が P-gp，BCRP，OATP1B1並びに MATE1を介する輸送を阻害する可能性が示唆された。しかし，P-gp 基質である digoxin 併用の臨床薬物相互作用試験では，エヌトレクチニブの P-gp に対する影響はわずかであった（2.7.2.2.2.2）。

2.4.6.3 安全性薬理及び毒性

In vitro 及び *in vivo* 単回投与心血管系安全性薬理試験では，エヌトレクチニブは臨床と同等の曝露下で心血管系作用ポテンシャルを示さなかった。ラットに単回投与した際に，エヌトレクチニブによる呼吸器系への影響は認められなかった。一方，ラットにおける反復投与では，中枢神経系に対する作用が MRHD と同等の曝露下でみられた。イヌにおける反復投与では，QTc の中等度の延長が MRHD より高い曝露下でみられ，軽度の QTc 延長（対照群に比較して+10%以内の変化）は MRHD よりも低い曝露下でみられた。

毒性試験では，ラット及びイヌを用いて MRHD より高い曝露下でエヌトレクチニブの毒性が評価され，瀕死及び用量制限毒性に至った。ラット及びイヌ共通の主要な標的臓器は，中枢神経系，皮膚，血液系及び肝臓であった。イヌでは消化管毒性及び QT／QTc 間隔の延長もみられた。一方，ラットでは角膜，切歯，唾液腺及び腎臓に病理組織学的変化がみられた。これらの変化は，用量及び曝露依存性を示し，休薬期間中に回復性を示した。エヌトレクチニブは変異原性及び *in vivo* 染色体異常を誘発しなかった。また，*in vitro* アッセイで異数性誘発メカニズムにより陽性であったが，ラットを用いた *in vivo* 小核試験では陰性であった。エヌトレクチニブは，光毒性を示さなかった。エヌトレクチニブは，生殖器に対して投与による病理学的な変化を引き起こさなかったが，器官形成期の妊娠ラットにエヌトレクチニブを投与した際に胎児毒性及び外表・骨格異常の増加が認められた。エヌトレクチニブは，幼若ラットの中枢神経系，皮膚及び血液系に影響を与え，成長発達遅延を誘発した。

中枢神経系への影響：ラット及びイヌへの反復投与により，中枢神経系への影響を示唆する一般症状（ラットにおける協調運動障害及び活動性低下，並びにイヌにおける協調運動障害，よろめき歩行，異常歩行，振戦，活動性低下及び抑うつ）が観察された。中枢神経系に対する最小影響量（LOEL）は，ラットで200 mg/kg/日（平均 C_{max} 5.8 µmol/L），イヌで60 mg/kg/日（平均 C_{max} 3.0 µmol/L）であった。エヌトレクチニブはラット及びイヌにおける脳の様々な部位で検出されたことから，中枢神経系への影響はエヌトレクチニブ投与によるものであり，TRK 受容体に対する薬理学的作用に関連する可能性が考えられた。TRK ファミリーメンバーは，成長過程及び成人の脳に高度に発現しており，TRK 由来の向神経性作用を通じて正常の中枢及び末梢神経細胞の発達及び分化に重要な役割を持つ。それらは，生体中の神経細胞の生存（又はプログラム細胞死の阻止）を制御し，機能を維持する[10)]。

皮膚への影響：痂皮及びびらん／潰瘍といった皮膚病変がラット（7.5 mg/kg/日以上）及びイヌ（7.5 mg/kg/日以上）の反復投与試験でみられ，病理組織学的には表皮肥厚，びらん／潰瘍，表皮表面の滲出液，血清細胞性クラスト，出血及び／又は混合細胞型炎症が観察された。皮膚病変は，TRK 阻害によるエヌトレクチニブの薬理学的作用に関連している可能性がある。TRK 欠損（-/-）マウスでは，TRK 阻害による知覚欠如に起因する全身性の皮膚病変（斑上の被毛及び痂皮）が報告されている[9)]。

血液系への影響：ラット及びイヌで白血球の増加及び赤血球系パラメータの減少を含む血液系への影響が認められた。病理組織学的には，脾臓及び肝臓における髄外造血の亢進及び骨髄の変化が関連して認められた。これらの変化は軽微から軽度で，用量依存性があり，重篤な変化にはならず，回復性を示した。皮膚の炎症及び／又は消化管の炎症（イヌ）に対する二次的反応と考えられたが，エヌトレクチニブによる骨髄に対する直接的な影響も否定できない。

肝臓への影響：肝トランスアミナーゼ活性，総ビリルビン及び肝重量の増加がラット（50 mg/kg/日以上）及びイヌ（30 mg/kg/日以上）で認められ，MTD を超える用量では病理組織学的所見（肝細胞及び胆管上皮の空胞化並びに肝細胞壊死）を伴った。

消化管への影響：嘔吐及び下痢がイヌ（30 mg/kg/日以上）で認められ，4及び13週試験の用量制限毒性となった。病理組織学的には，肛門扁平上皮のびらん／潰瘍及び／又は直腸の好中球浸潤が観察された。

QT 及び QTc 間隔延長：イヌの単回投与では，300 mg/kg まで心血管系パラメータに影響を与えなかった。7日間探索的試験及び4週間間欠投与試験（2週間 × 2サイクル）において，QT 及び QTc 間隔の延長が120 mg/kg/日（C_{max} の群平均：7 μmol/L 以上）に認められた。4週間連日投与試験では，雌の15 mg/kg/日以上で軽度（対照群に比較して+10%以内の変化）の QT 及び QTc 間隔の延長が認められた。

角膜への影響：有色ラットを用いた光毒性試験において，角膜固有質における好中球浸潤及び角膜上皮の単細胞壊死から成る病理組織学的所見が UVR 有り条件下の100 mg/kg/日及び UVR 有り及び無し条件下の200 mg/kg/日で認められ，エヌトレクチニブに関連する角膜への影響が示唆された。眼への影響がチロシンキナーゼ阻害作用を有する抗がん剤の非臨床及び臨床試験においてしばしば起こる副作用の一つとして報告されている[11)]。また，TRK 欠損（-/-）マウスでは，まばたき反射に影響を与える知覚消失による角膜混濁が報告されている[9)]。更に，Long-Evans ラットでは，麻酔注射により角膜病変が生じやすいとの報告があることから[12)]，光毒性試験でエヌトレクチニブによる角膜病変が増悪された可能性が考えられた。

生殖発生毒性：エヌトレクチニブを妊娠ラットに妊娠6～17日に投与したところ，胚・胎児発生に影響を与えた。母動物に対する毒性（体重増加量減少及び摂餌量低下）並びに外表及び骨格異常の増加を含む発生毒性が200 mg/kg/日で認められた（MRHD における $AUC_{0\text{-}24h}$ の2.6倍）。胎児体重の減少が50 mg/kg/日以上でみられた（MRHD における $AUC_{0\text{-}24h}$ の0.9倍）。エヌトレクチニブは，12.5 mg/kg/日で胚・胎児の発生に影響を与えなかった（MRHD における $AUC_{0\text{-}24h}$ の0.2倍）。注意喚起を行い，ベネフィットがポテンシャル・リスクを上回ると考えられない限りはエヌトレクチニブを妊娠中の女性に，又は，妊娠の可能性のある女性に投与すべきではない。

新生児への影響：幼若ラット試験で認められたエヌトレクチニブによる変化は成熟ラットの変化と同様であったが，特に中枢毒性が低用量でみられたことを考慮すると，幼若ラットはエヌトレクチニブによって，より高い感受性で影響を受ける可能性がある。この原因として，中枢神経系の成長・発達において Trk シグナル伝達系が重要な働きを持つことが報告されていることから[14)]，Trk 阻害作用に関連して幼若ラットでより高い感受性が認められた可能性が考えられた。また，げっ歯類では，ヒトと比較して出生時では神経系が機能的に未成熟であることが影響している可能性もある[15)]。更に，体重増加抑制，摂餌量減少，大腿骨長の減少，性成熟遅延及び神経行動学的検査における反応時間の延長によって示される成長発達遅延が認められた。同様の影響は，他の抗がん剤の幼若毒性試験でも報告されている[13)]。

2.4.6.4 結論

エヌトレクチニブが非臨床モデルにおいて効果を示したことから，*NTRK1/2/3*又は *ROS1*の遺伝子が遺伝子融合等により再構成されている固形がん患者に対し，臨床的に適応可能であることが示された。吸収・分布・代謝・排泄及び毒性試験プログラムにより得られた結果から，エヌトレクチニブの薬物動態及び毒性プロファイルが十分に特徴づけられた。これらの非臨床データは，適応とする患者層にエヌトレクチニブを継続的に経口投与する際に，適切な臨床モニタリング及びリスク・マネジメント計画への指針を与えるものである。

2.4.7 参考文献一覧

1) Menichincheri M, Ardini E, Magnaghi P, Avanzi N, Banfi P, Bossi R, et al. Discovery of entrectinib: A new 3-aminoindazole as a potent anaplastic lymphoma kinase (ALK), c-ros oncogene 1 kinase (ROS1), and pan-tropomyosin receptor kinases (pan-TRKs) inhibitor. J Med Chem 2016;59:3392-408.
2) Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumor type. ESMO Open 2016;1:e000023.
3) Ardini E, Menichincheri M, Banfi P, Bosotti R, De Ponti C, Pulci R, et al. Entrectinib, a pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor with activity in multiple molecularly defined cancer indications. Mol Cancer Ther 2016;15:628-39.
4) Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. Nat Rev Cancer 2013;13:772-87.
5) Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. *NTRK* fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. Nat Rev Clin Oncol 2018;15:731-47.
6) Ardini E, Bosotti R, Borgia AL, De Ponti C, Somaschini A, Cammarota R, et al. The *TPM3-NTRK1* rearrangement is a recurring event in colorectal carcinoma and is associated with tumor sensitivity to TRKA kinase inhibition. Mol Oncol 2014;8:1495-507.
7) Vaishnavi A, Capelletti M, Le AT, Kako S, Butaney M, Ercan D, et al. Oncogenic and drug-sensitive *NTRK1* rearrangements in lung cancer. Nat Med 2013;19:1469-72.
8) Smith KM, Fagan PC, Pomari E, Germano G, Frasson C, Walsh C, et al. Antitumor activity of entrectinib, a pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor, in *ETV6-NTRK3*-positive acute myeloid leukemia. Mol Cancer Ther 2018;17:455-63.
9) Barbacid M. The Trk Family of Neurotrophin Receptors. J Neurobiol 1994;25:1386-1403.
10) Hondermarck H, Demont Y, Bradshaw RA. Chapter 17; The TrK Receptor Family. In: Wheeler DL, Yarden Y, editors. Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies. Switzerland: Springer International Publishing; 2015:777-820.
11) Raizman MB, Hamrah P, Holland EJ, Kim T, Mah FS, Rapuano CJ, et al. Drug-induced corneal epithelial changes. Surv Ophthalmol 2017;62:286-301.
12) Turner PV, Albassam MA. Susceptibility of rats to corneal lesions after injectable anesthesia. Comp Med. 2005;55:175-82.
13) European Medicines Agency, Human medicines evaluation division. Results of juvenile animal studies (JAS) and impact on anti-cancer medicine development and use in children – Project Report. EMA/629174/2017; November 2017.
14) Segal RA. Selectivity in neurotrophin signaling: theme and variations. Annu Rev Neurosci 2003;26:299-330.
15) Schmitt G. Parrott N, Prinssen E, Barrow P. The great barrier belief: The blood-brain barrier and considerations for juvenile toxicity studies. Reprod Toxicol 2017;72:129-35.