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）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

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
EGFR	epidermal growth factor receptor	上皮増殖因子受容体
HER2	human epidermal growth factor receptor 2	ヒト上皮増殖因子受容体2
MAPK	mitogen-activated protein kinase	分裂促進因子活性化蛋白質キナーゼ
NTRK	neurotrophic tyrosine receptor kinase	神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ
PLC	phospholipase C	ホスホリパーゼ C
ROS1	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	—
TRK	tropomyosin receptor kinase	トロポミオシン受容体キナーゼ

目次

頁
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 がんにおける TRK 及び ROS1 の機能 4
2.6.1.2 エヌトレクチニブの創製と構造 4
2.6.1.3 薬理学的特性 5
2.6.1.4 承認申請の概要 5
2.6.1.5 参考文献 5

図一覧

図 2.6.1.2-1 エヌトレクチニブの化学構造式 4

表一覧

該当なし。

添付資料一覧

該当なし。

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 がんにおける TRK 及び ROS1の機能

TRKA，TRKB 及び TRKC は，それぞれ *NTRK1*，*NTRK2*及び *NTRK3*遺伝子にコードされる受容体型チロシンキナーゼである。TRK は，リガンドである神経栄養因子（神経成長因子，脳由来神経栄養因子及びニューロトロフィン）と結合することで細胞内キナーゼドメインのチロシン残基が自己リン酸化され，細胞内にシグナルを伝達する。TRK から発せられたシグナルは，MAPK 経路，PLCγ 経路及び PI3K/AKT 経路を介して，中枢及び末梢における神経細胞の分化及び生存維持に関わっている[1),2)]。

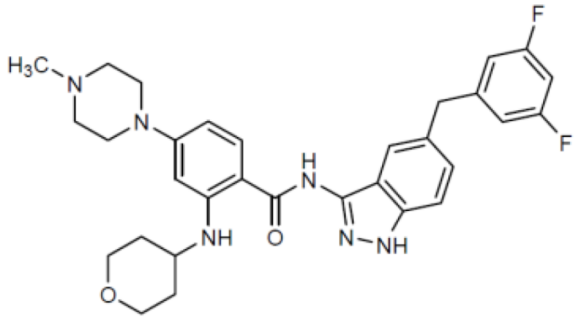
種々のがんにおいて，染色体の転座等により *NTRK* 遺伝子と種々のパートナー遺伝子との融合遺伝子が生じ，癌遺伝子として機能することが知られている[1),3),4)]。遺伝子産物である TRK 融合蛋白質は，恒常的にキナーゼ活性を発現し，生存及び増殖シグナルを発し続けることで，*NTRK* 融合遺伝子陽性細胞を癌化させる。このような *NTRK* 融合遺伝子は，様々な種類の固形がん，例えば，非小細胞肺癌，甲状腺乳頭癌，母斑様黒色腫，神経膠腫，結腸直腸癌，（乳腺相似分泌癌を含む）唾液腺癌，胆管細胞癌，肉腫，分泌性乳癌，先天性線維肉腫，先天性中胚葉腎腫等の成人及び小児の固形がん，更に造血器腫瘍を含む広範囲のがんで報告されている[1),3),4),5)]。

ROS1は，インスリン受容体スーパーファミリーに属するチロシンキナーゼ型受容体である。*ROS1*遺伝子は，*NTRK* 遺伝子と同様，染色体転座などによりパートナー遺伝子と融合遺伝子を形成することが知られており，その遺伝子産物である ROS1融合蛋白質は，恒常的に活性化した受容体型チロシンキナーゼとして細胞を癌化させる[3),6)]。*ROS1*融合遺伝子は，非小細胞肺癌の1～2%でみつかっており[7),8)]，胆管癌，卵巣癌，膠芽腫などでも報告されている[6)]。また，*ROS1*融合遺伝子は，肺腺癌において癌化に関与する ALK，BRAF，EGFR 及び HER2等とは相互に排他的である傾向が認められている[9)]。

2.6.1.2 エヌトレクチニブの創製と構造

エヌトレクチニブ（entrectinib）は，Nerviano Medical Sciences Srl において創製された TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に対する阻害剤である[10),11)]。エヌトレクチニブの分子式は $C_{31}H_{34}F_2N_6O_2$，分子量は560.64であり，化学名及び構造式を以下に示した。また，本薬の開発過程では，エヌトレクチニブ（entrectinib）の他に，RXDX-101，NMS-E628，NMS-1191372，RO7102122等の呼称が用いられた。

図 2.6.1.2-1 エヌトレクチニブの化学構造式



化学名：*N*-{5-[(3,5-ジフルオロフェニル)メチル]-1*H*-インダゾール-3-イル}-4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-2-[(オキサン-4-イル)アミノ]ベンズアミド

2.6.1.3 薬理学的特性

エヌトレクチニブは，TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に対し，選択的な阻害活性を示す。エヌトレクチニブは，*NTRK1/2/3*遺伝子と種々のパートナー遺伝子から成る融合遺伝子をマウス Ba/F3細胞に導入して樹立した細胞株，及び *NTRK* 融合遺伝子を発現しているヒト腫瘍細胞株に対し，がんの種類及び融合パートナー遺伝子の種類に関わらず，強い細胞増殖抑制活性を示した。このようなエヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性は，TRK 蛋白質のリン酸化阻害及び TRK シグナルの下流に位置する主要なメディエーター蛋白質（PCLγ，AKT 及び MAPK）のリン酸化阻害との相関が認められる。また，エヌトレクチニブは，*ROS1*融合遺伝子を発現するヒト腫瘍細胞株及び *ROS1*融合遺伝子を導入したマウス Ba/F3細胞に対し，増殖抑制活性を示した。

TRK 融合蛋白質に依存して増殖する様々な組織に由来するヒト腫瘍細胞株及び患者由来腫瘍細胞（非小細胞肺癌，結腸直腸癌，頭頸部癌，急性骨髄性白血病，肉腫）をマウス皮下に移植した *in vivo* 試験において，エヌトレクチニブ経口投与による腫瘍増殖抑制活性と腫瘍の退縮が認められた。また，ROS1融合蛋白質に依存して増殖する患者由来腫瘍細胞及び *ROS1*融合遺伝子導入 Ba/F3細胞を用いたマウス皮下移植モデルにおいても，エヌトレクチニブ投与による腫瘍の退縮が認められた。

エヌトレクチニブは，中枢神経系の血液脳関門を通過することが示唆されており，*NTRK* 融合遺伝子を導入したマウス神経膠腫，*NTRK* 融合遺伝子を発現するヒト結腸直腸癌及び *ALK* 融合遺伝子を発現するヒト非小細胞肺癌細胞株を用いたマウス頭蓋内移植モデルにおいて，腫瘍増殖の抑制と生存期間の延長が認められた。

2.6.1.4 承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用法・用量については，2.2に記載した。

2.6.1.5 参考文献

1) Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. *NTRK* gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumor types. ESMO Open 2016;1:e000023.
2) Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On *Trk*-the TrkB signal transduction pathway is an increasingly important target in cancer biology. Clin Cancer Res 2009;15:5962-7.
3) Shaw AT, Hsu PP, Awad MM, Engelman JA. Tyrosine kinase gene rearrangements in epithelial malignancies. Nat Rev Cancer 2013;13:772-87.
4) Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. *NTRK* fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. Nat Rev Clin Oncol 2018;15:731-47.
5) Light JE, Koyama H, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, lyer R, et al. Clinical significance of *NTRK* family gene expression in neuroblastomas. Pediatr Blood Cancer 2012;59:226-32.
6) Davies KD, Doebele RC. Molecular pathways: ROS1 fusion proteins in cancer. Clin Cancer Res 2013;19:4040-5.
7) Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. *ROS1* rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. J Clin Oncol 2012;30:863-70.
8) Davies KD, Le AT, Theodoro MF, Skokan MC, Aisner DL, Berge EM, et al. Identifying and targeting *ROS1* gene fusions in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2012;18:4570-9.
9) Saito M, Shimada Y, Shiraishi K, Sakamoto H, Tsuta K, Totsuka H, et al. Development of lung adenocarcinomas with exclusive dependence on oncogene fusions. Cancer Res 2015;75:2264-71.
10) 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 kinase (pan-TRKs) inhibitor. J Med Chem 2016;59:3392-408.
11) 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.

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）

2.6.2 薬理試験の概要文

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ACK1	activated CDC42 kinase 1	—
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
ANOVA	analysis of variance	分散分析
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
ECG	electrocardiogram	心電図
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	繊維芽細胞増殖因子受容体1
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3	—
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-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子1受容体
IKr	rapidly activating delayed rectifier potassium channel (current)	急速活性化遅延整流カリウムチャネル（電流）
IR	insulin receptor	インスリン受容体
ITD	internal tandem duplication	遺伝子内縦列重複
JAK2	Janus kinase 2	ヤヌスキナーゼ2
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
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
MST	median survival time	生存期間中央値
N	number	個体数
NA	not applicable	該当せず
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
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase	（損傷した DNA を修復する酵素）
PD	pharmacodynamics	薬力学
PDX	patient-derived xenograft	患者由来腫瘍移植モデル
PLC	phospholipase C	ホスホリパーゼ C
PO	per os	経口
QD	quaque die	1日1回投与
QTc	corrected QT	補正 QT
RET	rearranged during transfection protooncogene	—
ROS1	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	—
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全症
SD	Sprague Dawley	SD 系

略語	英名	和名
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
TI	tumor inhibition	腫瘍阻害率
TRK	tropomyosin receptor kinase	トロポミオシン受容体キナーゼ
VEGFR3	vascular endothelial growth factor receptor 3	血管内皮増殖因子受容体3

目次

頁

2.6.2 薬理試験の概要文 7
2.6.2.1 まとめ 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 10
2.6.2.2.1 キナーゼ阻害活性 10
2.6.2.2.2 *In vitro* 細胞増殖抑制活性 11
2.6.2.2.2.1 ヒト腫瘍細胞株 12
2.6.2.2.2.2 *NTRK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞 14
2.6.2.2.2.3 *ROS1* 融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞 15
2.6.2.2.3 作用機序 16
2.6.2.2.3.1 TRK 融合蛋白質依存性細胞に対する作用 16
2.6.2.2.3.2 ROS1 融合蛋白質依存性細胞に対する作用 19
2.6.2.2.4 *In vivo* 抗腫瘍活性 20
2.6.2.2.4.1 TRK 融合蛋白質依存性モデル 20
2.6.2.2.4.2 ROS1 融合蛋白質依存性モデル 30
2.6.2.2.4.3 頭蓋内移植モデル 32
2.6.2.3 副次的薬理試験 38
2.6.2.4 安全性薬理試験 39
2.6.2.4.1 中枢神経系 39
2.6.2.4.2 心血管系 40
2.6.2.4.2.1 *In vitro* ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイ 40
2.6.2.4.2.1.1 エヌトレクチニブの hERG アッセイ 40
2.6.2.4.2.1.2 代謝物 M5 の hERG アッセイ 40
2.6.2.4.2.2 イヌを用いた *in vivo* テレメトリー試験 40
2.6.2.4.2.2.1 探索的試験 40
2.6.2.4.2.2.2 GLP テレメトリー試験 40
2.6.2.4.3 呼吸器系 41
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 41
2.6.2.6 考察及び結論 41
2.6.2.7 図表 42
2.6.2.8 参考文献 42

図一覧

図 2.6.2.2.2.1-1 腫瘍細胞株パネルにおけるエヌトレクチニブ及び代謝物 M5 による 増殖抑制活性の相関性 13
図 2.6.2.2.2.1-2 エヌトレクチニブ及び代謝物 M5 の KM12 細胞株（*TPM3-NTRK1* を発現する 結腸直腸癌）に対する増殖抑制活性 14
図 2.6.2.2.3.1-1 TRKA 及び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 – KM12 細胞，2 時間培養 16
図 2.6.2.2.3.1-2 KM12 細胞の細胞周期に対するエヌトレクチニブの作用 17
図 2.6.2.2.3.1-3 TRKA 及び下流シグナル伝達分子 PLCγ のリン酸化に対する エヌトレクチニブの作用 – KM12 細胞，24 時間～72 時間培養 17
図 2.6.2.2.3.1-4 エヌトレクチニブ及び代謝物 M5 による KM12 細胞の細胞周期に対する作用 -G1 期停止の誘導 18
図 2.6.2.2.3.1-5 エヌトレクチニブ及び代謝物 M5 による KM12 細胞のアポトーシス誘導 - カスパーゼ 3/7 の活性化 18
図 2.6.2.2.3.2-1 *ROS1* 融合遺伝子導入 Ba/F3 細胞の ROS1 リン酸化に対する エヌトレクチニブの作用 19
図 2.6.2.2.4.1-1 KM12 細胞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 21
図 2.6.2.2.4.1-2 KM12-Luc 細胞移植モデルにおけるエヌトレクチニブ 1 日 1 回投与と 1 日 2 回投与（各回の投与量は 1/2）の腫瘍増殖抑制活性 22
図 2.6.2.2.4.1-3 KM12-Luc 細胞皮下移植モデルにおける TRKA の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薬力学的作用 23
図 2.6.2.2.4.1-4 CUTO-3 細胞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 24
図 2.6.2.2.4.1-5 IMS-M2 細胞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 24
図 2.6.2.2.4.1-6 IMS-M2 細胞移植モデルにおける TRKC 及び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 25
図 2.6.2.2.4.1-7 IMS-M2 細胞移植モデルでの骨髄中腫瘍細胞数に対する エヌトレクチニブの抑制活性 26
図 2.6.2.2.4.1-8 MO-91 細胞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 26
図 2.6.2.2.4.1-9 MO-91 細胞移植モデルにおける TRKC 及び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 27
図 2.6.2.2.4.1-10 CTG-0798 細胞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 28
図 2.6.2.2.4.1-11 G002 細胞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 29
図 2.6.2.2.4.1-12 G002 細胞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 29
図 2.6.2.2.4.2-1 Ba/F3_*TEL-ROS1* 細胞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 30
図 2.6.2.2.4.2-2 CTG-0848 細胞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 31

図 2.6.2.2.4.2-3 LU-01-0414 細胞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 31
図 2.6.2.2.4.3-1 BNN4 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 – MRI 画像による比較 33
図 2.6.2.2.4.3-2 BNN4 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 – 生存期間の Kaplan-Meier 曲線 33
図 2.6.2.2.4.3-3 KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 –ルシフェラーゼによる生物発光での比較 34
図 2.6.2.2.4.3-4 KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 – ルシフェラーゼ発光を指標とした腫瘍増殖抑制効果と生存期間の延長 35
図 2.6.2.2.4.3-5 KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルにおける TRKA の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薬力学的作用 36
図 2.6.2.2.4.3-6 NCI-H2228 細胞頭蓋内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 – MRI 画像による比較 37
図 2.6.2.2.4.3-7 NCI-H2228 細胞頭蓋内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 – MRI を用いた経時的な測定 37
図 2.6.2.2.4.3-8 NCI-H2228 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの 抗腫瘍効果 – 生存期間の Kaplan-Meier 曲線 38

表一覧

表 2.6.2.2.1-1 各種キナーゼに対するエヌトレクチニブの阻害活性 11
表 2.6.2.2.2.1-1 *NTRK, ROS1 又は ALK* 融合遺伝子を発現する腫瘍細胞株 に対するエヌトレクチニブの増殖抑制活性 12
表 2.6.2.2.2.2-1 *NTRK* 融合遺伝子導入 Ba/F3 細胞株の増殖に対する エヌトレクチニブの抑制活性 15
表 2.6.2.2.2.3-1 *ROS1* 融合遺伝子導入 Ba/F3 細胞の増殖に対する エヌトレクチニブ及びクリゾチニブの抑制活性 15
表 2.6.2.4-1 安全性薬理試験 39

添付資料一覧

該当なし。

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

エヌトレクチニブ（entrectinib，RXDX-101，RO7102122，NMS-1191372）[1]は，TRKA，TRKB，TRKC（それぞれ *NTRK1*，*NTRK2*及び *NTRK3*の遺伝子産物）[2]，ROS1及び ALK に対し選択的な阻害剤である[3]。エヌトレクチニブは，標的となるキナーゼのリン酸化を阻害し，シグナルの下流に位置する PLCγ，MAPK，AKT 等のシグナル伝達分子の活性化を抑制した。また，細胞周期の進行を停止させ，アポトーシスを誘導した。エヌトレクチニブを経口投与した *in vivo* 試験では，TRK 等の標的キナーゼを阻害することで，TRK 又は ROS1依存的に増殖するヒト腫瘍細胞の皮下移植モデル及び TRK 又は ALK 依存的な頭蓋内移植モデルにおいて抗腫瘍効果を示した。

(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た。各キナーゼに対するエヌトレクチニブの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，ヒトにおける主な代謝物 M5の 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[4]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[5]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[6]では0.47 nmol/L であり，13種の *NTRK1/2/3*の融合遺伝子を導入して作製した Ba/F3細胞では，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) 作用機序

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ことが示された。また，標的となるキナーゼを阻害することで，TRK 及び ROS1シグナルの下流に位置し，腫瘍の生存と増殖を担う重要なシグナル伝達分子（PLCγ，AKT，MAPK）のリン酸化が阻害されることが示された。*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，細胞周期の G1期における停止及びアポトーシス誘導が認められた。エヌトレクチニブの主な代謝物である 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，アポトーシスを誘導した。

(3) 皮下移植モデルでの細胞増殖抑制活性

NTRK 又は *ROS1*と様々なパートナー遺伝子から成る融合遺伝子を発現し，様々な組織型の腫瘍細胞及び融合遺伝子を導入した細胞を用いて，*in vivo* におけるエヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を評価した。エヌトレクチニブは，これらの腫瘍をマウス皮下に移植したモデルにおいて，用量依存的な腫瘍増殖抑制活性を示し，高用量では腫瘍の退縮が認められた。また，マウス体重に明らかな影響を及ぼすことなく，マウスにおいて良好な忍容性を示した。エヌトレクチニブの活性を評価した *in vivo* モデルを以下に示す（カッコ内は，融合遺伝子とがんの種類）。

1) TRK 融合蛋白質依存的に増殖するヒト腫瘍細胞株を用いた皮下移植モデル
KM12及び KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*，結腸直腸癌細胞株），CUTO-3（*MPRIP-NTRK1*，非小細胞肺癌細胞株），IMS-M2（*ETV6-NTRK3*，急性骨髄性白血病細胞株），MO-91（*ETV6-NTRK3*，急性骨髄性白血病細胞株）
2) TRK 融合蛋白質依存的に増殖する患者由来腫瘍の皮下移植モデル
CTG-0798（*ETV6-NTRK3*，頭頸部癌，PDX），G002（*TPM3-NTRK1*，肉腫，PDX）
3) ROS1融合蛋白質依存的に増殖する細胞の皮下移植モデル
Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞を用いた同種移植モデル，2つの非小細胞肺癌の PDX モデル（*CD74-ROS1*を有する CTG-0848及び *SDC4-ROS1*を有する LU-01-0414）

エヌトレクチニブによる腫瘍増殖抑制活性と TRK 下流のシグナル伝達抑制作用との関係について，KM12-Luc 細胞移植モデルを用いて検討し，TRK の主要なシグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化をウエスタンブロットにより評価した。エヌトレクチニブは，5 mg/kg 以上の用量において，腫瘍組織における PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化を用量依存的に阻害したことから，シグナル伝達系の抑制活性と腫瘍増殖抑制活性との間の連関が示された。また，TRK 下流のシグナル伝達抑制作用との関係について，IMS-M2及び MO-91細胞移植モデルを用いて検討し，エヌトレクチニブ投与による TRK 下流のシグナル伝達分子 PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化抑制作用が認められた。

(4) 頭蓋内移植モデルでの抗腫瘍効果

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て試験を実施した。*BCAN-NTRK1*を遺伝子導入したマウス神経膠腫細胞株 BNN4及び BNN2を頭蓋内に同所性移植したマウスモデルでは，エヌトレクチニブを経口投与することで有意な生存期間の延長が示された。*TPM3-NTRK1*を有する結腸直腸癌細胞株 KM12-Luc を頭蓋内に移植したマウスモデルでは，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とマウス生存期間の延長が認められた。頭蓋内移植モデルにおいても，エヌトレクチニブは，腫瘍組織における PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化を用量依存的に阻害し，シグナル伝達系の抑制活性と腫瘍増殖抑制活性との間の連関が示された。また，*EML4-ALK* を有する非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228[7),8)]を頭蓋内に移植したマウスモデルでは，エヌトレクチニブを経口投与することで腫瘍増殖の抑制と生存期間の延長が認められた。

(5) 副次的薬理

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。その結果，TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に選択的な阻害活性が確認された。

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。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-HT_{1B}, 5-HT_{2A}，5-HT_{2B}，5-HT_{5A}，5-HT_6，5-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。

(6) 安全性薬理

エヌトレクチニブは，ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）テール電流を阻害し，IC_{50} は 0.6 μmol/L であった。また，単回経口投与による安全性薬理試験では，ラットの一般行動及び呼吸系に影響を及ぼさず（無影響量（NOEL）：200 mg/kg），テレメーター装着イヌの心血管系機能に対する生物学的に有意な影響を示さなかった（NOEL：120 mg/kg）。しかしながら，反復投与毒性試験では，中枢神経系への影響（ラット及びイヌ）及び QT/QTc の延長（イヌ）が観察された。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 キナーゼ阻害活性

（資料番号4.2.1.1-1，4.2.1.1-2，4.2.1.1-3）

(1) 標的キナーゼに対する阻害活性

エヌトレクチニブの標的キナーゼに対する阻害活性について，^{33}P-標識 ATP を用いたキナーゼアッセイにより，IC_{50}を算出した。エヌトレクチニブの TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に対する 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，ヒトにおける主な代謝物である M5についても同様に算出したところ，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。別途実施したキナーゼアッセイにおいても，同様の結果が得られた。

(2) 組換え体キナーゼパネルでの阻害活性

51種のチロシンキナーゼ，セリン-スレオニンキナーゼから成るキナーゼパネルを用いて，エヌトレクチニブの特異性を調べた。各キナーゼに対する IC_{50}を算出し，TRKA を基準にした選択性を表 2.6.2.2.1-1に示した。

エヌトレクチニブは，TRKA，ROS1及び ALK の各チロシンキナーゼに対し，低濃度で阻害活性を示した（IC_{50}は，順に2, 7及び19 nmol/L）。標的キナーゼ以外で，IC_{50}が TRKA の50倍未満であったキナーゼは，JAK2，ACK1のみであり，IGF1R，FLT3，IR，RET，FGFR1，VEGFR3などの受容体型チロシンキナーゼに対する IC_{50}は，いずれも TRKA の100倍以上であった。エヌトレクチニブによる阻害活性を測定した51種のキナーゼの内，25種のキナーゼに対する IC_{50}は，10 μmol/L を超えており，表 2.6.2.2.1-1の脚注に示した。

表 2.6.2.2.1-1 各種キナーゼに対するエヌトレクチニブの阻害活性

キナーゼ	IC_{50} (nmol/L, mean ± SD)	選択性* (TRKA = 1)
TRKA	2 ± 1	-
ROS1	7 ± 3	3.5
ALK	19 ± 9	9.5
JAK2	38 ± 27	19
ACK1	68 ± 14	34
JAK1	164 ± 42	82
AUR2	220 ± 117	110
FAK	227 ± 133	114
BRK	241 ± 129	121
JAK3	277 ± 72	139
IGFR1	294 ± 197	147
FLT3	299 ± 142	150
IR	366 ± 210	183
RET	540 ± 120	270
FGFR1	1033 ± 306	>500
VEGFR3	1244 ± 384	>500
LCK	1519 ± 941	>500
KIT	1725 ± 601	>500
MELK	2926 ± 26	>500
AUR1	2986 ± 39	>500
C-ABL	3647 ± 1609	>500
VEGFR2	4058 ± 1888	>500
PKCbeta	4061 ± 138	>500
EphA2	4964 ± NA	>500
Syk	5021 ± 3232	>500
CDK2/CYCA	5773 ± 625	>500

*：選択性は，TRKA に対する IC_{50}との比較，NA：該当せず
IC_{50}が10 μmol/L を超えたキナーゼ：AKT1，CDC7/DBF4，CHK1，CK2，EEF2K，EGFR1，ERK2，GSK3beta，IKK2，MAPKAPK2，MET，MPS1，MST4，NEK6，NIM1，P38alpha，PAK4，PDGFR，PDK1，PERK，PIM1，PKAalpha，PLK1，SULU1，ZAP70

【4.2.1.1-3 Table 2を改変】

2.6.2.2.2 *In vitro* 細胞増殖抑制活性

ヒト腫瘍細胞株及び非腫瘍性細胞株を含む細胞株パネル並びに標的となる融合遺伝子を導入し発現させた Ba/F3細胞株を用いて，*in vitro* におけるエヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を調べた。

2.6.2.2.2.1 ヒト腫瘍細胞株

（資料番号4.2.1.1-4，4.2.1.1-5，4.2.1.1-6，4.2.1.1-7，4.2.1.1-13，4.2.1.1-14）

NTRK 及び *ROS1*の融合遺伝子を発現する細胞を含む広範な2種の細胞株パネルを用いて，エヌトレクチニブの腫瘍細胞増殖抑制活性を調べた。

最初の試験では，腫瘍細胞154株及び非腫瘍性細胞6株から成る細胞株パネルを用いて，エヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を検討した。細胞パネルには，白血病/リンパ腫35株，肺癌27株，結腸直腸癌24株，乳癌14株，腎腺癌（腎細胞癌）8株，悪性黒色腫8株，多発性骨髄腫8株，卵巣癌7株，膠芽腫5株，膵臓腺癌4株，前立腺癌3株，子宮頸部腺癌3株，星細胞腫2株，骨肉腫2株，神経芽細胞腫2株，膀胱癌1株，膠肉腫1株，及び非腫瘍性細胞6株が含まれる。

各細胞株をエヌトレクチニブ存在下で72時間培養後，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測し，細胞増殖抑制活性の IC_{50}を算出した。160種の細胞株全体での平均 IC_{50}は2.76 μmol/L，レンジは0.02～6.05 μmol/L であった。エヌトレクチニブは，*NTRK* 融合遺伝子を発現している結腸直腸癌細胞株 KM12[4]の増殖を低濃度で阻害し（IC_{50} = 17 nmol/L），*ALK* 融合遺伝子を発現している腫瘍細胞株である SU-DHL-1，KARPAS-299，SUP-M2，NCI-H2228及び SR-786に対しても，低濃度で腫瘍増殖抑制活性を示した（IC_{50}は，順に20，31，41，68及び81 nmol/L）。一方，ほとんどの腫瘍細胞株は，エヌトレクチニブに対する感受性が低く，非腫瘍性細胞株も同様であった。

*TPM3-NTRK1*を発現する結腸直腸癌細胞株 KM12[4]以外にも，*NTRK* 融合遺伝子を発現している腫瘍細胞株として非小細胞肺癌細胞株 CUTO-3（*MPRIP-NTRK1*）[5]，急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91（いずれも *ETV6-NTRK3*）[6]，また，*TPM3-ROS1*を発現する非小細胞肺癌細胞株 CUTO-28に対する細胞増殖抑制活性を調べた。エヌトレクチニブは，これらの腫瘍細胞株に対し，低濃度で増殖抑制活性を示した。細胞株パネルのデータも含め，*NTRK*，*ROS*1，*ALK* 融合遺伝子陽性の腫瘍細胞株に対する細胞増殖抑制活性を表 2.6.2.2.2.1-1に示す。

表 2.6.2.2.2.1-1 *NTRK*，*ROS1*又は*ALK* 融合遺伝子を発現する腫瘍細胞株に対するエヌトレクチニブの増殖抑制活性

腫瘍細胞株	癌腫	発現している融合遺伝子	IC_{50} (nmol/L)
IMS-M2	急性骨髄性白血病	*ETV6-NTRK3*	0.47
MO-91	急性骨髄性白血病	*ETV6-NTRK3*	0.65
CUTO-3	非小細胞肺癌	*MPRIP-NTRK1*	1.255
KM12	結腸直腸癌	*TPM3-NTRK1*	17
CUTO-28	非小細胞肺癌	*TPM3-ROS1*	20.1
SU-DHL-1	未分化大細胞型リンパ腫	*NPM1-ALK*	20
KARPAS-299	未分化大細胞型リンパ腫	*NPM1-ALK*	31
SUP-M2	未分化大細胞型リンパ腫	*NPM1-ALK*	41
NCI-H2228	非小細胞肺癌	*EML4-ALK*	68
SR-786	未分化大細胞型リンパ腫	*NPM1-ALK*	81

【4.2.1.1-4 Table 2，4.2.1.1-5 3.1項，4.2.1.1-13 3.1項，4.2.1.1-14 3.2項に基づいて作成】

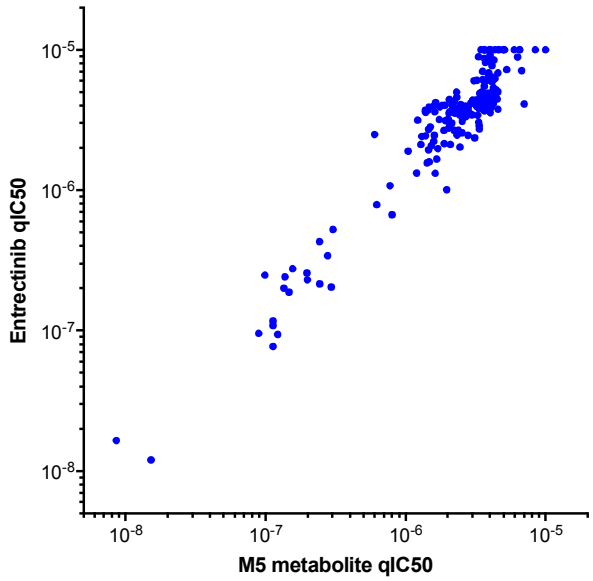
次に，308細胞株から成る細胞パネルを用いて，エヌトレクチニブ及びその代謝物 M5について，腫瘍細胞増殖抑制活性を調べた。細胞パネルには，肺癌101株，卵巣癌49株，白血病/リンパ腫34株，膵臓癌31株，結腸直腸癌24株，肝癌15株，脳腫瘍13株，乳癌11株，胃癌9株，子宮頸癌5株，皮膚癌4株，及びその他の肉腫及び癌腫12株が含まれる。また，この内，39細胞株が小児癌に由来する細胞株である。

エヌトレクチニブに感受性を示し，IC_{50}が1 μmol/L 未満であった細胞株には，*NTRK* 融合遺

伝子を有する5種の腫瘍細胞株 CUTO-3（*MPRIP-NTRK1*，非小細胞肺癌），KM12（*TPM3-NTRK1*，結腸直腸癌），IMS-M2（*ETV6-NTRK3*，急性骨髄性白血病），MO-91（*ETV6-NTRK3*，急性骨髄性白血病）及び G111（*EML4-NTRK3*，脳腫瘍），*ROS1*融合遺伝子を有する4種の腫瘍細胞株 CUTO-27（*CD74-ROS1*，非小細胞肺癌），CUTO-28（*TPM3-ROS1*，非小細胞肺癌），HCC1493（*CD74-ROS1*，乳癌）及び HCC-78（*CD74-ROS1*，非小細胞肺癌），*ALK* 融合遺伝子又は遺伝子増幅を有する5種の細胞株 SU-DHL-1（*NPM1-ALK*，未分化大細胞型リンパ腫），DEL（*NPM-ALK*，未分化大細胞型リンパ腫），NB-1（*ALK* 遺伝子増幅，脳腫瘍），KARPAS-299（*NPM-ALK*，未分化大細胞型リンパ腫）及び NCI-H2228（*EML4-ALK*，非小細胞肺癌）が含まれており，*FLT3-ITD* 変異細胞株である MV-4-11細胞株（血液癌）も感受性を示した。また，KM12のルシフェラーゼ導入株等，重複する5細胞株の IC_{50}も1 µmol/L であり感受性が認められた。細胞株パネルの残り288株は，IC_{50}が1 µmol/L 以上であった。

エヌトレクチニブ処理の IC_{50}と M5処理による IC_{50}は，感受性を示した20細胞株で高い相関性を示し（Pearson r = 0.8946，P < 0.0001），比較した全細胞株においても相関性を示した（Pearson r = 0.7762，P < 0.0001）（図 2.6.2.2.2.1-1）。これらの結果から，主要な代謝物である M5は，種々の腫瘍細胞に対し，エヌトレクチニブと同程度の増殖抑制活性を有することが示された。

図 2.6.2.2.2.1-1 腫瘍細胞株パネルにおけるエヌトレクチニブ及び代謝物 M5による増殖抑制活性の相関性



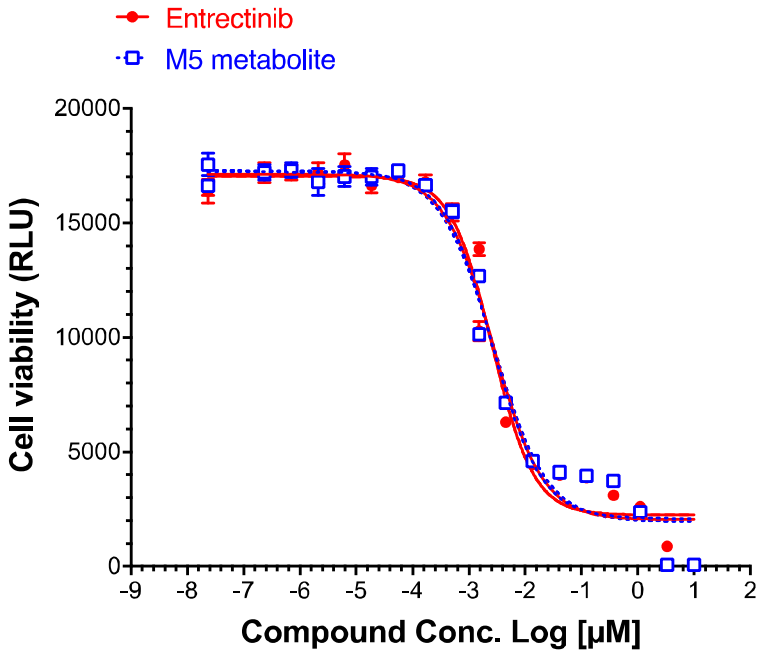
各細胞株をエヌトレクチニブ又は代謝物 M5存在下で120時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて生存率を測定した。エヌトレクチニブ及び M5の細胞増殖抑制活性について各細胞の IC_{50}を算出し，相関性を検討するため図示した。
qIC50：quantified IC_{50}，薬物未添加のコントロールを対照として，50%阻害と算出された濃度（IC_{50}），50%阻害に達しない場合は，最高濃度（10 µmol/L）とした。

【4.2.1.1-6 Figure 1再掲】

エヌトレクチニブの主な代謝物 M5が，エヌトレクチニブと同等のキナーゼ阻害活性を示し，細胞株パネルでの腫瘍増殖抑制活性においても同様であったことから，KM12細胞株（結腸直腸癌，*TPM3-NTRK1*）を用いて，両者の活性を詳しく比較した。エヌトレクチニブ又は代謝物 M5存在下で KM12細胞を72時間培養した後の細胞生存率を比べたところ，同程度の増殖抑制活性を示し，IC_{50}は，順に2.8及び2.6 nmol/L であった（図 2.6.2.2.2.1-2）。これらの結果は，細胞パネルでの結果と一致しているとともに，*in vivo* においてエヌトレクチニブが示す抗腫瘍

活性に対し，代謝物 M5の曝露が寄与している可能性が示唆される。

図 2.6.2.2.2.1-2 エヌトレクチニブ及び代謝物 M5の KM12細胞株（*TPM3-NTRK1*を発現する結腸直腸癌）に対する増殖抑制活性



KM12細胞株（結腸直腸癌，*TPM3-NTRK1*）をエヌトレクチニブ又は代謝物 M5存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて生存率を測定した。RLU：Relative Luminescence Units

【4.2.1.1-7 Figure 1再掲】

2.6.2.2.2.2 *NTRK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞

（資料番号4.2.1.1-8）

NTRK 融合遺伝子を発現しているヒト腫瘍細胞株が少ないことから，種々の *NTRK* 融合遺伝子に対するエヌトレクチニブの活性を評価するため，13種の *NTRK1/2/3*融合遺伝子をマウス Ba/F3細胞（IL-3依存性に増殖するマウス pro B 細胞株）に導入して作製した細胞株を用いて，エヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を調べた。

NTRK 融合遺伝子を導入した各 Ba/F3細胞をエヌトレクチニブ存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測し，各細胞株に対する細胞増殖抑制活性の IC_{50}を算出した。その結果を表 2.6.2.2.2.2-1に示す。

エヌトレクチニブは，13種の *NTRK* 融合遺伝子導入 Ba/F3細胞に対し強い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。一方，親株である Ba/F3細胞に対しては増殖抑制活性を示さなかった（IC_{50} > 1000 nmol/L）。

表 2.6.2.2.2.2-1 *NTRK* 融合遺伝子導入 Ba/F3細胞株の増殖に対する エヌトレクチニブの抑制活性

NTRK 融合遺伝子導入 Ba/F3細胞	IC_{50} (nmol/L)
Ba/F3（対照）	>1000
Ba/F3-*TPM3-NTRK1*	2.52
Ba/F3-*LMNA-NTRK1*	1.28
Ba/F3-*ETV6-NTRK1*	2.50
Ba/F3-*BCAN-NTRK1*	0.51
Ba/F3-*SQSTM1-NTRK1*	0.85
Ba/F3-*SCYL3-NTRK1*	1.42
Ba/F3-*PLEKHA6-NTRK1*	1.05
Ba/F3-*VCL-NTRK2*	5.39
Ba/F3-*AFAP1-NTRK2*	2.85
Ba/F3-*TRIP13-NTRK2*	0.70
Ba/F3-*ETV6-NTRK2*	4.12
Ba/F3-*ETV6(e5)-NTRK3(e15)*	4.47
Ba/F3-*ETV6(4)-NTRK3(e14)*	0.37

【4.2.1.1-8 Table 2を改変】

2.6.2.2.2.3 *ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞

（資料番号4.2.1.1-21）

*TEL-ROS1*融合遺伝子をマウス Ba/F3細胞に導入して作製した細胞株（Ba/F3_*TEL-ROS1*）を用いて，エヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を調べた。エヌトレクチニブ又はクリゾチニブ存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測し，細胞増殖抑制活性の IC_{50}を算出した。

エヌトレクチニブは，Ba/F3_*TEL-ROS1*の増殖を低濃度で抑制し，IC_{50}は0.005 μmol/L であった。同じ条件におけるクリゾチニブの IC_{50}は0.180 μmol/L であった。エヌトレクチニブの増殖抑制活性は，IL-3（10 ng/mL）共存下で著しく減退し，レスキューされること（IC_{50} = 1.05 μmol/L）から，Ba/F3_*TEL-ROS1*の増殖に対する抑制活性は，ROS1阻害に基づくことが示された。

表 2.6.2.2.2.3-1 *ROS1*融合遺伝子導入 Ba/F3細胞の増殖に対する エヌトレクチニブ及びクリゾチニブの抑制活性

薬物	IC_{50}（μmol/L）		
	Ba/F3	Ba/F3_*TEL-ROS1*	
	IL-3 10 ng/mL	IL-3 10 ng/mL	IL-3非添加
エヌトレクチニブ	2.08	1.05	0.005
クリゾチニブ	2.10	1.45	0.180

【4.2.1.1-21 Table 1を改変】

2.6.2.2.3 作用機序

2.6.2.2.3.1 TRK 融合蛋白質依存性細胞に対する作用

（資料番号4.2.1.1-7，4.2.1.1-9，4.2.1.1-14）

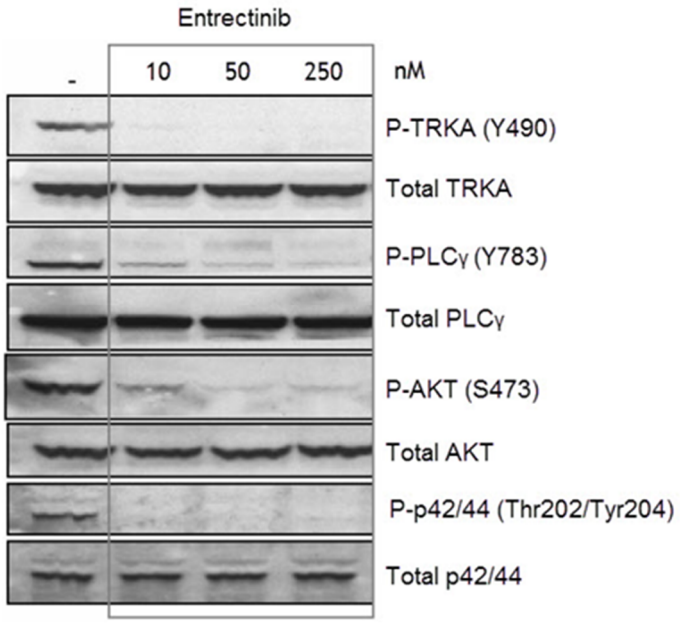
*TPM3-NTRK1*を発現している結腸直腸癌細胞株 KM12[4)]を用いて，TRK 融合蛋白質依存性細胞における TRKA 及びシグナル伝達分子のリン酸化に対するエヌトレクチニブの作用について検討した。また，KM12の細胞周期及びアポトーシス誘導について，エヌトレクチニブと主な代謝物である M5を比較した。エヌトレクチニブによる細胞周期及びアポトーシス誘導については，*ETV6-NTRK3*を発現する急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91においても検討した。

(1) TRKA 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化（2時間処理）

（資料番号4.2.1.1-9）

エヌトレクチニブ共存下で KM12細胞を2時間培養した後，TRKA 及びその下流に位置するシグナル伝達分子（PLCγ，AKT/protein Kinase B，p42/44 MAPK）のリン酸化について，ウエスタンブロットを用いて解析した。エヌトレクチニブは，10 nmol/L 以上の濃度で 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（図 2.6.2.2.3.1-1）。

図 2.6.2.2.3.1-1 TRKA 及び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 – KM12細胞，2時間培養



KM12細胞をエヌトレクチニブ共存下で2時間培養後，細胞を回収して溶解し，TRKA 及び下流シグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び p42/44の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。

【4.2.1.1-9 Figure 1を改変】

(2) 細胞周期及びシグナル伝達分子のリン酸化（24～72時間処理）

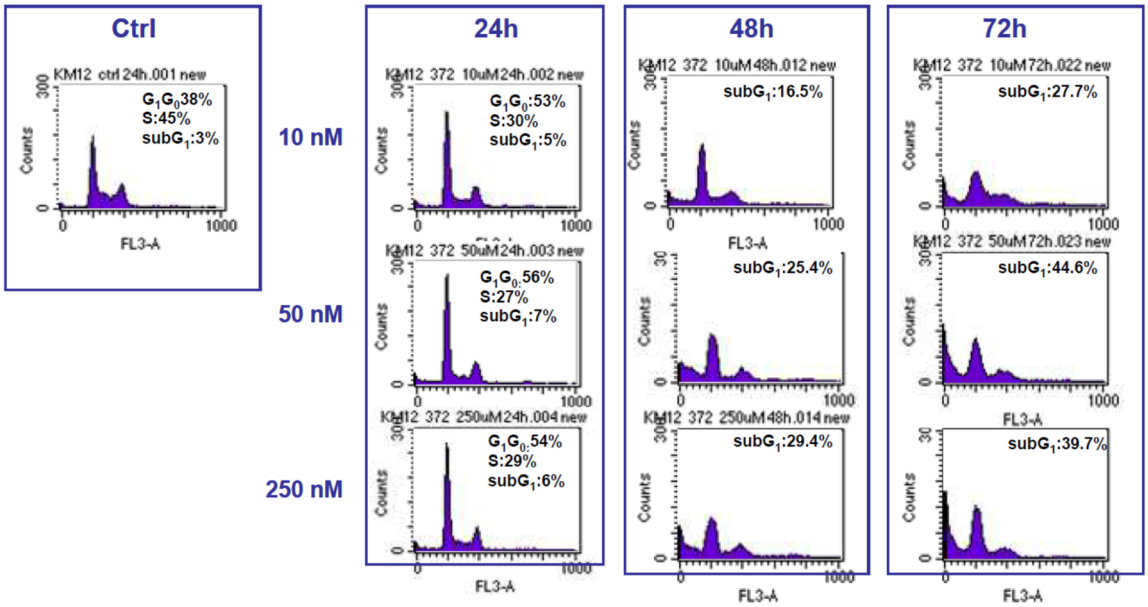
（資料番号4.2.1.1-9）

エヌトレクチニブ共存下で KM12細胞を24時間，48時間及び72時間培養し，細胞周期に対する作用についてフローサイトメーターを用いて解析した。

エヌトレクチニブ共存下で24時間培養後には，いずれの濃度においても細胞周期の G1期へ

の集積が認められた（図 2.6.2.2.3.1-2）。48時間以降では，sub-G1ピークが認められたことから，アポトーシスの誘導が示された。TRKA 及びその下流のシグナル伝達分子である PLCγ のリン酸化に対する作用についてウエスタンブロットを用いて解析し，エヌトレクチニブによりリン酸化が阻害されていることが示された（図 2.6.2.2.3.1-3）。

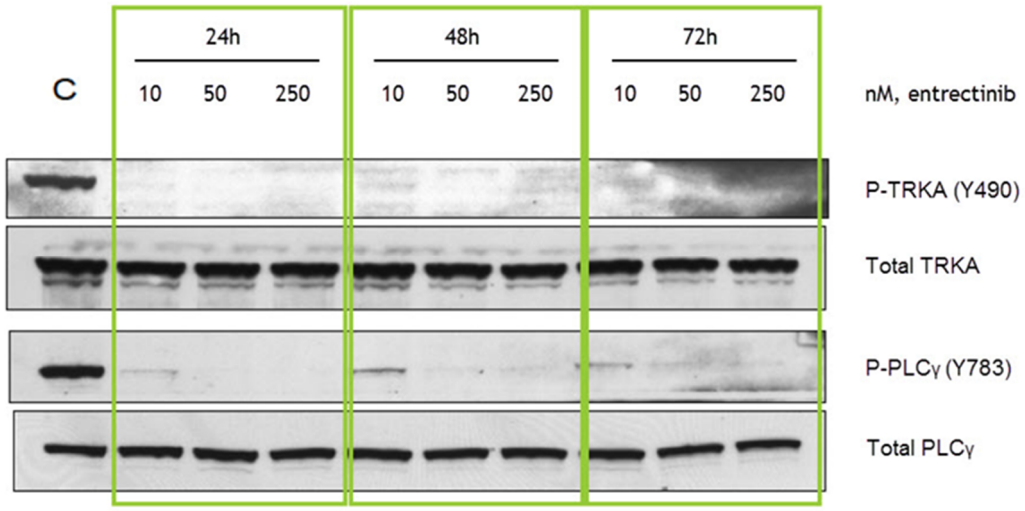
図 2.6.2.2.3.1-2 KM12細胞の細胞周期に対するエヌトレクチニブの作用



KM12細胞をエヌトレクチニブ共存下で24，48又は72時間培養後，細胞を回収し，フローサイトメーターを用いて細胞周期を解析した。

【4.2.1.1-9 Figure 2再掲】

図 2.6.2.2.3.1-3 TRKA 及び下流シグナル伝達分子 PLCγ のリン酸化に対するエヌトレクチニブの作用 －KM12細胞，24時間～72時間培養



KM12細胞をエヌトレクチニブ共存下で24，48又は72時間培養後，細胞を回収して溶解し，TRKA 及び下流シグナル伝達分子である PLCγ の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。

【4.2.1.1-9 Figure 3を改変】

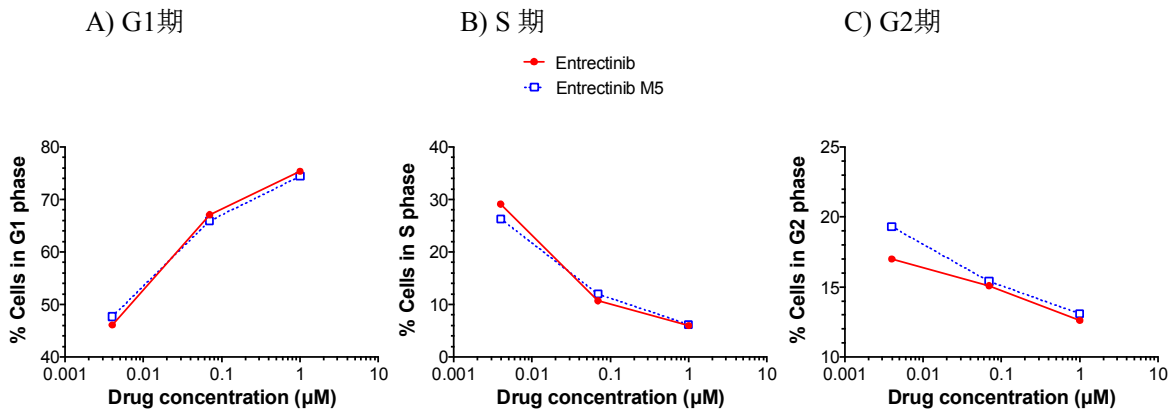
(3) エヌトレクチニブ及び代謝物 M5による細胞周期停止及びアポトーシスの誘導

（資料番号4.2.1.1-7）

エヌトレクチニブ又は代謝物 M5共存下で KM12細胞を48時間培養し，細胞周期に対する作用について，フローサイトメーターを用いて解析した。また，アポトーシス誘導については，エヌトレクチニブ又は代謝物 M5共存下で KM12細胞を培養し，2時間ごとに48時間目までカスパーゼ3/7活性（陽性細胞の割合）を測定することで検討した。

図 2.6.2.2.3.1-4に示すように，エヌトレクチニブ及び M5は，いずれも KM12細胞の細胞周期を G1期で停止させた。また，カスパーゼ3/7活性化を指標としたアポトーシス誘導が認められた（図 2.6.2.2.3.1-5）。

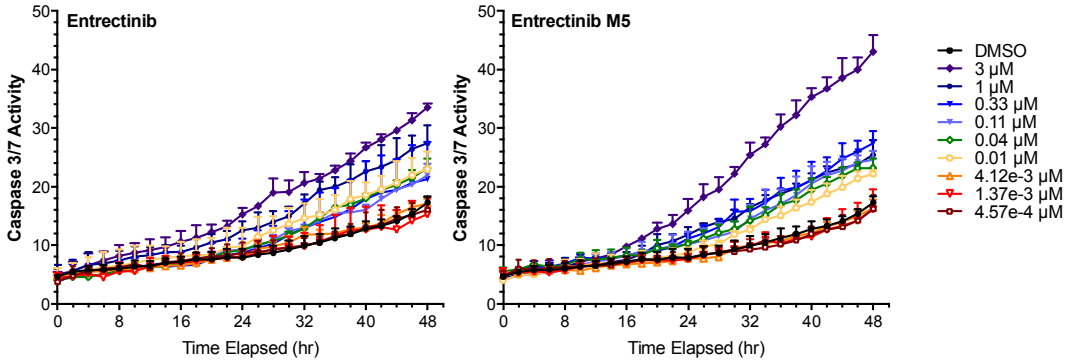
図 2.6.2.2.3.1-4 エヌトレクチニブ及び代謝物 M5による KM12細胞の細胞周期に対する作用 -G1期停止の誘導



KM12細胞をエヌトレクチニブ又は M5（いずれも0.004，0.07，1 μmol/L）共存下で48時間培養後，細胞を回収し，フローサイトメーターを用いて細胞周期を解析した。

【4.2.1.1-7 Figure 2を改変】

図 2.6.2.2.3.1-5 エヌトレクチニブ及び代謝物 M5による KM12細胞のアポトーシス誘導 -カスパーゼ3/7の活性化



KM12細胞をエヌトレクチニブ又は M5共存下で培養し，48時間目まで2時間ごとのカスパーゼ3/7陽性細胞の割合を表示した。

【4.2.1.1-7 Figure 3再掲】

以上の結果から，エヌトレクチニブは，TRKA 活性を阻害し，下流でのシグナル伝達を遮断することにより，KM12細胞に対する増殖抑制活性を示すことが明らかになった。また，エヌ

トレクチニブによる TRKA 阻害は，細胞周期を G1期で停止させ，アポトーシスを誘導した。代謝物 M5も，エヌトレクチニブと同様の活性を示した。

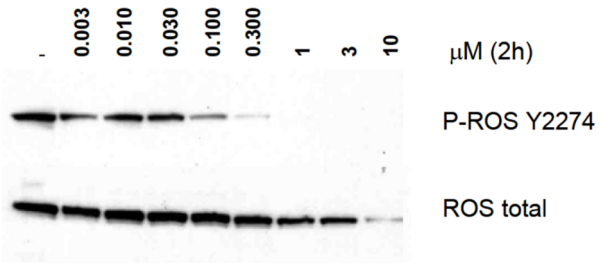
エヌトレクチニブについては，*ETV6-NTRK3*を発現する急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91においても細胞周期とアポトーシス誘導について調べており，G1期における細胞周期の停止とアポトーシスの誘導（sub-G1の増加，カスパーゼ3の活性化及び PARP の分解）が認められた。

2.6.2.2.3.2 ROS1融合蛋白質依存性細胞に対する作用

（資料番号4.2.1.1-21）

*TEL-ROS1*融合遺伝子を Ba/F3細胞に導入して作製した細胞株（Ba/F3_*TEL-ROS1*）を用いて，ROS1リン酸化に対するエヌトレクチニブの作用を調べた。Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞をエヌトレクチニブ共存下で2時間培養し，ROS1リン酸化の状態について，ウエスタンブロットを用いて調べたところ，エヌトレクチニブ処理により，ROS1のリン酸化が濃度依存的に阻害された（図 2.6.2.2.3.2-1）。

図 2.6.2.2.3.2-1 *ROS1*融合遺伝子導入 Ba/F3細胞の ROS1リン酸化に対するエヌトレクチニブの作用



【4.2.1.1-21 Figure 1を改変】

2.6.2.2.4 *In vivo* 抗腫瘍活性

TRK 又は ROS1融合蛋白質を発現する様々な組織型の腫瘍細胞及び融合遺伝子導入細胞をマウスに移植し，エヌトレクチニブの *in vivo* 抗腫瘍活性を調べた。

- TRK 融合蛋白質依存的に増殖するヒト腫瘍細胞株を用いた皮下移植モデル
  KM12（*TPM3-NTRK1*，結腸直腸癌細胞株）[4]，
  KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*，KM12にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株），
  CUTO-3（*MPRIP-NTRK1*，非小細胞肺癌細胞株）[5]，
  IMS-M2（*ETV6-NTRK3*，急性骨髄性白血病細胞株）[6]，
  MO-91（*ETV6-NTRK3*，急性骨髄性白血病細胞株）[6]
- TRK 融合蛋白質依存的に増殖する患者由来腫瘍の皮下移植モデル
  CTG-0798（*ETV6-NTRK3*，頭頸部癌，PDX），
  G002（*TPM3-NTRK1*，肉腫，PDX）
- ROS1融合蛋白質依存的に増殖する皮下移植モデル
  Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞（*TEL-ROS1*を導入したマウス Ba/F3細胞），
  CTG-0848（*CD74-ROS1*，非小細胞肺癌，PDX），
  LU-01-0414（*SDC4-ROS1*，非小細胞肺癌，PDX）
- 頭蓋内移植モデル
  BNN4，BNN2（*BCAN-NTRK1*を導入したマウス神経膠腫細胞株），
  KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*，KM12にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株），
  NCI-H2228（*EML4-ALK*，非小細胞肺癌細胞株）[7),8)]

2.6.2.2.4.1 TRK 融合蛋白質依存性モデル

(1) KM12（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌細胞株

（資料番号4.2.1.1-10，4.2.1.1-11）

KM12細胞のマウス皮下移植モデルを用いて，エヌトレクチニブの投与量と腫瘍増殖抑制活性との関係を調べた。KM12細胞を雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植し（Matrigel®使用），7日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約130 mm^3），群分け日から溶媒又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14日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。本項以降で，腫瘍増殖抑制活性の指標として用いた腫瘍増殖阻害率（TGI）及び腫瘍阻害率（TI）の算出式を以下に示す（CTG-0798等，一部の PDX モデルを除く）。

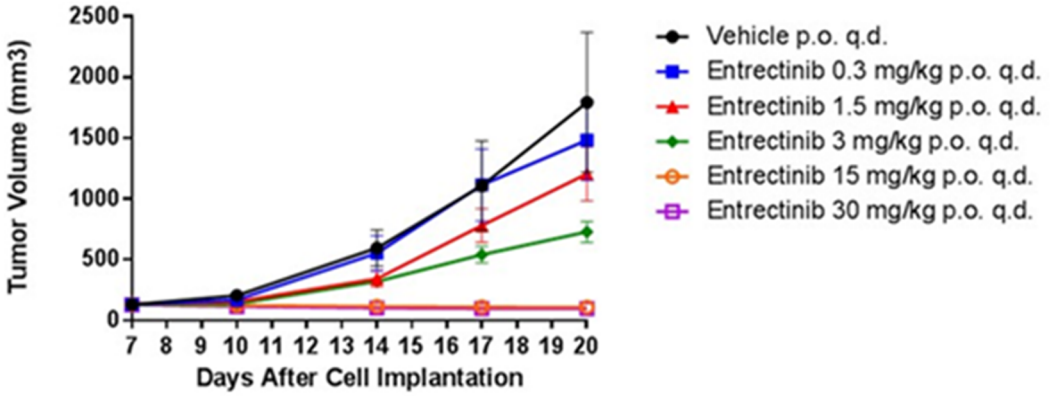
$$\text{TGI（\%）} = \frac{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$$

$$\text{TI（\%）} = 100 - \frac{\text{各投与群の腫瘍体積平均値}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値}} \times 100$$

エヌトレクチニブ0.3 mg/kg，1.5 mg/kg 及び3 mg/kg 投与群の day 20における TGI は，順に19%，36%及び64%であった。また，15 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群での TGI は101%及び102%であり，腫瘍の退縮が認められた。腫瘍細胞移植後20日（day 20）の腫瘍体積に基づいて，50%抑制用量及び90%抑制用量を算出したところ，順に2.35 mg/kg 及び6.23 mg/kg であった。

本試験では，いずれの投与群においてもエヌトレクチニブのマウス体重に対する影響は認められず，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.1-1 KM12細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-10 Figure 1再掲】

KM12細胞を雄ヌードマウス腹部皮下に移植したモデルでは，エヌトレクチニブ30及び60 mg/kg を1日2回10日間経口投与した試験及びエヌトレクチニブ15 mg/kg を1日2回10日間経口投与した試験を実施しており，エヌトレクチニブ30 mg/kg 及び60 mg/kg 投与群の TI（day 18）は順に93%及び94%，エヌトレクチニブ15 mg/kg 投与群の TI（day 18）は94%であった。前記の試験と同様，強い増殖抑制活性を示すとともに，マウス体重の明らかな減少は認められず，マウスにおける忍容性が認められた。

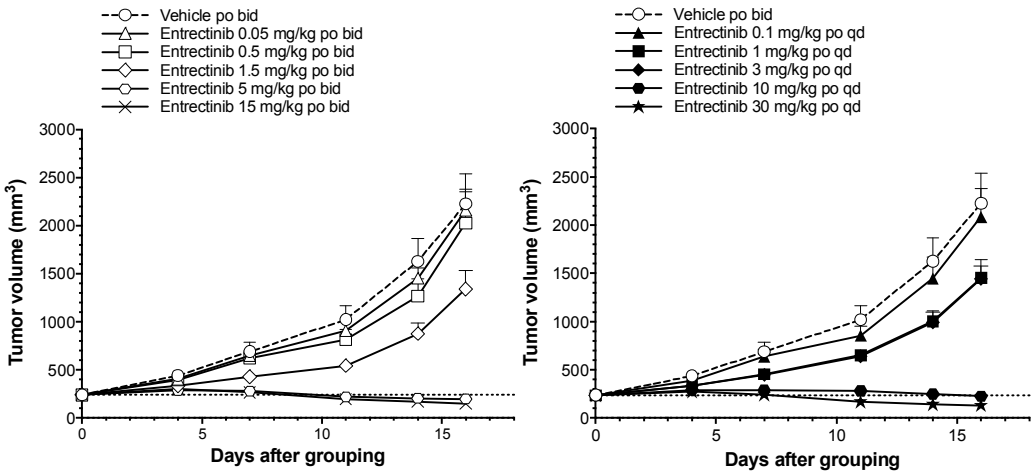
(2) KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌細胞株

（資料番号4.2.1.1-12）

KM12-Luc 細胞（KM12にルシフェラーゼ遺伝子を導入した細胞株）を雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり5 × 10^6個移植し，14日後に11群に割付した（1群10匹，平均腫瘍体積238 mm^3）。群分けの翌日から溶媒又はエヌトレクチニブを15日間経口投与し，エヌトレクチニブ1日1回（0.1，1，3，10及び30 mg/kg）投与と1日2回（0.05，0.5，1.5，5及び15 mg/kg，各回の投与量は1日1回の1/2）投与での腫瘍増殖抑制活性を比較した。

エヌトレクチニブの1日1回投与と1日2回投与は，本モデルにおいて，用量依存的であり，1日投与量が同じ投与群間では，ほぼ同等の腫瘍増殖抑制活性を示した。また，先に示したKM12細胞に対する1日1回投与データ（図 2.6.2.2.4.1-1）とも同様の結果であり，1 mg/kg（1日1回）未満では効果を示さず，3 mg/kg（1日1回）又は1.5 mg/kg（1日2回）で中程度の腫瘍増殖抑制活性を示し（TGI は順に39%及び45%），10 mg/kg（1日1回）又は5 mg/kg（1日2回）以上では腫瘍の退縮をもたらした（TGI は100%以上）。この結果は，投与頻度を1日2回に増やした場合であっても，ヒト腫瘍を移植したマウスモデルにおける腫瘍増殖抑制効果の向上には結びつかないことを示しており，エヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制効果を維持するためには，1日1回の投与で十分であることが明らかになった。

図 2.6.2.2.4.1-2 KM12-Luc 細胞移植モデルにおけるエヌトレクチニブ1日1回投与と1日2回投与（各回の投与量は1/2）の腫瘍増殖抑制活性



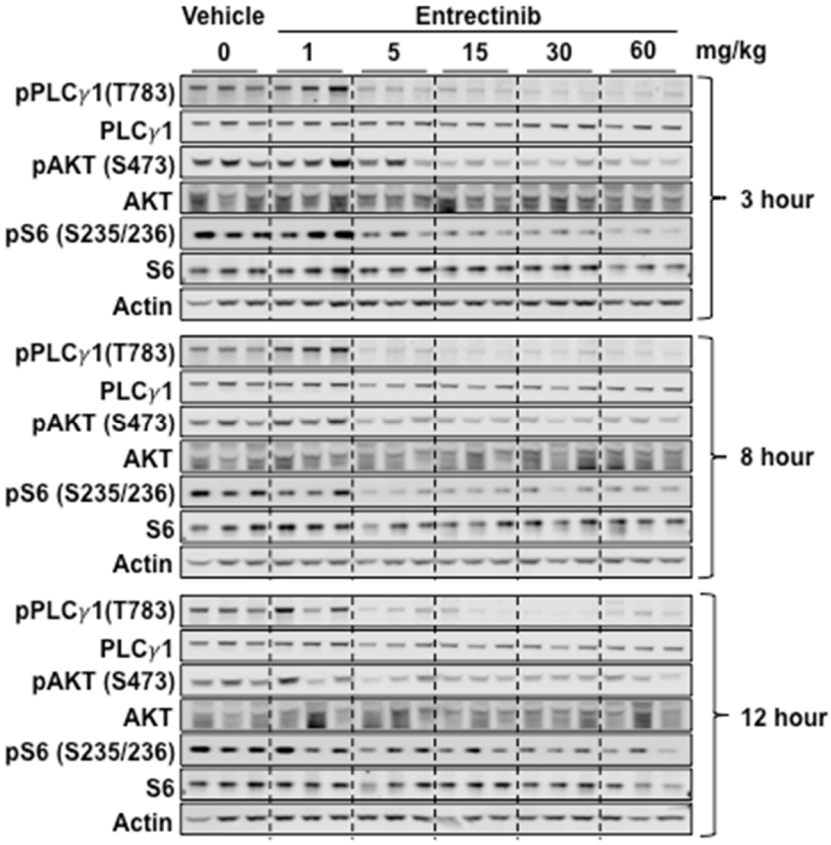
表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-12 In-Life Phase Report Figure 3再掲】

TRKA の下流シグナル伝達に対する阻害活性と腫瘍増殖抑制活性との相関を明らかにするため，KM12-Luc 細胞を皮下に移植したマウスモデルを用いて，エヌトレクチニブの薬力学的作用について調べた。本試験では，エヌトレクチニブの血中濃度推移を測定しており，その結果を2.6.4.3.3に記載した。

KM12-Luc 細胞を雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり5 × 10^6個移植し，17日後に6群に割付けし（平均腫瘍体積464 mm^3），翌日から溶媒又はエヌトレクチニブ1，5，15，30及び60 mg/kg を1日2回計3回経口投与した。最終投与の3，8及び12時間後に腫瘍を採取後，TRKA の主要なシグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化をウエスタンブロットにより評価した。エヌトレクチニブは，5 mg/kg 以上の用量において，PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化を用量依存的に阻害した（図 2.6.2.2.4.1-3）。TRKA シグナル伝達系に対するエヌトレクチニブの阻害効果は，8時間目まで維持された。12時間目には緩やかに回復し，特にシグナル伝達の下流に位置する S6でその傾向が認められた。これらの結果は，KM12細胞の移植モデルにおいて，1 mg/kg（1日1回）未満では腫瘍増殖抑制効果を示さないが，10 mg/kg 以上の用量では，最大活性を示すことと一致している。したがって，エヌトレクチニブによるシグナル伝達抑制活性と腫瘍増殖抑制活性は，連関していることが示された。

図 2.6.2.2.4.1-3 KM12-Luc 細胞皮下移植モデルにおける TRKA の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薬力学的作用



KM12-Luc 細胞を皮下移植したマウスに溶媒又はエヌトレクチニブ（1，5，15，30及び60 mg/kg）を1日2回のスケジュールで3回投与し，最終投与の3，8及び12時間後に腫瘍を採取した。腫瘍細胞を溶解し，TRK の下流シグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。

【4.2.1.1-12 Pharmacodynamics Phase Report Figure 1再掲】

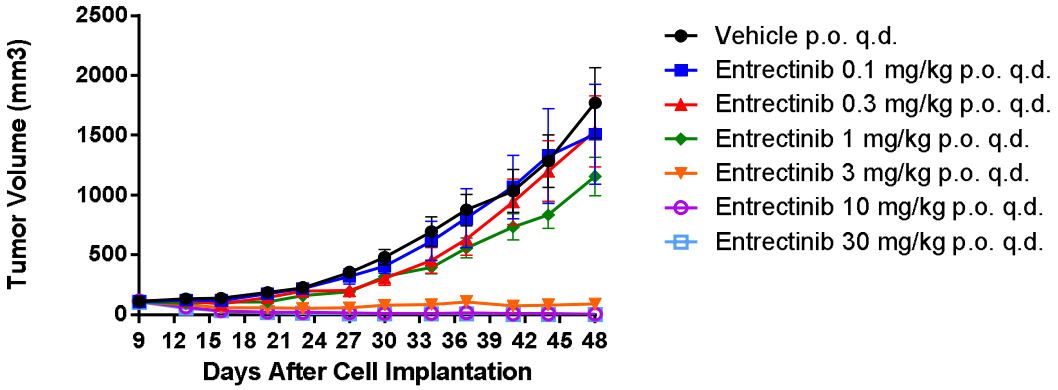
(3) CUTO-3（*MPRIP-NTRK1*）非小細胞肺癌細胞株

（資料番号4.2.1.1-13）

CUTO-3細胞を雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり2 × 10^6個移植し（Matrigel®使用），9日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約130 mm^3），群分け日から溶媒又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39日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブ0.1 mg/kg，0.3 mg/kg 及び1 mg/kg 投与群の day 48における TGI は，順に16%，14%及び37%であり，0.1 mg/kg 及び0.3 mg/kg 投与群ではほとんど腫瘍増殖抑制活性を示さなかった。3 mg/kg では，強い腫瘍増殖抑制活性（TGI = 101%）を示し，10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群では，投与腫瘍が完全に退縮した例も認められ（TGI は，107%及び106%），溶媒投与群に対し，有意な腫瘍増殖抑制活性を示した（$P < 0.05$，two-way ANOVA）。Day 23の腫瘍体積に基づいて，50%抑制用量及び90%抑制用量を算出したところ，順に1.5 mg/kg 及び3.5 mg/kg であった。また，マウス体重は，いずれの投与群においても増加傾向にあり，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.1-4 CUTO-3細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-13 Figure 2を改変】

(4) IMS-M2（*ETV6-NTRK3*）急性骨髄性白血病細胞株

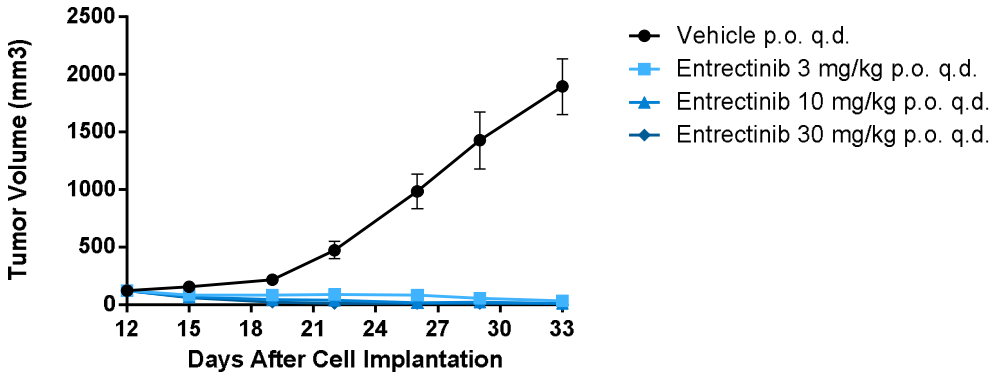
（資料番号4.2.1.1-14，4.2.1.1-15）

1) 用量依存性試験

IMS-M2細胞を雌 CB.17 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植し（Matrigel®使用），12日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約120 mm^3），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ3，10及び30 mg/kg を1日1回21日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブ3 mg/kg，10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群の day 33における TGI は，順に105%，106%及び107%であり，いずれの投与群においても TGI が100%を超える強い腫瘍増殖抑制活性を示した。また，投与期間中マウスの体重は減少することなく維持されたことから，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.1-5 IMS-M2細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

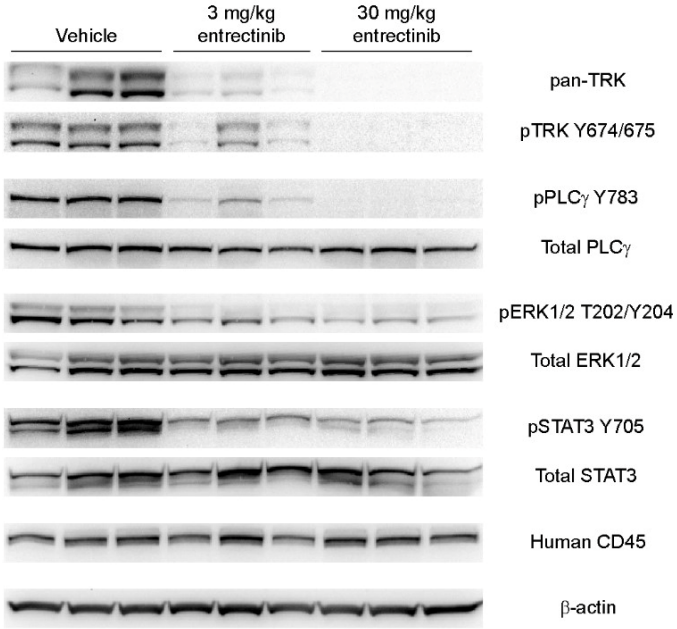
【4.2.1.1-15 Figure 1を改変】

2) TRK 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化

IMS-M2移植モデルを用いて，PD マーカーである TRK 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する作用を検討した。同様の手法により IMS-M2を移植した CB.17 SCID マウスに溶媒又はエヌトレクチニブ3，30 mg/kg（1群3匹）を経口投与し，4時間後に腫瘍を採取し，tumor lysate 中の ETV6-TRKC リン酸化，及びシグナル伝達系の中で TRK の下流に位置する PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化について検討した。

3 mg/kg 投与群では，ETV6-TRKC のリン酸化及び総 TRK の減少が認められ，30 mg/kg 投与群では消失した。また，TRK 下流のシグナル伝達分子である PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化は，エヌトレクチニブの投与により著しく低下した。

図 2.6.2.2.4.1-6 IMS-M2細胞移植モデルにおける TRKC 及び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



IMS-M2細胞を移植したマウスに溶媒又はエヌトレクチニブ（3又は30 mg/kg）を単回投与し，4時間後に腫瘍を採取した。腫瘍細胞を溶解し，TRK 及び下流シグナル伝達分子である PLCγ，ERK1/2及び STAT3の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。腫瘍細胞に発現するヒト CD45を検出することで，各レーンにローディングする蛋白量が同様になるように調整した。また，β アクチンをローディングコントロールとして用いた。

【4.2.1.1-14 Figure 7を改変】

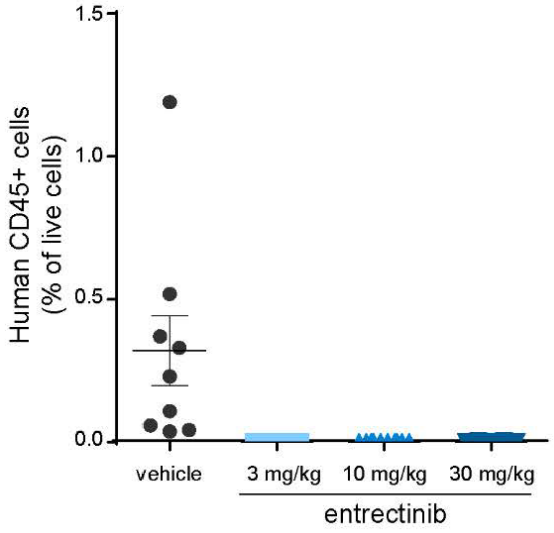
3) 骨髄中での同所性増殖

IMS-M2皮下移植モデルでは，急性骨髄性白血病細胞としての発生母地である骨髄組織に浸潤し，同所性の増殖が認められることから，骨髄中でのヒト CD45陽性細胞数を指標としてエヌトレクチニブ投与による骨髄での腫瘍増殖抑制活性を検討した。

IMS-M2を移植した CB.17 SCID マウスに溶媒又はエヌトレクチニブ3，10及び30 mg/kg を1日1回21日間（1群9～10匹）経口投与した後，大腿骨から骨髄を採取し，ヒト CD45陽性マウス CD45陰性細胞の細胞数を計測した。

図 2.6.2.2.4.1-7に示すように溶媒投与群では，マウス骨髄組織中にヒト CD45陽性細胞が認められるが，エヌトレクチニブ投与群（3，10及び30 mg/kg）では，骨髄中にヒト CD45陽性細胞は検出されなかった。

図 2.6.2.2.4.1-7 IMS-M2細胞移植モデルでの骨髄中腫瘍細胞数に対するエヌトレクチニブの抑制活性



表示は，個別値及び各群の平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-14 Figure 8C 再掲】

(5) MO-91（*ETV6-NTRK3*）急性骨髄性白血病細胞株

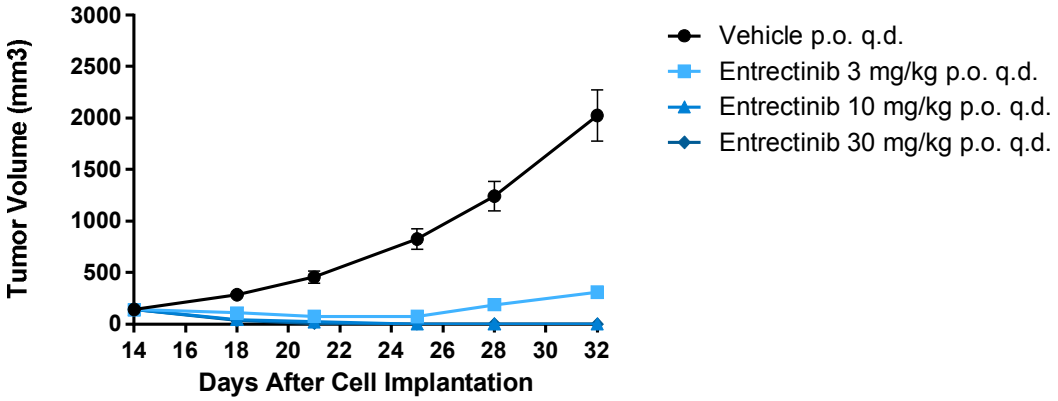
（資料番号4.2.1.1-14，4.2.1.1-16）

1) 用量依存性試験

MO-91細胞を雌 CB.17 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植し（Matrigel®使用），14日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約140 mm^3），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ3，10及び30 mg/kg を1日1回18日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブ3 mg/kg 投与群の day 32における TGI は91%，10 mg/kg，30 mg/kg の TGI は100%を超え腫瘍の退縮が認められた。また，投与期間中マウスの体重は維持され，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.1-8 MO-91細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

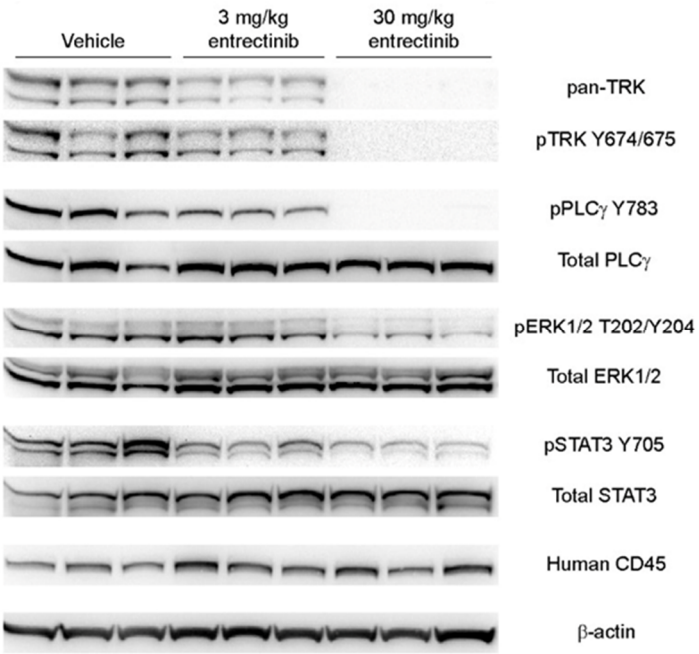
【4.2.1.1-16 Figure 1を改変】

2) TRK 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化

MO-91移植モデルを用いて PD マーカーである TRK 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する作用を検討した。同様の手法により MO-91を移植した CB.17 SCID マウスに溶媒又はエヌトレクチニブ3及び30 mg/kg（1群3匹）を経口投与し，4時間後に腫瘍を採取し，tumor lysate 中の ETV6-TRKC リン酸化，及びシグナル伝達系の中で TRK の下流に位置する PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化について検討した。

3 mg/kg 投与群では，ETV6-TRKC のリン酸化及び総 TRK の減少が認められ，30 mg/kg 投与群では消失した。また，TRK 下流のシグナル伝達分子である PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化は，エヌトレクチニブの投与により著しく低下した。

図 2.6.2.2.4.1-9 MO-91細胞移植モデルにおける TRKC 及び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



MO-91細胞を移植したマウスに溶媒又はエヌトレクチニブ（3又は30 mg/kg）を単回投与し，4時間後に腫瘍を採取した。腫瘍細胞を溶解し，TRK 及び下流シグナル伝達分子である PLCγ，ERK1/2及び STAT3の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。腫瘍細胞に発現するヒト CD45を検出することで，各レーンにローディングする蛋白量が同様になるように調整した。また，β アクチンをローディングコントロールとして用いた。

【4.2.1.1-14 Figure 7を改変】

(6) CTG-0798（*ETV6-NTRK3*）患者由来頭頸部癌（PDX）

（資料番号4.2.1.1-17，4.2.1.1-18）

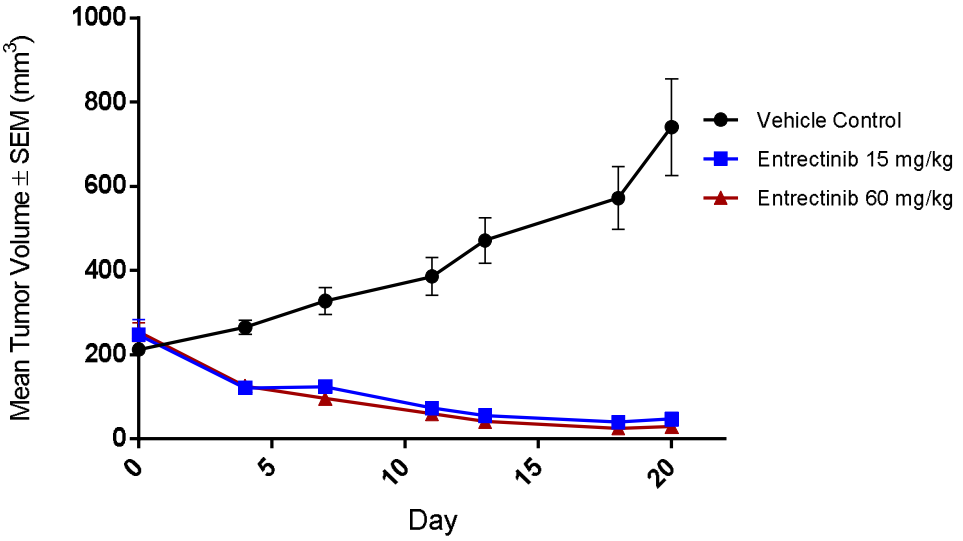
CTG-0798腫瘍のブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植し，100～300 mm^3に達した時点で各群の平均腫瘍体積が同様になるように割り付けた後（1群10匹），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ15及び60 mg/kg を1日2回21日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。本項並びに CTG-0848及び LU-01-0414の項では，TGI の算出法として以下の式を用いた。

$$\text{TGI（\%）} = 100 - \frac{\text{各投与群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値（群分け時）}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{対照群の腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$$

エヌトレクチニブ15 mg/kg，60 mg/kg 投与群の day 20における TGI は，順に146%及び149%

であり，溶媒投与群に対し，有意な腫瘍増殖抑制活性を示した（P ≤ 0.0001，one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test）。

図 2.6.2.2.4.1-10 CTG-0798細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-17 Figure 4を改変】

本モデルを用いて，エヌトレクチニブを長期投与した時の腫瘍増殖抑制活性についても検討した。

CTG-0798腫瘍のブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植し，150～300 mm^3に達した時点で各群の平均腫瘍体積が同様になるように割り付けた後（1群8匹），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ15 mg/kg を1日1回57日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブを day 56まで連日投与した後，day 119まで経時的に観察したが，試験最終日まで腫瘍が退縮した状態を維持した。

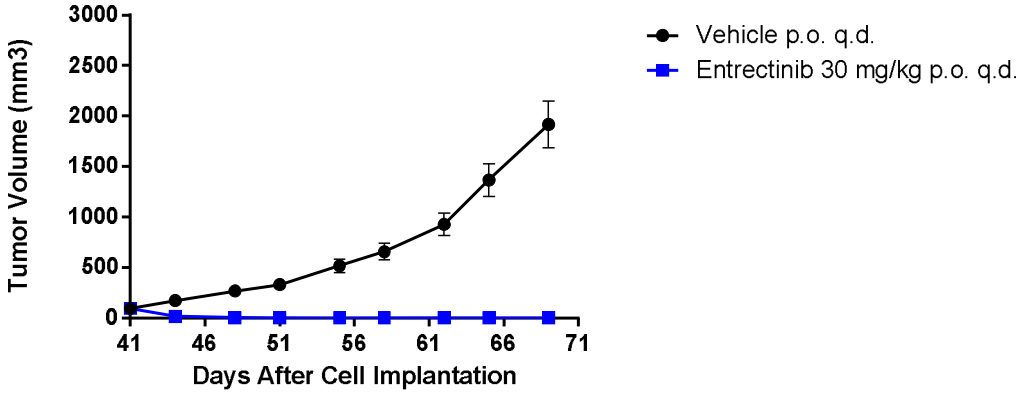
(7) G002（*TPM3-NTRK1*）患者由来肉腫（PDX）

（資料番号4.2.1.1-19，4.2.1.1-20）

G002細胞を雌 CB17. SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1×10^6個移植し（Matrigel®使用），41日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約100 mm^3），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ30 mg/kg を1日1回28日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブ30 mg/kg を投与開始後，最初の計測日（day 44）以降，強い腫瘍増殖抑制活性を示し，試験最終日まで TGI は100%以上を維持した。また，投与期間中マウスの体重は維持され，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.1-11 G002細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

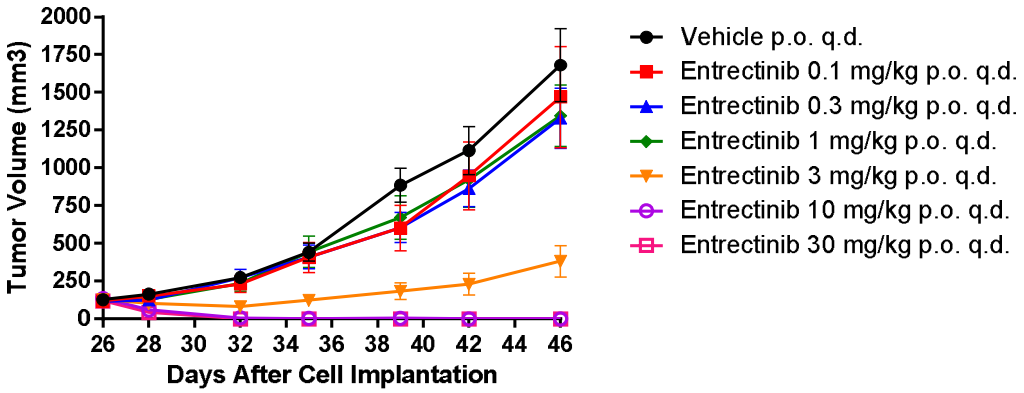
【4.2.1.1-19 Figure 1を改変】

本 PDX モデルを用いて，エヌトレクチニブの用量依存性を評価した。

G002細胞を雌 CB17. SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり 1×10^6個移植し（Matrigel®使用），26日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約125 mm^3），群分け日から溶媒又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20日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブ0.1～1 mg/kg 投与群では腫瘍増殖をほとんど抑制しなかったが，3 mg/kg，10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群では，溶媒投与群と比較し統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性を示し（$P < 0.05$，two way ANOVA），day 46における TGI は順に84%，109%及び108%であった。Day 46の腫瘍体積に基づいて，50%抑制用量及び90%抑制用量を算出したところ，順に2.318 mg/kg 及び3.921 mg/kg であった。また，投与期間中マウスの体重は維持され，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.1-12 G002細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-20 Figure 1を改変】

2.6.2.2.4.2 ROS1融合蛋白質依存性モデル

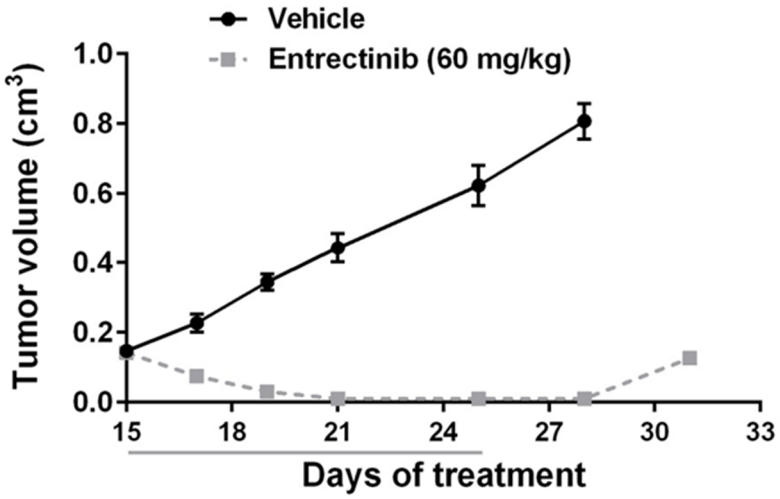
(1) *ROS1*融合遺伝子導入 Ba/F3細胞株

（資料番号4.2.1.1-21）

Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞を雌 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり5 × 10^5個移植し，15日後に各群の平均腫瘍体積が同様になるように割り付けた後（1群6匹，平均腫瘍体積は0.14 cm^3），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ60 mg/kg を1日2回10日間経口投与した。腫瘍体積及び体重は，少なくとも週2回計測した。

エヌトレクチニブ投与により，Ba/F3_*TEL-ROS1*の増殖が抑制され，腫瘍の退縮が認められた。また，投与期間中に体重が減少したマウスはおらず，忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.2-1 Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞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



表示は，平均値 ± 標準偏差。図の横軸下のバーは，投与期間を示す。

【4.2.1.1-21 Figure 2を改変】

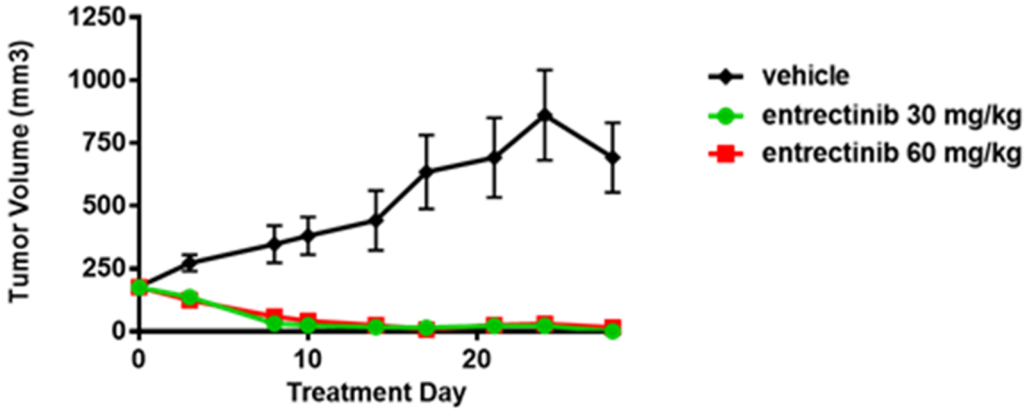
(2) CTG-0848（*CD74-ROS1*）患者由来非小細胞肺癌（PDX）

（資料番号4.2.1.1-22）

CTG-0848腫瘍のブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植し，150～300 mm^3に達した時点で各群の平均腫瘍体積が同様になるように割り付けた後（1群8匹），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ30及び60 mg/kg を1日2回29日間（ただし，day 0と day 28は1回のため，合計56回）経口投与した。腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。

エヌトレクチニブ30 mg/kg 及び60 mg/kg 投与群では，溶媒投与の対照群と比較し，統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性が認められ（$P < 0.001$，one-way ANOVA，Newman-Keuls multiple comparison test），day 28における TGI は順に134%及び131%であり，両投与群ともに，腫瘍が完全に退縮後，試験最終日まで維持した例が認められた。また，対照群を含めた3群は，試験期間中を通じて同様の体重増加傾向を示したことから，エヌトレクチニブ投与に対する忍容性が認められた。

図 2.6.2.2.4.2-2 CTG-0848細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-22 Figure 2を改変】

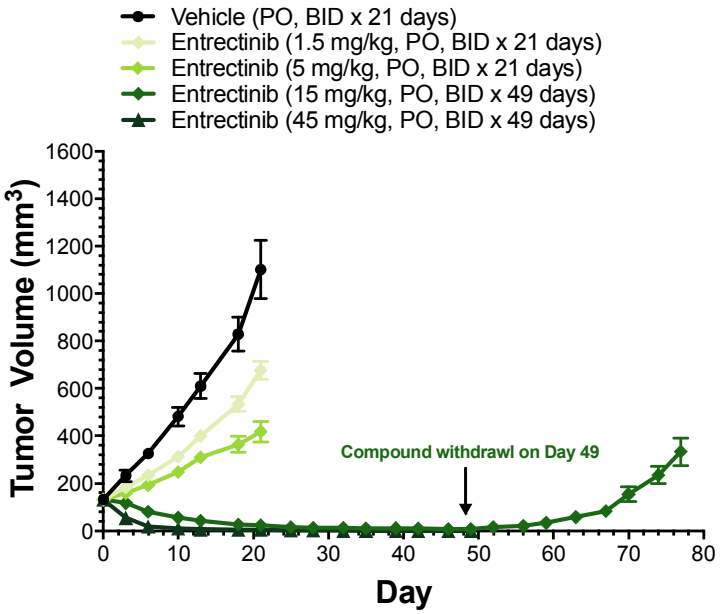
(3) LU-01-0414（*SDC4-ROS1*）患者由来非小細胞肺癌（PDX）

（資料番号4.2.1.1-23）

LU-01-0414腫瘍のブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植し，100～200 mm^3に達した時点で無作為割付後（1群10匹），群分け日から溶媒又はエヌトレクチニブ1.5，5 mg/kg を1日2回21日間，15及び45 mg/kg を1日2回49日間経口投与した。腫瘍体積は週2回，体重は毎日計測した。

エヌトレクチニブ1.5，5，15及び45 mg/kg 投与群の day 21における TGI は，順に44%，70%，111%及び113%であり，用量依存的な腫瘍増殖抑制活性を示した（図 2.6.2.2.4.2-3）。また，投与期間中に投薬に伴う体重減少が認められた投与群はなかった。

図 2.6.2.2.4.2-3 LU-01-0414細胞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



表示は，平均値 ± 標準誤差。

【4.2.1.1-23 Figure 3を改変】

2.6.2.2.4.3 頭蓋内移植モデル

マウス頭蓋内に腫瘍細胞を移植したモデルは，中枢神経系に発生あるいは転移した腫瘍に対し，薬物の血液脳関門透過性を含めた抗腫瘍効果を評価するために用いられている。本項では，マウス神経膠腫細胞株 BNN4及び BNN2（いずれも *BCAN-NTRK1*），ヒト結腸直腸癌細胞株 KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*），並びにヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H2228（*EML4-ALK*）をマウス頭蓋内に移植したモデルを用いて，エヌトレクチニブの抗腫瘍効果を評価した。

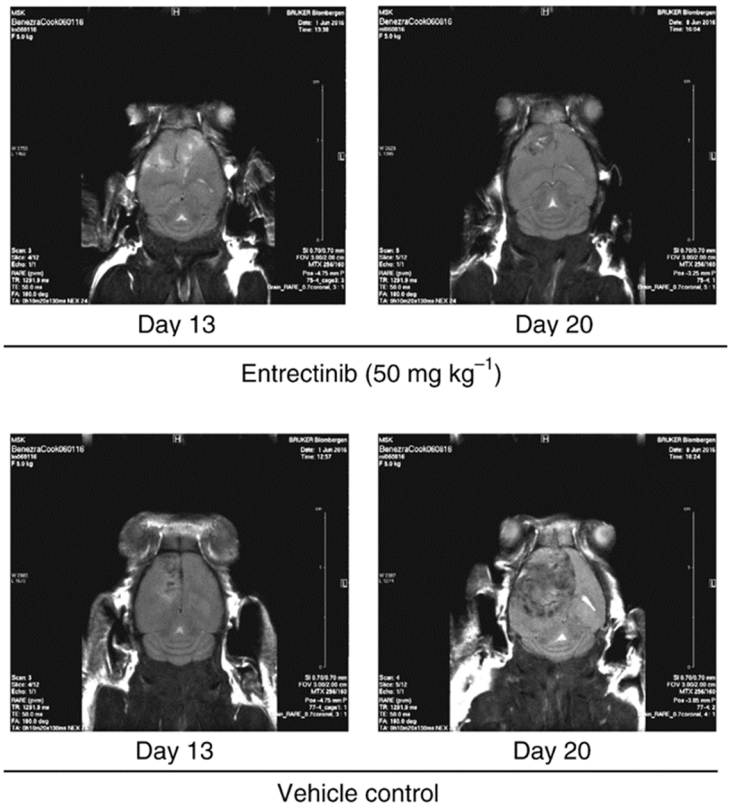
(1) BNN4及び BNN2（*BCAN-NTRK1*）神経膠腫移植モデル

（資料番号4.2.1.1-24）

BNN4及び BNN2細胞は，$p53^{-/-}$のマウスから採取した神経幹細胞に *BCAN-NTRK1*融合遺伝子を導入することで発生した神経膠腫から樹立した細胞株である。BNN4細胞株を雌ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり5×10^5個移植し，12日後から溶媒又はエヌトレクチニブ50 mg/kg を1日1回14日間経口投与した。本試験では，小動物用 MRI（核磁気共鳴画像法）を用いて，頭蓋内での腫瘍増殖を調べており，day 13及び day 20における MRI 画像から，エヌトレクチニブ投与群では，対照群に比較し，腫瘍増殖の抑制が認められた（図 2.6.2.2.4.3-1）。

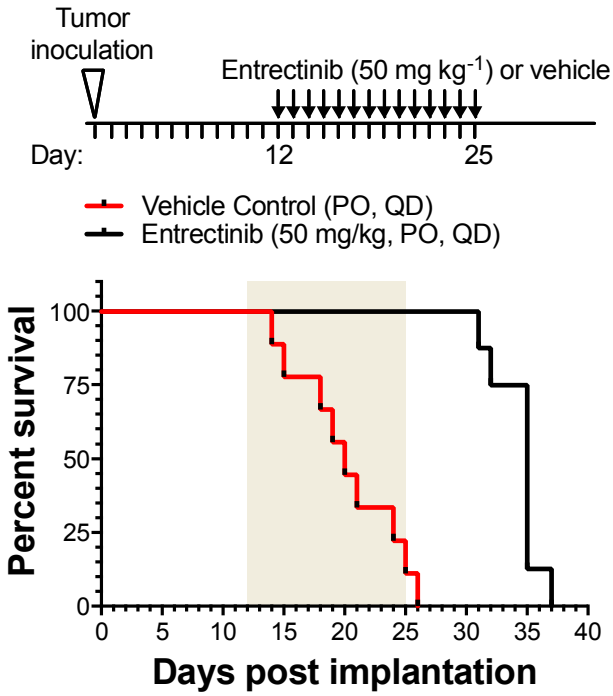
エヌトレクチニブ投与期間中（day 12～day 25）に，溶媒を投与した対照群では腫瘍のため，ほとんどの個体は死亡したが，エヌトレクチニブ投与群では投与期間中に死亡例はなく，対照群に比較し有意に生存期間が延長された（図 2.6.2.2.4.3-2，$P < 0.0001$，log-rank test）。なお，BNN2細胞をマウス頭蓋内に移植した試験においても，エヌトレクチニブによる生存期間の延長が認められた。

図 2.6.2.2.4.3-1 BNN4細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果
– MRI 画像による比較



【4.2.1.1-24 Figure 4e 再掲】

図 2.6.2.2.4.3-2 BNN4細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果
– 生存期間の Kaplan-Meier 曲線



【4.2.1.1-24 Figure 4C を改変】

(2) KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌移植モデル

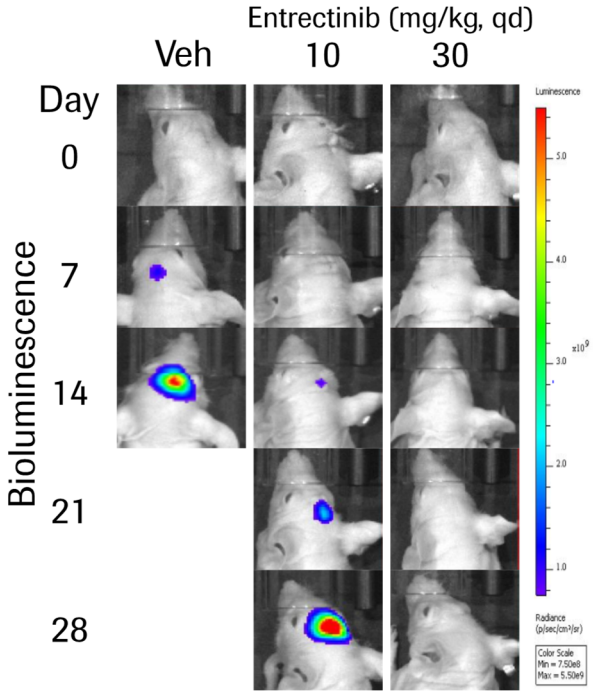
（資料番号4.2.1.1-25，4.2.1.1-26）

頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果について，用量依存性を検討する試験を実施した。KM12-Luc 細胞を雌ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり3 × 10^4個移植し，5日後にルシフェラーゼによる生物発光強度と体重に基づいて無作為割付し（1群9匹），翌日からエヌトレクチニブを1日2回1，5，15及び60 mg/kg，又は1日1回10及び30 mg/kg の条件で28日間経口投与した。ルシフェラーゼによる生物発光を指標として腫瘍の増殖を経時的に観察し，生存期間を調べた。

本モデルにおいて，エヌトレクチニブは，頭蓋内での腫瘍増殖を用量依存的に抑制するとともに，マウスの生存期間を延長した（図 2.6.2.2.4.3-3及び図 2.6.2.2.4.3-4）。1日2回投与では5 mg/kg 以上，1日1回投与では10 mg/kg 以上の投与群で腫瘍増殖を抑制し，最大活性を示したのは，1日2回60 mg/kg 投与群であった。また，溶媒投与群では，17日目までに全例が腫瘍死したか又は体重減少が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 以上の投与群では，試験終了の28日目まで全個体が生存していた。

本試験とは別に，KM12-Luc 細胞を頭蓋内に移植し，エヌトレクチニブを1日2回60 mg/kg 経口投与した試験を実施しており，本試験と同様の強い腫瘍増殖抑制活性と生存期間の延長が認められた。これらの結果から，エヌトレクチニブは，脳内に移植した腫瘍に対し，用量依存的な増殖抑制活性を示すことが明らかになった。

図 2.6.2.2.4.3-3 KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 –ルシフェラーゼによる生物発光での比較

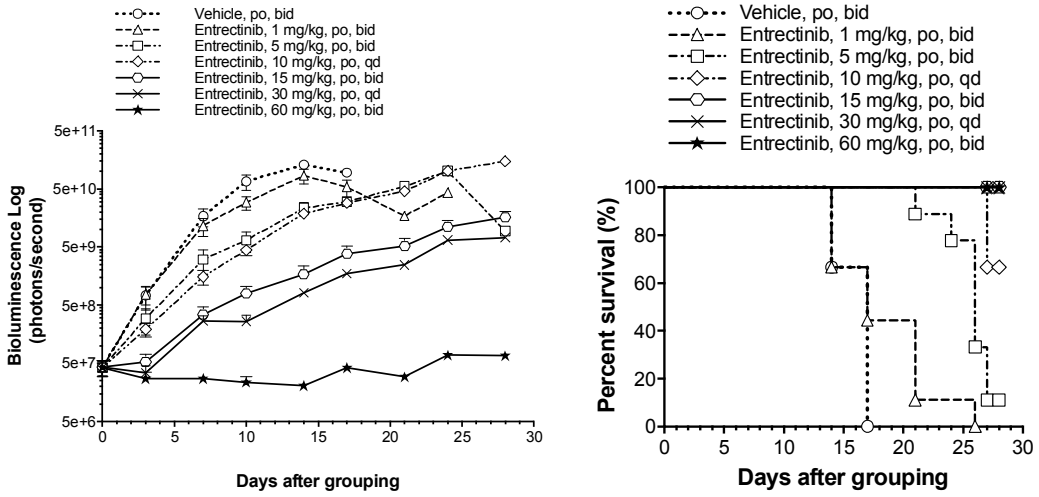


qd：1日1回投与，Veh：溶媒

KM12-Luc 細胞をマウス頭蓋内に移植し，溶媒又はエヌトレクチニブを1日1回又は2回28日間投与した。溶媒投与群とエヌトレクチニブ投与群（10又は30 mg/kg，1日1回経口投与）について，ルシフェラーゼによる生物発光強度を調べた。その代表例を示す。

【4.2.1.1-25 In-Life Phase Report 8.6項の図を改変】

図 2.6.2.2.4.3-4 KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 – ルシフェラーゼ発光を指標とした腫瘍増殖抑制効果と生存期間の延長



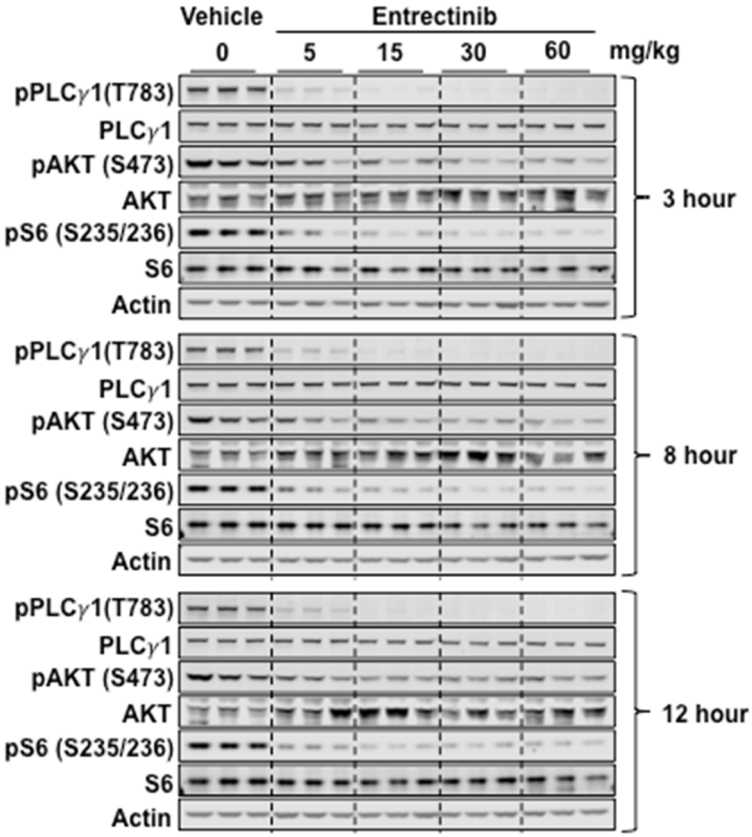
qd：1日1回投与，bid：1日2回投与，po：経口投与
KM12-Luc 細胞をマウス頭蓋内に移植後，溶媒又はエヌトレクチニブを1日1回又は2回28日間投与した。左図は，ルシフェラーゼの生物発光強度を指標にした腫瘍増殖抑制活性（表示は，平均値 ± 標準誤差），右図は，生存率の Kaplan-Meier 曲線を示す。

【4.2.1.1-25 In-Life Phase Report Figure 3及び Figure 4再掲】

TRKA の下流シグナル伝達に対する阻害活性と腫瘍増殖抑制活性との相関を明らかにするため，KM12-Luc 細胞を頭蓋内に移植したマウスモデルを用いて，エヌトレクチニブの薬力学的作用について調べた。本試験では，エヌトレクチニブの血中濃度推移を測定しており，その結果を2.6.4.3.3に記載した。

KM12-Luc 細胞を雌ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり3 × 10^4個移植し，11日後にルシフェラーゼ発光量に基づいて5群に無作為割付し，翌日から溶媒又はエヌトレクチニブ5，15，30及び60 mg/kg を1日2回計3回経口投与した。最終投与の3，8及び12時間後に腫瘍を採取後，TRKA の主要なシグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化をウエスタンブロットにより評価した。皮下移植モデルでの結果（図 2.6.2.2.4.1-3）と同様，エヌトレクチニブは，5 mg/kg 以上の用量において，PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化を用量依存的に阻害した（図 2.6.2.2.4.3-5）。TRKA シグナル伝達系に対するエヌトレクチニブの阻害効果は，8時間目まで維持され，12時間目には緩やかな回復傾向が認められた。これらの結果は，KM12細胞の頭蓋内移植モデルにおいて，5 mg/kg（1日2回）未満では腫瘍増殖抑制効果を示さないが，15 mg/kg 以上の用量では，強い腫瘍増殖抑制活性を示し，マウスの生存率を改善させることと一致している。したがって，エヌトレクチニブによる頭蓋内腫瘍に対するシグナル伝達抑制活性と腫瘍増殖抑制活性は，連関していることが示された。

図 2.6.2.2.4.3-5 KM12-Luc 細胞頭蓋内移植モデルにおける TRKA の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薬力学的作用



KM12-Luc 細胞を頭蓋内移植したマウスに溶媒又はエヌトレクチニブ（5，15，30及び60 mg/kg）を1日2回のスケジュールで3回投与し，最終投与の3，8及び12時間後に腫瘍を採取した。腫瘍細胞を溶解し，TRK の下流シグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。

【4.2.1.1-25 Pharmacodynamics Phase Report Figure 1再掲】

(3) NCI-H2228（*EML4-ALK*）非小細胞肺癌移植モデル

（資料番号4.2.1.1-27）

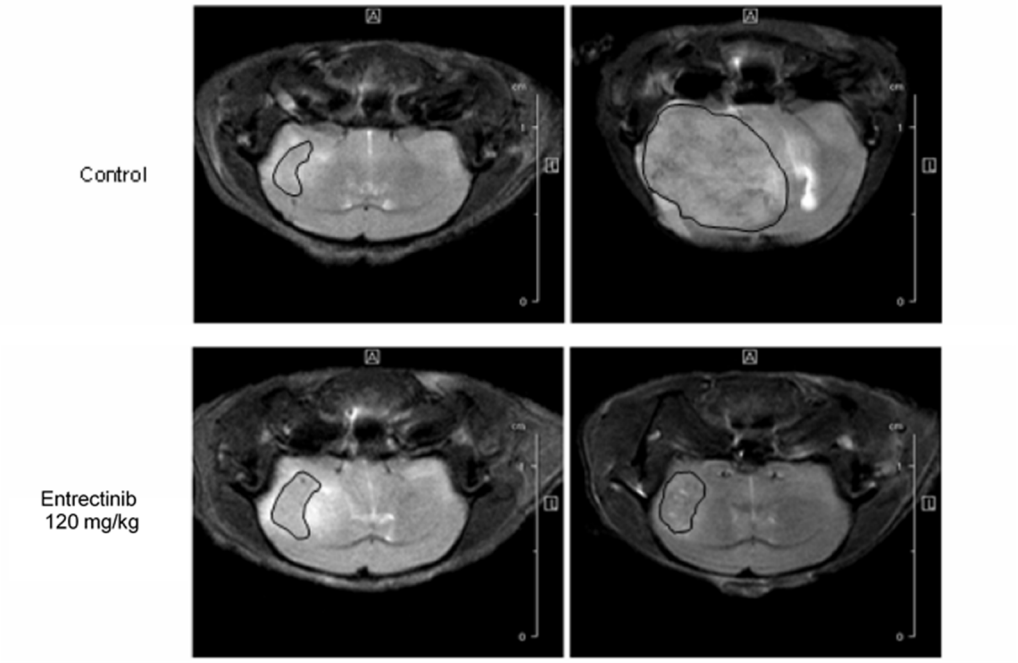
NCI-H2228細胞は，*EML4-ALK* 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌細胞株であり，本細胞株に対し，エヌトレクチニブは *in vitro* にて増殖抑制活性を示す（IC_{50} = 68 nmol/L）。NCI-H2228細胞を頭蓋内に移植することで，腫瘍の脳転移モデルを作製し，エヌトレクチニブによる抗腫瘍効果を検討した。

NCI-H2228細胞を雄ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり2 × 10^6個移植し，MRI を用いて腫瘍体積を計測し，平均腫瘍体積が0.015～0.018 cm^3に達した day 18から，溶媒又はエヌトレクチニブ60，120 mg/kg を1日2回10日間経口投与した（溶媒群6匹，各エヌトレクチニブ投与群7匹）。

頭蓋内に移植した腫瘍は，T2強調画像において，高信号領域である浮腫に囲まれた等信号領域として検出し，腫瘍体積を算出した。投与前後における MRI 画像から，頭蓋内におけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性が認められた（図 2.6.2.2.4.3-6）。投与開始日における腫瘍体積を基準として，腫瘍体積の増加率を経時的に測定した結果を図 2.6.2.2.4.3-7に示した。両エヌトレクチニブ投与群（60 mg/kg，120 mg/kg）は，腫瘍増殖抑制活性を示した。また，対照群，エヌトレクチニブ60 mg/kg 及び120 mg/kg 投与群の生存期間中央値は， 順に31日，36日及び43日であり，エヌトレクチニブ投与量の増加とともに生存期間が延長される傾向を示した（図 2.6.2.2.4.3-8）。

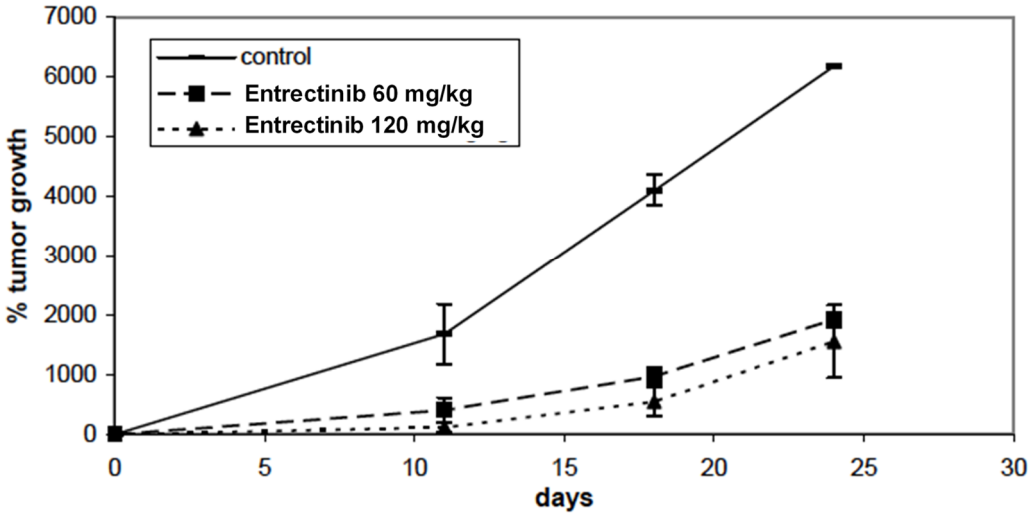
図 2.6.2.2.4.3-6 NCI-H2228細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性 – MRI 画像による比較

エヌトレクチニブ開始投与前　エヌトレクチニブ10日間投与後



【4.2.1.1-27 Figure 3を改変】

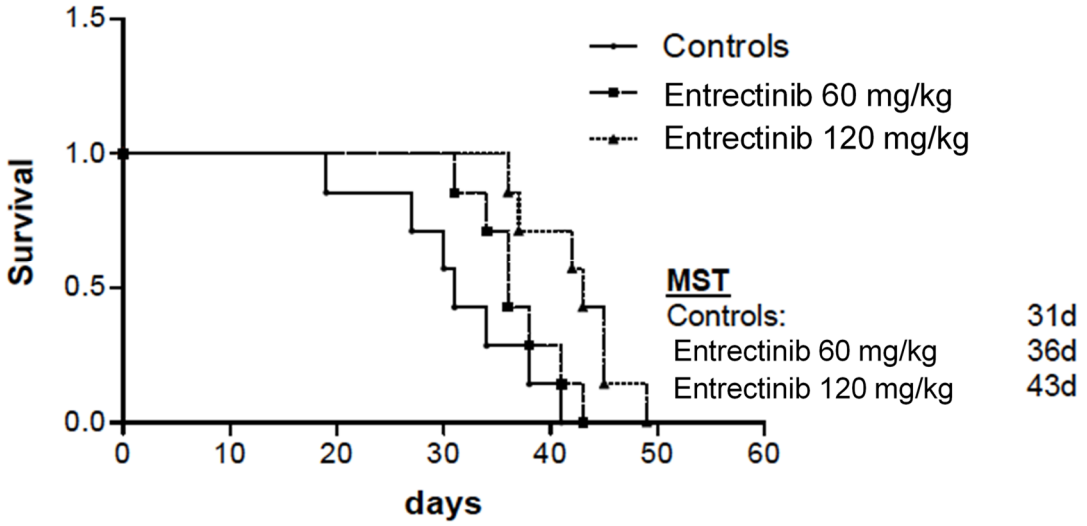
図 2.6.2.2.4.3-7 NCI-H2228細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの腫瘍増殖抑制活性 – MRI を用いた経時的な測定



表示は，平均値 ± 標準偏差。投与開始日を起点としている。

【4.2.1.1-27 Figure 4を改変】

図 2.6.2.2.4.3-8 NCI-H2228細胞頭蓋内移植モデルにおけるエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 – 生存期間の Kaplan-Meier 曲線



MST：生存期間中央値（median survival time）

【4.2.1.1-27 Figure 5を改変】

2.6.2.3 副次的薬理試験

(1) エヌトレクチニブのキナーゼ阻害活性／選択性評価

（資料番号4.2.1.2-1）

セリン－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。本結果は，TRKA，TRKB，TRKC，ROS1 及び ALK に対して強力な阻害作用（IC_{50}は，それぞれ1.7，0.1，0.1，0.2及び1.6 nmol/L）を示したデータ（資料番号4.2.1.1-1）に一致しており，NTRK，ROS1又は ALK 融合遺伝子を発現する腫瘍細胞株に選択的阻害作用を示したデータとも矛盾しない。

(2) エヌトレクチニブ及び M5の結合活性阻害／酵素活性阻害評価

（資料番号4.2.1.2-2，4.2.1.2-3，4.2.1.2-4，4.2.1.2-5）

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（濃度：10 µmol/L）を *in vitro* で評価した。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として，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-HT_{1B}，5-HT_{2A}，5-HT_{2B}，5-HT_{5A}，5-HT_6，5-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があったが，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倍以上の濃度で評価していることに留意する必要がある。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。

2.6.2.4 安全性薬理試験

安全性薬理試験として，以下の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施し，中枢神経系（CNS），心血管系及び呼吸器系に対するエヌトレクチニブの影響を評価した。ヒト及びイヌでの主代謝物M5については *in vitro* hERG 試験を実施した。安全性薬理試験の要約を表 2.6.2.4-1に示す。また，個々の試験について以下に詳述する。

表 2.6.2.4-1 安全性薬理試験

被験物質：エヌトレクチニブ

試験の種類	種と系統 (N)	投与法	用量 (mg/kg)	所見	資料番号
CNS–Irwin 変法 (GLP)	SD ラット (5F/群)	経口	0，50，100，200／単回又は14日間投与	NOEL：100 mg/kg/日 200 mg/kg/日：1日目には影響なし，14日目に異常歩行，体温には影響なし	4.2.1.3-1 (4.2.3.2-3と同じ)
心血管系 hERG アッセイ (非 GLP)	HEK293 細胞	*In vitro*	0.05，0.5，1.5，15 μmol/L	濃度依存的に16～91%の IKr チャネル阻害が認められた。(IC_{50} = 0.6 μmol/L)	4.2.1.3-2
心血管系 テレメトリー (非 GLP)	ビーグル犬 (3F)	経口	0, 300	NOEL: 300 mg/kg 一過性で軽度な血圧，体温の上昇がみられたが，生理学的意義はなし。心拍数，ECG パラメータに影響なし	4.2.1.3-3
心血管系 テレメトリー (GLP)	ビーグル犬 (2M/2F)	経口	0，60，120	NOEL：120 mg/kg 動脈血圧，心拍数，ECG パラメータ，体温に影響なし	4.2.1.3-4
呼吸器系 (GLP)	SD ラット (8F/群)	経口	0，50，100，200	NOEL：200 mg/kg 呼吸関連パラメータに影響なし	4.2.1.3-5

被験物質：代謝物 M5

試験の種類	種と系統	投与法	用量	所見	資料番号
心血管系－M5 hERG アッセイ (非 GLP)	hERG 発現哺乳類細胞	*In vitro*	0.3，1，3，10 μmol/L	IC_{50} = 10.4 μmol/L （ただし，代謝物 M5の溶解性が低かったため，hERG 阻害を低く見積もっている可能性あり）	4.2.1.3-6

N = 個体数，CNS = 中枢神経系，ECG = 心電図，GLP =医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準，hERG = ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子，NOEL = 無影響量，SD = Sprague Dawley

2.6.2.4.1 中枢神経系

（資料番号4.2.1.3-1 （4.2.3.2-3と同じ））

Irwin 変法による一般行動検査及び体温測定を，ラットを用いた GLP 4週間間欠反復投与毒性試験に組み込み，最初の2週間投与サイクルの1及び14日目に検査を行った。エヌトレクチニブを0，50，100 又は200 mg/kg/日の用量で経口投与した動物のうち，各群雌5例を検査対象とした。1日目には一般行動の変化はみられなかったが，投与14日目の投与3時間後には，200 mg/kg/日群のすべての動物に異常歩行及び鼻に赤色の着色が認められた。200 mg/kg における C_{max} は，1日目で4.60 μmol/L，42日目（2回目の2週間投与サイクルの14日目）で9.04 μmol/L であった。いずれの投与群においても，体温に意義のある変化はみられなかった。本試験条件下における無影響量（NOEL）は，単回投与で200 mg/kg，反復投与で，一般行動が100 mg/kg/日，

体温が200 mg/kg/日であった。

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 *In vitro* ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイ

2.6.2.4.2.1.1 エヌトレクチニブの hERG アッセイ

（資料番号4.2.1.3-2）

hERG 電流に対するエヌトレクチニブの影響を検討する非 GLP 試験は，安定的に遺伝子導入されたヒト胎児由来腎臓細胞（HEK293）を用いて，パッチクランプ法で37°C にて実施した。以下のすべての濃度において，IKr チャネルの濃度依存的阻害が生じた：16%（0.05 µmol/L），46%（0.5 µmol/L），65%（1.5 µmol/L），91%（15 µmol/L）。算出された IC_{50} は0.6 µmol/L で，この結果から本化合物が心臓再分極に干渉する可能性が示唆された。

2.6.2.4.2.1.2 代謝物 M5の hERG アッセイ

（資料番号4.2.1.3-6）

ヒト及びイヌにおける主要な循環代謝物である M5の hERG 発現哺乳類細胞に対する影響を自動パッチクランプシステム QPatch HT® (Sophion Bioscience A/S, Denmark)を用いて室温にて測定した。M5の適用濃度は0.3，1，3，10 µmol/L（n=4）で，算出された IC_{50}値は10.4 µmol/L であった。しかし，濃度3及び10 µmol/L は溶解性に限界があったため hERG 阻害を低く見積もっている可能性がある。

2.6.2.4.2.2 イヌを用いた *in vivo* テレメトリー試験

2.6.2.4.2.2.1 探索的試験

（資料番号4.2.1.3-3）

本非 GLP 試験では，テレメトリーを埋植した雌3例の覚醒イヌに，7日間の間隔を空けて溶媒（セッション1）あるいは300 mg/kg のエヌトレクチニブ（セッション2）を経口投与した。用量は，イヌ単回投与毒性試験成績から設定した。テレメトリーからのシグナルは，少なくとも投与1時間前から投与24時間後まで連続して収集した。その結果，投与30分から1時間後に，一過性の軽度な血圧の上昇（約20 mmHg の収縮期血圧，拡張期血圧及び平均血圧の上昇）がみられた。体温に関しては，最長2.5時間後まで軽度な上昇（約+0.5°C）がみられた。これら血圧，体温の上昇は軽度であり，生理学的な意義はないと判断した。心拍数，ECG 間隔（RR, PR, QRS, QT, QTC）は，対照群と比較して変化は認められなかった。これらの結果から，NOEL は300 mg/kg と判断した。

2.6.2.4.2.2.2 GLP テレメトリー試験

（資料番号4.2.1.3-4）

本 GLP 心血管テレメトリー試験では，イヌ（雌雄各2例）にエヌトレクチニブを0，60 及び120 mg/kg の用量で1週間の休薬を入れながら漸増経口投与した。この用量は，4週間間欠投与毒性試験において，120 mg/kg 群の Day 11の ECG 評価で，QTc の延長が雄5例中2例，雌5例中4例にみられたことから設定した。GLP 試験では，投与60分前から投与7 時間後まで心血管パラメータと体温を測定した。その結果，エヌトレクチニブは検討したいずれの用量においても，全身の動脈圧，心拍数，ECG 間隔（QT 及び QTc 間隔を含む）又は体温に影響を及ぼさなかった。以上より，心血管パラメータ及び体温に対する NOEL は120 mg/kg と判断した。なお，曝露は4週間間欠投与毒性試験 10日目（雌）及び11日目（雄）の C_{max} の個体別値から5.64から12.6 µmol/L の間と考えられた。

2.6.2.4.3 呼吸器系

（資料番号4.2.1.3-5）

本 GLP 試験では，1群当たり8匹の雌ラットにエヌトレクチニブを 0，50，100又は200 mg/kg の用量で単回経口投与し，全身プレチスモグラフィーを用いて，一回換気量，分時換気量，呼吸数，最大吸気流量，最大呼気速度，吸気時間，呼気時間，休止期時間，肺気流抵抗（気管支収縮の指標）を測定評価した。いずれの投与量においても，これらの呼吸関連パラメータに影響はみられず，NOEL は200 mg/kg であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.2.6 考察及び結論

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，選択的な阻害薬である。エヌトレクチニブは，*NTRK*，*ROS1*及び *ALK* 融合遺伝子を有するヒト腫瘍細胞株に対し選択的に強い増殖抑制活性を示した。また，マウス Ba/F3細胞に13種の *NTRK1/2/3*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たことから，融合パートナー遺伝子の種類に関わらず，*NTRK* 融合遺伝子陽性であれば細胞増殖を抑制すると考えられた。また，*ROS1*融合遺伝子を有するヒト腫瘍細胞株及び *ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞の増殖に対しても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）に対するリン酸化阻害活性と相関が認められた。また，エヌトレクチニブは，TRK シグナルを阻害することで，細胞周期の進行を G1期で停止させて，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及び作用機序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種類のがん及び *ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞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，腫瘍増殖抑制活性と TRK 下流のシグナル伝達抑制作用との関係について検討し，エヌトレクチニブが強い腫瘍増殖活性を示す用量において，TRK 下流シグナル伝達分子のリン酸化抑制作用が認められた。

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*融合遺伝子陽性のマウス神経膠腫細胞株，*TPM3-NTRK1*融合遺伝子陽性のヒト結腸直腸癌細胞株，及び *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性のヒト非小細胞肺癌細胞株をマウス頭蓋内に移植したモデルにて評価し，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，中枢神経系内の腫瘍に対しても，治療効果を示す可能性が示唆された。

非臨床薬理試験では，エヌトレクチニブが，がん及び融合遺伝子の種類に限定されることなく，広範な *NTRK1/2/3*又は *ROS1*陽性のがんに対し増殖抑制活性を示すことを明らかにした。臨床においても，頭蓋内腫瘍を含む様々な種類の TRK 又は ROS1融合蛋白質陽性腫瘍に対し，有効であると考えられる。

非臨床試験で示された抗腫瘍効果は，*NTRK1/2/3*又は *ROS1*融合遺伝子陽性腫瘍に罹患しているがん患者に対し，パートナー遺伝子及びがんの種類に限定されることなく，エヌトレクチニブが有効な治療法となることを支持する。

2.6.2.7 図表

本文中に記載。

2.6.2.8 参考文献

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 kinase (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 types. 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) 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.
5) 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.
6) 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.
7) Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. Cell 2007;131:1190-203.
8) Koivunen JP, Mermel C, Zejnullahu K, Murphy C, Lifshits E, Holmes AJ, et al. *EML4-ALK* fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. Clin Cancer Res 2008;14:4275-83.

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）

2.6.3 薬理試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

略語	英名	和名
ACK1	activated CDC42 kinase 1	—
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
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
CD	cluster of differentiation	白血球分化抗原
CNS	central nervous system	中枢神経系
ECG	electrocardiogram	心電図
ERK	extracellular signal-regulated kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	繊維芽細胞増殖因子受容体1
FLT3	fms-related tyrosine kinase 3	—
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-à-go-go-related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子1受容体
ITD	internal tandem duplication	遺伝子内縦列重複
IR	insulin receptor	インスリン受容体
JAK2	Janus kinase 2	ヤヌスキナーゼ2
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
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
N	number	個体数
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
PLC	phospholipase C	ホスホリパーゼ C
PO	per os	経口
RET	rearranged during transfection protooncogene	—
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
ROS1	c-ros oncogene 1, receptor tyrosine kinase	—
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全症
SD	Sprague-Dawley	SD 系
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
TI	tumor inhibition	腫瘍阻害率
TRK	tropomyosin receptor kinase	トロポミオシン受容体キナーゼ
VEGFR3	vascular endothelial growth factor receptor 3	血管内皮増殖因子受容体3

目次

頁

2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.3.2.1 キナーゼ阻害活性 8
2.6.3.2.2 *In vitro* 細胞増殖抑制活性 9
2.6.3.2.3 作用機序 12
2.6.3.2.4 *In vivo* 抗腫瘍活性 13
2.6.3.2.4.1 TRK 融合蛋白質依存性モデル 13
2.6.3.2.4.2 ROS1 融合蛋白質依存性モデル 20
2.6.3.2.4.3 頭蓋内移植モデル 22
2.6.3.3 副次的薬理試験 25
2.6.3.4 安全性薬理試験 27
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 28

図一覧

該当なし。

表一覧

該当なし。

添付資料一覧

該当なし。

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

(1) 試験の種類：効力を裏付ける試験

1) *In vitro* 試験

被験物質：エヌトレクチニブ及びM5

試験の種類	細胞，試験法	被験物質	実施施設	試験番号	資料番号
キナーゼ阻害活性	キナーゼ（TRK, ROS1，ALK）	エヌトレクチニブ及びM5	[redacted] USA	1087232 ([redacted])	4.2.1.1-1
キナーゼ阻害活性	キナーゼ（TRK, ROS1，ALK, JAK2）	エヌトレクチニブ及びM5	[redacted] USA	1087249 ([redacted])	4.2.1.1-2
キナーゼ阻害活性	キナーゼパネル	エヌトレクチニブ	[redacted] Italy	1087233 ([redacted])	4.2.1.1-3
細胞増殖抑制活性	細胞株パネル（腫瘍細胞，非癌組織由来細胞）	エヌトレクチニブ	[redacted] Italy	1087234 ([redacted])	4.2.1.1-4
細胞増殖抑制活性	CUTO-28細胞	エヌトレクチニブ	[redacted] USA	1087687 ([redacted])	4.2.1.1-5
細胞増殖抑制活性	細胞株パネル（腫瘍細胞）	エヌトレクチニブ及びM5	Genentech, Inc., USA	1090429	4.2.1.1-6
細胞増殖抑制活性，細胞周期，アポトーシス誘導	KM12細胞	エヌトレクチニブ及びM5	Genentech, Inc., USA	1089907	4.2.1.1-7
細胞増殖抑制活性	*NTRK* 融合遺伝子導入Ba/F3細胞	エヌトレクチニブ	[redacted] USA	1087236 ([redacted])	4.2.1.1-8
作用機序（シグナル伝達分子のリン酸化，細胞周期）	KM12細胞	エヌトレクチニブ	[redacted] Italy	1087242 ([redacted])	4.2.1.1-9
細胞増殖抑制活性	CUTO-3細胞	エヌトレクチニブ	[redacted] USA, [redacted] USA	1087237 ([redacted])	4.2.1.1-13
細胞増殖抑制活性，作用機序（シグナル伝達分子のリン酸化，細胞周期，アポトーシス）	IMS-M2細胞，MO-91細胞	エヌトレクチニブ	[redacted] USA, [redacted] USA	1087247 ([redacted])	4.2.1.1-14
細胞増殖抑制活性，ROS1リン酸化	Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞	エヌトレクチニブ	[redacted] Italy	1087258 ([redacted])	4.2.1.1-21

2) *In vivo* 試験

被験物質：エヌトレクチニブ

移植細胞	移植部位	動物種	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
結腸直腸癌 KM12	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087248 ([redacted])	4.2.1.1-10
結腸直腸癌 KM12	皮下	マウス	p.o.	[redacted] Italy	1087241 ([redacted])	4.2.1.1-11
結腸直腸癌 KM12-Luc	皮下	マウス	p.o.	[redacted] China, Genentech, Inc., USA, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland	1090136	4.2.1.1-12
非小細胞肺癌 CUTO-3	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA, [redacted] USA	1087237 ([redacted])	4.2.1.1-13
急性骨髄性白血病 IMS-M2，MO-91	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA, [redacted] USA	1087247 ([redacted])	4.2.1.1-14
急性骨髄性白血病 IMS-M2	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087243 ([redacted])	4.2.1.1-15
急性骨髄性白血病 MO-91	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087244 ([redacted])	4.2.1.1-16
頭頸部癌 CTG-0798	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087238 ([redacted])	4.2.1.1-17
頭頸部癌 CTG-0798	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087252 ([redacted])	4.2.1.1-18
肉腫 G002	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087257 ([redacted])	4.2.1.1-19
肉腫 G002	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087246 ([redacted])	4.2.1.1-20
Ba/F3_*TEL-ROS1*	皮下	マウス	p.o.	[redacted] Italy	1087258 ([redacted])	4.2.1.1-21
非小細胞肺癌 CTG-0848	皮下	マウス	p.o.	[redacted] USA	1087260 ([redacted])	4.2.1.1-22
非小細胞肺癌 LU-01-0414	皮下	マウス	p.o.	[redacted] China	1087259 ([redacted])	4.2.1.1-23
神経膠腫 BNN4，BNN2	頭蓋内	マウス	p.o.	Memorial Sloan Kettering Cancer Center, USA	Nat Commun 2017;8:15987	4.2.1.1-24
結腸直腸癌 KM12-Luc	頭蓋内	マウス	p.o.	[redacted] China, Genentech, Inc., USA, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Switzerland	1090134	4.2.1.1-25

移植細胞	移植部位	動物種	投与方法	実施施設	試験番号	資料番号
結腸直腸癌 KM12-Luc	頭蓋内	マウス	p.o.	[redacted] China	1087694 ([redacted])	4.2.1.1-26
非小細胞肺癌 NCI-H2228	頭蓋内	マウス	p.o.	[redacted] Italy	1087263 ([redacted])	4.2.1.1-27

(2) 試験の種類：副次的薬理試験

被験物質：エヌトレクチニブ

試験の種類	試験法	実施施設	試験番号	資料番号
キナーゼ阻害活性／選択性	*In vitro*，キナーゼパネル（293種のキナーゼ）	[redacted]	1089804	4.2.1.2-1
結合阻害活性，酵素阻害活性	*In vitro*，放射性標識リガンドの受容体／トランスポーター／イオンチャネルへの結合に対する阻害比率（39種のターゲット），酵素活性の阻害比率（2種の酵素）	[redacted]	1089509 (100044445)	4.2.1.2-2
結合阻害活性，酵素阻害活性	*In vitro*，放射性標識リガンドの受容体／トランスポーター／イオンチャネルへの結合に対する阻害比率（50種のターゲット），酵素活性の阻害比率（9種の酵素）	[redacted]	1089510 (100044446)	4.2.1.2-3

被験物質：M5

試験の種類	試験法	実施施設	試験番号	資料番号
結合阻害活性，酵素阻害活性	*In vitro*，放射性標識リガンドの受容体／トランスポーター／イオンチャネルへの結合に対する阻害比率（39種のターゲット），酵素活性の阻害比率（2種の酵素）	[redacted]	1089511 (100044447)	4.2.1.2-4
結合阻害活性，酵素阻害活性	*In vitro*，放射性標識リガンドの受容体／トランスポーター／イオンチャネルへの結合に対する阻害比率（50種のターゲット），酵素活性の阻害比率（9種の酵素）	[redacted]	1089512 (100044448)	4.2.1.2-5

(3) 試験の種類：安全性薬理試験

被験物質：エヌトレクチニブ

試験の種類	細胞，試験法	実施施設	試験番号	資料番号
中枢神経系に対する影響	SD ラット，Irwin 変法による一般行動検査及び体温測定（GLP）	[redacted], Italy	1087346 (0163-[redacted])	4.2.1.3-1 (4.2.3.2-3と同じ)
心血管系に対する影響（*in vitro*）	hERG アッセイ：ヒト胎児由来腎臓細胞（HEK293）を用いたパッチクランプ法（非 GLP）	[redacted], Italy	1087271 (0175-[redacted])	4.2.1.3-2
心血管系に対する影響（*in vivo*）	テレメトリーを埋植した覚醒イヌを用いた血圧，心拍数，ECG，体温の測定（非 GLP）	[redacted], Italy	1087272 (0231-[redacted])	4.2.1.3-3
心血管系に対する影響（*in vivo*）	テレメトリーを埋植した覚醒イヌを用いた血圧，心拍数，ECG，体温の測定（GLP）	[redacted], Italy	1087273 (0237-[redacted])	4.2.1.3-4
呼吸器系に対する影響	全身プレチスモグラフィーを用いた呼吸器系パラメータの測定（GLP）	[redacted], Italy	1087274 (0238-[redacted])	4.2.1.3-5

被験物質：代謝物 M5

試験の種類	細胞，試験法	実施施設	試験番号	資料番号
代謝物 M5の心血管系に対する影響（*In vitro*）	hERG アッセイ：哺乳類細胞を用いたパッチクランプ法（非 GLP）	[redacted], USA	1087275 (SR-[redacted]-008)	4.2.1.3-6

(4) 試験の種類：薬理学的薬物相互作用試験

該当なし。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 キナーゼ阻害活性

(1) 標的キナーゼに対する阻害活性

資料番号	4.2.1.1-1
タイトル	HotSpot kinase profiling: Testing of 3 compounds in 10-dose IC_{50} mode at a starting concentration of 0.3 μM against 4 kinases. Testing of 3 compounds in 10-dose IC_{50} mode at a starting concentration of 10 μM against 7 kinases
試験方法	エヌトレクチニブ（報告書中では [redacted] と表記）及び主な代謝物である M5（報告書中では [redacted] と表記）の標的キナーゼ（TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK）に対する阻害活性について，^{33}P-標識 ATP を用いたキナーゼアッセイ（ATP 濃度：10 μmol/L，反応時間：120分）を用いて調べ，IC_{50}を算出した。
結果	エヌトレクチニブの TRKA，TRKB，TRKC，ROS1及び ALK に対する 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主な代謝物である M5の IC_{50}は，順に2.5，0.1，0.2，0.2及び1.9 nmol/L であった。

(2) キナーゼ（TRK，ROS1，ALK 及び JAK2）に対する阻害活性

資料番号	4.2.1.1-2
タイトル	Determination of kinase IC_{50} values for entrectinib and the entrectinib M5 metabolite for TRKA, TRKB, TRKC, ROS1, ALK, and JAK2
試験方法	エヌトレクチニブ（報告書中では B001020744と表記）及び主な代謝物である M5（報告書中では B001020745と表記）のキナーゼ（TRKA，TRKB，TRKC，ROS1，ALK 及び JAK2）に対する阻害活性について，^{33}P-標識 ATP を用いたキナーゼアッセイ（反応時間：120分）を用いて調べ，IC_{50}を算出した。
結果	エヌトレクチニブの TRKA，TRKB，TRKC，ROS1，ALK 及び JAK2に対する IC_{50}は，順に3.6，< 0.51，< 0.51，< 0.51，1.0及び5.4 nmol/であり，M5の IC_{50}は，順に7.0，＜0.51，＜0.51，＜0.51，1.9及び14.2 nmol/L であった。

(3) 組換え体キナーゼパネルでの阻害活性

資料番号	4.2.1.1-3
タイトル	Biochemical characterization of [redacted]
試験方法	51種のチロシンキナーゼ，セリン-スレオニンキナーゼから成るキナーゼパネルを用いて，エヌトレクチニブの特異性について調べた。^{33}P-標識 ATP を用いたキナーゼアッセイ（[redacted]）により，キナーゼ阻害活性を測定し，IC_{50}を算出した。
結果	エヌトレクチニブは，TRKA，ROS1及び ALK の各チロシンキナーゼに対し，低濃度で阻害活性を示した（IC_{50}は，順に2，7及び19 nmol/L）。エヌトレクチニブの IC_{50}が TRKA と比較し，50倍未満であった他のキナーゼは，JAK2（38 nmol/L），ACK1（68 nmol/L）のみであり，IGFR1（294 nmol/L），FLT3（299 nmol/L），IR（366 nmol/L），RET（540 nmol/L），FGFR1（1033 nmol/L），VEGFR3（1244 nmol/L）などの受容体型チロシンキナーゼに対する IC_{50}は，いずれも TRKA の100倍以上であった。また，測定した51種のキナーゼの内，25種のキナーゼでの IC_{50}は，10 μmol/L を超えていた。

2.6.3.2.2 *In vitro* 細胞増殖抑制活性

(1) ヒト腫瘍細胞株パネル（被験物質：エヌトレクチニブ）

資料番号	4.2.1.1-4
タイトル	Characterization of anti-proliferative activity of [redacted] against a panel of cell lines
試験方法	160種の細胞株パネルを用いて，エヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を検討した。細胞パネルには，白血病/リンパ腫35株，肺癌27株，結腸直腸癌24株，乳癌14株，腎腺癌（腎細胞癌）8株，悪性黒色腫8株，多発性骨髄腫8株，卵巣癌7株，膠芽腫5株，膵臓腺癌4株，前立腺癌3株，子宮頸部腺癌3株，星細胞腫2株，骨肉腫2株，神経芽細胞腫2株，膀胱癌1株，膠肉腫1株，及び非腫瘍性細胞6株が含まれる。 各細胞株をエヌトレクチニブ存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いてATP 量を定量することで生細胞数を計測し，各細胞株に対する細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した。
結果	160種の細胞株全体での平均 IC_{50}は2.76 μmol/L ，レンジは0.02～6.05 μmol/L であった。エヌトレクチニブは，*NTRK* 融合遺伝子を発現している結腸直腸癌細胞株 KM12の増殖を低濃度で抑制し（IC_{50} = 17 nmol/L），*ALK* 融合遺伝子を発現する腫瘍細胞株である SU-DHL-1，KARPAS-299，SUP-M2，NCI-H2228及びSR-786に対しても，低濃度で腫瘍増殖抑制活性を示した（IC_{50}は，順に20，31，41，68及び81 nmol/L）。一方，ほとんどの腫瘍細胞株は，エヌトレクチニブに対する感受性が低く，非腫瘍性細胞株も同様であった。

(2) *ROS1*融合遺伝子を発現する CUTO-28細胞

資料番号	4.2.1.1-5
タイトル	*In vitro* characterization of antiproliferation activity of entrectinib and other ROS1 inhibitors in a human NSCLC cell line, CUTO-28, with *TPM3-ROS1* gene fusion (including Amendment 1)
試験方法	1) 増殖抑制活性 *TPM3-ROS1*融合遺伝子を発現する CUTO-28細胞をエヌトレクチニブ存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測し，細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した。 2) 発癌ドライバー遺伝子の同定 CUTO-28細胞の RNA 及び DNA を用いて発癌ドライバー遺伝子を解析した。
結果	1) エヌトレクチニブは，*ROS1*融合遺伝子を発現する CUTO-28細胞に対し腫瘍増殖抑制活性を示し，IC_{50}は，20.1 nmol/L であった。 2) CUTO-28には，*TPM3-ROS1*融合遺伝子の発現が確認できたが，他の発癌ドライバー遺伝子は認められなかった。

(3) ヒト腫瘍細胞パネル（被験物質：エヌトレクチニブ及び M5）

資料番号	4.2.1.1-6
タイトル	Assessment of entrectinib and its major metabolite M5 in panel of human cancer cell lines
試験方法	308細胞株から成る細胞パネルを用いて，エヌトレクチニブ及びその代謝物 M5 について，細胞増殖抑制活性を調べた。細胞パネルには，肺癌101株，卵巣癌49株，白血病/リンパ腫34株，膵臓癌31株，結腸直腸癌24株，肝癌15株，脳腫瘍13株，乳癌11株，胃癌9株，子宮頸癌5株，皮膚癌4株，及びその他の肉腫及び癌腫12株が含まれる。また，この内，39細胞株が小児癌に由来する細胞株である。 各細胞株をエヌトレクチニブ又は M5存在下で120時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測し，各細胞株に対する細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した（M5は223株について測定）。
結果	*NTRK* 融合遺伝子を有する5細胞株（CUTO-3，KM12，IMS-M2，MO-91及び G111），*ROS1*融合遺伝子を有する4細胞株（CUTO-27，CUTO-28，HCC1493，HCC-78），*ALK* 融合遺伝子又は遺伝子増幅を有する5細胞株（SU-DHL-1，DEL，NB-1，KARPAS-299，NCI-H2228），及び *FLT3-ITD* 変異細胞株である MV-4-11の IC_{50}が1 μmol/L 未満であり感受性を示した。KM12のルシフェラーゼ導入株等，重複する5細胞株の IC_{50}も1 μmol/L 未満であり感受性が認められた。細胞株パネルの残り288株は，IC_{50}が1 μmol/L 以上であった。 エヌトレクチニブ処理の IC_{50}と M5処理による IC_{50}は，感受性を示した細胞株及び比較した全細胞株において相関性を示した。主要な代謝物である M5は，種々の腫瘍細胞に対し，エヌトレクチニブと同程度の増殖抑制活性を有することが示された。

(4) *TPM3-NTRK1*を発現する KM12細胞

資料番号	4.2.1.1-7
タイトル	Assessment of entrectinib and its major metabolite M5 in cell viability, cell cycle and apoptosis assays in the KM12 *TPM3-NTRK1* colorectal cancer cell line
試験方法	1) 細胞増殖抑制活性 KM12細胞をエヌトレクチニブ又は M5存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測した。 2) 細胞周期 KM12細胞をエヌトレクチニブ又は M5存在下で48時間培養し，フローサイトメーターを用いて細胞周期に対する作用を解析した。 3) アポトーシス誘導 KM12細胞をエヌトレクチニブ又は M5共存下で培養し，2時間ごとに48時間目までカスパーゼ3/7陽性細胞の割合を測定した。
結果	1) エヌトレクチニブと M5は，KM12細胞に対し同程度の細胞増殖抑制活性を示し，IC_{50}は，それぞれ2.8及び2.6 nmol/L であった。 2) エヌトレクチニブ及び M5処理により，G1期細胞の割合が高くなり，一方，S 期及び G2期細胞の割合が低下した。 3) エヌトレクチニブ及び M5は，0.01 μmol/L 以上の濃度で，KM12のカスパーゼ3/7陽性細胞の比率が高く，アポトーシスを誘導した。

(5) *NTRK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞

資料番号	4.2.1.1-8
タイトル	Determination of anti-proliferative IC_{50} values of entrectinib in Ba/F3 cells transformed by *NTRK* fusions
試験方法	13種の *NTRK1*，*NTRK2*，又は *NTRK3*融合遺伝子を Ba/F3細胞（IL-3依存性に増殖するマウス pro B 細胞株）に導入して作製した細胞株を用いて，エヌトレクチニブの細胞増殖抑制活性を調べた。 *NTRK* 融合遺伝子を発現する各 Ba/F3細胞をエヌトレクチニブ存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を定量することで生細胞数を計測し，各細胞株に対する細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した。
結果	エヌトレクチニブは，13種の *NTRK* 融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞に対し強い増殖抑制活性を示し，IC_{50}はいずれも6 nmol/L 未満（0.37～5.39 nmol/L）であった。一方，親株である Ba/F3細胞に対しては増殖抑制活性を示さなかった（IC_{50} > 1000 nmol/L）。

・*NTRK* 融合遺伝子を有する腫瘍細胞株の内 CUTO-3（4.2.1.1-13），IMS-M2及び MO-91（4.2.1.1-14）については，2.6.3.2.4.1(4)及び2.6.3.2.4.1(5)参照。
・*ROS1*融合遺伝子を導入した Ba/F3細胞（4.2.1.1-21）については，2.6.3.2.4.2(1)参照

2.6.3.2.3 作用機序

(1) TRK 融合蛋白質依存性細胞

資料番号	4.2.1.1-9
タイトル	Mechanism of action of [redacted] in a human TrkA-dependent colon carcinoma cell line
試験方法	1) シグナル伝達分子のリン酸化 エヌトレクチニブ共存下で KM12細胞を2時間培養した後，TRKA 及びその下流に位置するシグナル伝達分子（PLCγ，AKT/protein Kinase B 及び p42/44 MAPK）のリン酸化について，ウエスタンブロットを用いて解析した。また，細胞周期と同じスケジュール（24時間，48時間及び72時間培養）で TRKA 及び PLCγ のリン酸化について解析した。 2) 細胞周期 エヌトレクチニブ共存下で KM12細胞を24時間，48時間及び72時間培養し，細胞周期に対する作用についてフローサイトメーターを用いて解析した。
結果	1) エヌトレクチニブは，10 nmol/L 以上の濃度で 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。 2) エヌトレクチニブ共存下で24時間培養後には，いずれの濃度においても細胞周期の G1期への集積が認められた。48時間以降では，sub-G1ピークが認められたことから，アポトーシスの誘導が示された。24時間，48時間，72時間培養時の TRKA 及びその下流のシグナル伝達分子である PLCγ のリン酸化は，エヌトレクチニブ処理により阻害された。

・エヌトレクチニブと M5の細胞周期及びアポトーシス誘導（4.2.1.1-7）については，2.6.3.2.2(4)参照。
・急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91での作用機序（4.2.1.1-14）については，2.6.3.2.4.1(5)参照。
・ROS1融合蛋白質依存性細胞モデル（4.2.1.1-21）については，2.6.3.2.4.2(1)を参照。

2.6.3.2.4 *In vivo* 抗腫瘍活性

2.6.3.2.4.1 TRK 融合蛋白質依存性モデル

(1) KM12（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-10
タイトル	Dose-dependent efficacy of entrectinib in the *TPM3-NTRK1* fusion containing KM12 model
試験方法	腫瘍細胞：KM12細胞 細胞移植：雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植（Matrigel®使用） 群割り付け：移植7日後に無作為割付（1群10匹，平均腫瘍体積は約130 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日1回14日間0.3，1.5，3，15及び30 mg/kg 経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式：$TGI（\%）= \frac{対照群の腫瘍体積平均値 - 各投与群の腫瘍体積平均値}{対照群の腫瘍体積平均値 - 腫瘍体積平均値（群分け時）} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ0.3 mg/kg，1.5 mg/kg 及び3 mg/kg 投与群の day 20における TGI は，順に19%，36%及び64%であった。15 mg/kg 及び30 mg/kg では，腫瘍の退縮が認められ，TGI は101%及び102%であった。Day 20の腫瘍体積に基づいて，50%抑制用量及び90%抑制用量を算出したところ，順に2.35 mg/kg 及び6.23 mg/kg であった。本試験では，いずれの投与量においてもマウス体重に対する影響は認められなかった。

(2) KM12（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-11
タイトル	*In vivo* efficacy of [redacted] against KM12 human colorectal carcinoma tumor xenografts in nude mice
試験方法	腫瘍細胞：KM12細胞 細胞移植：雄ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり5 × 10^6個移植 群割り付け：移植8日後に各群の平均腫瘍体積が同様になるように割付（1群7匹） 薬物投与：エヌトレクチニブ（群分け日から1日2回10日間15，30及び60 mg/kg 経口投与），2試験（#1284及び#1297）で実施した。#1284試験では30及び60 mg/kg 投与，#1297試験では15 mg/kg 投与を実施し，群分け時の平均腫瘍重量は，順に0.25 g 及び0.19 g であった。 測定項目：腫瘍体積及び体重（少なくとも週2回計測） TI 算出式：$TI（\%）= 100 - \frac{各投与群の腫瘍体積平均値}{対照群の腫瘍体積平均値} \times 100$
結果	#1284試験 エヌトレクチニブ30 mg/kg 及び60 mg/kg 投与群の day 18における TI は，順に93%及び94%であり，マウス体重の明らかな減少は認められなかった。 #1297試験 エヌトレクチニブ15 mg/kg 投与群の day 18における TI は94%であり，マウス体重の明らかな減少は認めらなかった。

(3) KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-12
タイトル	*In vivo* anti-tumor efficacy and PK/PD study of entrectinib in the treatment of KM12-luc subcutaneous tumors on Balb/c nude mice (including bioanalytical reports)
試験方法	1) *In vivo* 腫瘍増殖（1日1回経口投与と1日2回経口投与） 腫瘍細胞：KM12-Luc 細胞 細胞移植：雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり5×10^6個移植 群割り付け：移植14日後に割付（1群10匹，平均腫瘍体積は約238 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブを1日1回0.1，1，3，10及び30 mg/kg，1日2回0.05，0.5，1.5，5及び15 mg/kg 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回） 2) *In vivo* でのシグナル伝達分子のリン酸化 KM12-Luc 細胞を皮下移植したマウスに溶媒又はエヌトレクチニブ（1，5，15，30及び60 mg/kg）を1日2回のスケジュールで3回経口投与し，最終投与の3，8及び12時間後に腫瘍を採取した。腫瘍細胞を溶解し，TRK の下流シグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。
結果	1) エヌトレクチニブ1 mg/kg（1日1回）未満では効果を示さず，3 mg/kg（1日1回）又は1.5 mg/kg（1日2回）で中程度の腫瘍増殖抑制活性を示し（TGI は順に39%及び45%），10 mg/kg（1日1回）又は5 mg/kg（1日2回）以上では腫瘍の退縮をもたらした（TGI は100%以上）。 2) エヌトレクチニブは，5 mg/kg 以上の用量において，PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化を用量依存的に阻害した。TRKA シグナル伝達系に対するエヌトレクチニブの阻害効果は，8時間目まで維持された後，12時間目には緩やかな回復傾向が認められた。

(4) CUTO-3（*MPRIP-NTRK1*）非小細胞肺癌マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-13
タイトル	*In vitro* and *in vivo* characterization of anti-proliferation activity of entrectinib in a human NSCLC cell line, CUTO-3, with *MPRIP-NTRK1* gene fusion (including Amendment 1)
試験方法	1) *In vitro* 腫瘍増殖 CUTO-3細胞株をエヌトレクチニブ存在下で3日間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を測定することで生細胞数を計測し，各細胞株に対する細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した。 2) *In vivo* 腫瘍増殖 腫瘍細胞：CUTO-3細胞 細胞移植：雌ヌードマウスの腹部皮下に1匹あたり2 × 10^6個移植し（Matrigel®使用） 群割り付け：移植9日後に無作為割付（1群10匹，平均腫瘍体積は約130 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日1回39日間0.1，0.3，1，3，10及び30 mg/kg 経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式：$\text{TGI（\%）} = \frac{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$
結果	1) エヌトレクチニブの IC_{50}は，1.255 nmol/L であった。クリゾチニブの IC_{50}は，153.5 nmol/L であった。 2) エヌトレクチニブ0.1 mg/kg，0.3 mg/kg 及び1 mg/kg 投与群の day 48における TGI は，順に16%，14%及び37%であり，0.1 mg/kg 及び0.3 mg/kg 投与群ではほとんど腫瘍増殖抑制活性を示さなかった。3 mg/kg では，強い腫瘍増殖抑制活性（TGI = 101%）を示し，10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群では，腫瘍が完全に退縮した例も認められた（両群とも TGI > 106%）。Day 23の腫瘍体積に基づいて，50%抑制用量及び90%抑制用量を算出したところ，順に1.5 mg/kg 及び3.5 mg/kg であった。

(5) IMS-M2及び MO-91（*ETV6-NTRK3*）急性骨髄性白血病細胞株
-In vitro 及び *in vivo* 作用機序並びに骨髄中での同所性増殖-

資料番号	4.2.1.1-14
タイトル	*In vitro* and *in vivo* characterization of entrectinib activity against *ETV6-NTRK3*-positive acute myeloid leukemia cell lines (including Amendment 1)
試験方法	1) *ETV6-NTRK3*融合遺伝子の発現 急性骨髄性白血病細胞株 IMS-M2及び MO-91（以下，両細胞株）の RNA を抽出し，*ETV6-NTRK3*融合遺伝子の発現及びその構造的な特性を調べた。 2) 細胞増殖抑制活性及びシグナル伝達分子のリン酸化 細胞増殖抑制活性は，両細胞株をエヌトレクチニブ存在下で72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を測定することで生細胞数を計測し，各細胞株に対する細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した。TRKA 及びシグナル伝達系の中で下流に位置する分子（PLCγ，ERK1/2及び STAT3）のリン酸化については，両細胞株をエヌトレクチニブ共存下で2時間培養した後，tumor lysate を調製し，ウエスタンブロットを用いて解析した。 3) 細胞周期及びアポトーシス誘導 細胞周期は，エヌトレクチニブ共存下で両細胞株を18時間培養し，フローサイトメーターを用いて解析した。アポトーシスに伴うカスパーゼ活性化は，NucView 488カスパーゼ基質を用い，エヌトレクチニブ共存下で両細胞株が発する蛍光を2時間ごとに検出することで測定した。 4) *In vivo* でのシグナル伝達分子のリン酸化 IMS-M2又は MO-91を移植した雌 CB.17 SCID マウスに溶媒，エヌトレクチニブ3，30 mg/kg（1群3匹）を単回経口投与し，4時間後に腫瘍を採取して tumor lysate を作成した。ETV6-TRKC 及びシグナル伝達系で下流に位置する分子（PLCγ，ERK1/2及び STAT3）のリン酸化をイムノブロットにより解析した。 5) 骨髄中の腫瘍細胞数 IMS-M2を移植した雌 CB.17 SCID マウスに1日1回21日間溶媒又はエヌトレクチニブ3，10，及び30 mg/kg を経口投与後，大腿骨の骨髄を採取し，LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit を用いて生細胞を測定した。
結果	1) 両細胞とも *ETV6*の Exon 1-4と *NTRK3*の Exon 15以降がインフレームで融合した RNA が確認された。 2) エヌトレクチニブの IMS-M2及び MO-91に対する IC_{50}は，順に0.47及び0.65 nmol/L であった。エヌトレクチニブ処理により，ETV6-TRKC は速やかに分解され，TRK の下流シグナル伝達分子のリン酸化が用量依存的に阻害された。 3) 両細胞ともに G1期で細胞周期が停止し，sub-G1の増加が認められた。また，エヌトレクチニブの処理時間及び濃度依存的にカスパーゼ3の活性化，PARP の分解が認められた。 4) 3 mg/kg 投与群では，ETV6-TRKC のリン酸化及び total TRK 蛋白の減少が認められ，30 mg/kg 投与群では消失した。また，TRK 下流のシグナル伝達分子である PLCγ，ERK1/2及び STAT3のリン酸化は，エヌトレクチニブの投与により著しく低下した。 5) 溶媒投与群では，マウス骨髄組織中にヒト CD45陽性細胞の浸潤が認められたが，エヌトレクチニブ投与群（3，10，及び30 mg/kg）では，検出されなかった。

(6) IMS-M2（*ETV6-NTRK3*）急性骨髄性白血病細胞株マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-15
タイトル	Efficacy of entrectinib in the human acute myeloid leukemia (AML) model IMS-M2
試験方法	腫瘍細胞：IMS-M2細胞 細胞移植：雌 CB.17 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植（Matrigel®使用） 群割り付け：移植12日後に無作為割付（1群10匹，平均腫瘍体積は約120 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日1回21日間3，10及び30 mg/kg 経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式：$\mathrm{TGI}(\%) = \frac{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ3 mg/kg，10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群の day 33における TGI は，順に105%，106%及び107%であり，いずれの投与群においても TGI が100%を超える腫瘍増殖抑制活性を示した。

(7) MO-91（*ETV6-NTRK3*）急性骨髄性白血病細胞株マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-16
タイトル	Efficacy of entrectinib in the human acute myeloid leukemia (AML) model MO-91
試験方法	腫瘍細胞：MO-91細胞 細胞移植：雌 CB.17 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植（Matrigel®使用） 群割り付け：移植14日後に無作為割付後（1群10匹，平均腫瘍体積は約140 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日1回18日間3，10及び30 mg/kg 経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式：$\mathrm{TGI}(\%) = \frac{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ3 mg/kg 投与群の day 32における TGI は91%，10 mg/kg 及び30 mg/kg の TGI は100%を超え腫瘍の退縮が認められた。

(8) CTG-0798（*ETV6-NTRK3*）頭頸部癌マウス皮下移植 PDX モデル

資料番号	4.2.1.1-17
タイトル	*In vivo* evaluation of entrectinib in [redacted] of human head and neck cancer in immunocompromised mice
試験方法	腫瘍細胞：CTG-0798細胞 細胞移植：腫瘍ブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植 群割り付け：100～300 mm^3に達した時点で各群の平均腫瘍体積が同様になるように割付（1群10匹） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日2回21日間15，60 mg/kg 経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式： $\mathrm{TGI}\ (\%) = 100 - \frac{\text{各投与群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値（群分け時）}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{対照群の腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ15 mg/kg，60 mg/kg 投与群の day 20における TGI は，順に146%及び149%であり，溶媒投与群に対し，有意な腫瘍増殖抑制活性を示した（$P \leq 0.0001$，one-way ANOVA，Dunnett's multiple comparison test）。

(9) CTG-0798（*ETV6-NTRK3*）頭頸部癌マウス皮下移植 PDX モデル

資料番号	4.2.1.1-18
タイトル	*In vivo* evaluation of [redacted] entrectinib, in [redacted] of human head and neck cancer in immunocompromised mice
試験方法	腫瘍細胞：CTG-0798細胞 細胞移植：腫瘍ブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植 群割り付け：150～300 mm^3に達した時点で各群の平均腫瘍体積が同様になるように割付（1群8匹） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日1回57日間15 mg/kg 経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式： $\mathrm{TGI}\ (\%) = 100 - \frac{\text{各投与群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値（群分け時）}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{対照群の腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$
結果	エヌトレクチニブを day 56まで連日投与した後，day 119まで経時的に観察したが，試験最終日まで腫瘍が退縮した状態を維持した。

(10) G002（*TPM3-NTRK1*）肉腫マウス皮下移植 PDX モデル

資料番号	4.2.1.1-19
タイトル	Efficacy of entrectinib in the *TPM3-NTRK1* fusion containing patient derived xenograft model G002
試験方法	腫瘍細胞：G002細胞 細胞移植：雌 CB17. SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植（Matrigel®使用） 群割り付け：移植41日後に無作為割付（1群10匹，平均腫瘍体積は約100 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から30 mg/kg を1日1回28日間経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重は，週2回計測した。 TGI 算出式：$TGI（\%）= \frac{対照群の腫瘍体積平均値 - 各投与群の腫瘍体積平均値}{対照群の腫瘍体積平均値 - 腫瘍体積平均値（群分け時）} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ30 mg/kg を投与開始後，最初の計測日（day 44）以降，強い腫瘍増殖抑制活性を示し，試験最終日まで TGI は100%以上を維持した。

(11) G002（*TPM3-NTRK1*）肉腫マウス皮下移植 PDX モデル

資料番号	4.2.1.1-20
タイトル	Dose-dependent efficacy of entrectinib in the *TPM3-NTRK1* fusion containing patient derived xenograft model G002
試験方法	腫瘍細胞：G002細胞 細胞移植：雌 CB17. SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり1 × 10^6個移植（Matrigel®使用） 群割り付け：移植26日後に無作為割付（1群10匹，平均腫瘍体積は約125 mm^3） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から0.1，0.3，1，3，10及び30 mg/kg を1日1回20日間経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式：$TGI（\%）= \frac{対照群の腫瘍体積平均値 - 各投与群の腫瘍体積平均値}{対照群の腫瘍体積平均値 - 腫瘍体積平均値（群分け時）} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ0.1～1 mg/kg 投与群では腫瘍増殖をほとんど抑制しなかったが，3 mg/kg，10 mg/kg 及び30 mg/kg 投与群では，溶媒投与群と比較し統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性を示し（$P < 0.05$, two way ANOVA），day 46における TGI は順に84%，109%及び108%であった。Day 46の腫瘍体積に基づいて，50%抑制用量及び90%抑制用量を算出したところ，順に2.318 mg/kg 及び3.921 mg/kg であった。

2.6.3.2.4.2 ROS1融合蛋白質依存性モデル

(1) Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞マウス皮下移植モデル

資料番号	4.2.1.1-21
タイトル	*In vitro* and *in vivo* activity of [redacted] in a ROS1-dependent tumor model
試験方法	*TEL-ROS1* 融合遺伝子をマウス Ba/F3 細胞に導入して作製した細胞株（Ba/F3_*TEL-ROS1*）を用いた。 1) *In vitro* 細胞増殖及び ROS1 リン酸化 エヌトレクチニブ又はクリゾチニブ存在下で Ba/F3_*TEL-ROS1*を72時間培養し，CellTiter-Glo®を用いて ATP 量を測定することで生細胞数を計測し，細胞増殖抑制活性（IC_{50}）を算出した。薬物共存下で2時間培養した後，tumor lysate を調製し，ウエスタンブロットを用いて ROS1のリン酸化を解析した。 2) *In vivo* 増殖 移植細胞：Ba/F3_*TEL-ROS1*細胞 細胞移植：雌 SCID マウスの腹部皮下に1匹あたり 5×10^5個移植 群割り付け：移植15日後に各群の平均腫瘍体積が同様になるように割付（1群6匹，平均腫瘍体積は0.14 cm^3）， 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から60 mg/kg を1日2回10日間経口投与） 測定項目：腫瘍体積及び体重（少なくとも週2回計測）
結果	1) エヌトレクチニブは，Ba/F3_*TEL-ROS1*の増殖を抑制し，IC_{50}は0.005 μmol/L であった。また，クリゾチニブの IC_{50}は0.180 μmol/L であった。また，エヌトレクチニブにより ROS1のリン酸化が，濃度依存的に阻害された。 2) エヌトレクチニブ投与群では，腫瘍の退縮が認められた。

(2) CTG-0848（*CD74-ROS1*）非小細胞肺癌マウス皮下移植 PDX モデル

資料番号	4.2.1.1-22
タイトル	*In vivo* evaluation of [redacted] entrectinib, in [redacted] of human non-small cell lung cancer in immunocompromised mice
試験方法	腫瘍細胞：CTG-0848細胞 細胞移植：腫瘍ブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植 群割り付け：150～300 mm^3に達した時点で各群の平均腫瘍体積が同様になるように割付（1群8匹） 薬物投与：エヌトレクチニブ（群分け日から30及び60 mg/kg を1日2回29日間，ただし，day 0と day 28は1回のため合計56回経口投与），溶媒（対照群，エヌトレクチニブと同様） 測定項目：腫瘍体積及び体重（週2回計測） TGI 算出式： $$\mathrm{TGI}\ (\%) = 100 - \frac{\text{各投与群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値（群分け時）}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{対照群の腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$$
結果	エヌトレクチニブ30 mg/kg 及び60 mg/kg 投与群では，溶媒投与の対照群と比較し，統計学的に有意な腫瘍増殖抑制活性が認められ（$P < 0.001$，one-way ANOVA，Newman-Keuls multiple comparison test），day 28における TGI は順に134%及び131%であり，両投与群ともに，腫瘍が完全に退縮後，試験最終日まで維持した例が認められた。また，対照群を含めた3群は，試験期間中を通じて同様の体重増加傾向を示したことから，エヌトレクチニブ投与に対する忍容性が認められた。

(3) LU-01-0414（*SDC4-ROS1*）非小細胞肺癌マウス皮下移植 PDX モデル

資料番号	4.2.1.1-23
タイトル	*In vivo* efficacy of [redacted] in the treatment of LU-01-0414 tumor bearing Balb/c nude mice
試験方法	腫瘍細胞：LU-01-0414細胞 細胞移植：腫瘍ブロックを雌ヌードマウスの腹部皮下に移植 群割り付け：100～200 mm^3に達した時点で無作為割付（1群10匹） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（報告書中では [redacted] と表記，群分け日から1.5，5 mg/kg を1日2回21日間，15及び45 mg/kg は1日2回49日間経口投与，溶媒はエヌトレクチニブ低用量群と同様の投与スケジュール） 測定項目：腫瘍体積は週2回，体重は毎日計測した。 TGI 算出式： $\text{TGI（\%）} = 100 - \frac{\text{各投与群の腫瘍体積平均値} - \text{各投与群の腫瘍体積平均値（群分け時）}}{\text{対照群の腫瘍体積平均値} - \text{対照群の腫瘍体積平均値（群分け時）}} \times 100$
結果	エヌトレクチニブ1.5，5，15及び45 mg/kg 投与群の day 21における TGI は，順に44%，70%，111%及び113%であり，用量依存的な腫瘍増殖抑制活性を示した。投与期間中に投薬に伴う体重減少が認められた投与群は無かった。

2.6.3.2.4.3 頭蓋内移植モデル

(1) BNN4及びBNN2（*BCAN-NTRK1*）神経膠腫頭蓋内移植モデル

資料番号	4.2.1.1-24
タイトル	Somatic chromosomal engineering identifies *BCAN-NTRK1* as a potent glioma driver and therapeutic target
試験方法	腫瘍細胞：BNN4及び BNN2細胞（$p53^{-/-}$のマウスから採取した神経幹細胞に*BCAN-NTRK1*融合遺伝子を導入することで発生した神経膠腫から樹立した細胞株） 細胞移植：雌ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり5×10^5個移植 群割り付け：溶媒群9匹（BNN4細胞）又は7匹（BNN2細胞），エヌトレクチニブ投与群10匹（BNN4細胞）又は8匹（BNN2細胞） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（移植12日後から50 mg/kg を1日1回14日間経口投与） 測定項目：生存期間，頭蓋内での腫瘍増殖（小動物用 MRI を用いて移植13日後及び20日後に撮影）
結果	エヌトレクチニブ投与期間中（day 12～day 25）に，溶媒を投与した対照群では腫瘍のため，ほとんどの個体は死亡したが，エヌトレクチニブ投与群では投与期間中に死亡例はなく，対照群に比較し有意に生存期間が延長された（$P < 0.0001$，log-rank test）。BNN4細胞と同様の手法で作製したBNN2細胞を頭蓋内に移植した試験においても，エヌトレクチニブによる生存期間の延長が認められた。

(2) KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌移植モデル

資料番号	4.2.1.1-25
タイトル	*In vivo* anti-tumor efficacy and PK/PD study of entrectinib in the treatment of KM12-luc intracranial tumors on Balb/c nude mice (including bioanalytical reports)
試験方法	1) *In vivo* 腫瘍増殖 腫瘍細胞：KM12-Luc 細胞 細胞移植：雌ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり3 × 10^4個移植 群割り付け：移植5日後に発光強度を測定し，体重と発光強度に基づいて無作為割付（1群9匹） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（1日1回10及び30 mg/kg，1日2回1，5，15及び60 mg/kg を28日間経口投与） 測定項目：生存期間，頭蓋内での腫瘍体積（luciferase による生物発光） 2) *In vivo* でのシグナル伝達分子のリン酸化 KM12-Luc 細胞を頭蓋内移植したマウスに溶媒又はエヌトレクチニブ（5，15，30及び60 mg/kg）を1日2回のスケジュールで3回投与し，最終投与の3，8及び12時間後に腫瘍を採取した。腫瘍細胞を溶解し，TRK の下流シグナル伝達分子である PLCγ，AKT 及び S6の総蛋白質及びリン酸化レベルをウエスタンブロットにより検出した。
結果	1) エヌトレクチニブ投与は頭蓋内での KM12-Luc 細胞の増殖を用量依存的に抑制するとともに，マウスの生存期間を延長した。1日2回投与では5 mg/kg 以上，1日1回投与では10 mg/kg 以上の投与群で腫瘍増殖を抑制し，最大活性を示したのは，1日2回60 mg/kg 投与群であった。また，溶媒投与群では，17日目までに全例が腫瘍死したか又は体重減少が20%に達し安楽死の対象となったのに対し，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 以上の用量では，試験終了の28日目まで全個体が生存していた。 2) エヌトレクチニブは，5 mg/kg 以上の用量において，PLCγ，AKT 及び S6のリン酸化を用量依存的に阻害した。TRKA シグナル伝達系に対するエヌトレクチニブの阻害効果は，8時間目まで維持され，12時間目には緩やかな回復傾向が認められた。

(3) KM12-Luc（*TPM3-NTRK1*）結腸直腸癌移植モデル

資料番号	4.2.1.1-26
タイトル	*In vivo* anti-tumor efficacy of entrectinib in the treatment of KM12-luc intracranial tumor model on nude mice
試験方法	腫瘍細胞：KM12-Luc 細胞 細胞移植：雌ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり3 × 10^4個又は3 × 10^5個移植 群割り付け：移植5日後に発光強度を測定し，発光強度に基づいて群分け（1群9匹） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（群分け日から1日2回60 mg/kg を28日間経口投与） 測定項目：生存期間，頭蓋内での腫瘍体積（luciferase による生物発光）
結果	溶媒投与群では，12日までに全例が腫瘍死したのに対し，エヌトレクチニブ投与群では，強い腫瘍増殖抑制効果と生存期間の延長が認められた。

(4) NCI-H2228（*EML4-ALK*）非小細胞肺癌頭蓋内移植モデル

資料番号	4.2.1.1-27
タイトル	*In vivo* efficacy and target modulation of [redacted] in an ALK-dependent human non small cell lung cancer tumor xenograft
試験方法	腫瘍細胞：NCI-H2228細胞 細胞移植：雄ヌードマウスの頭蓋内に1匹あたり2×10^6個移植 群割り付け：MRI での計測により，平均腫瘍体積が0.015～0.018 cm^3に達した時点（溶媒群6匹，各エヌトレクチニブ投与群7匹） 薬物投与：溶媒又はエヌトレクチニブ（60及び120 mg/kg を1日2回10日間経口投与） 測定項目：腫瘍体積（MRI の T2強調画像において，高信号領域である浮腫に囲まれた等信号領域として検出し，腫瘍体積を算出した）
結果	対照群，エヌトレクチニブ60 mg/kg 及び120 mg/kg 投与群の生存期間中央値は， 順に31日，36日及び43日であり，用量増加とともに生存期間が延長される傾向を示した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test article: entrectinib

Study type	Test method	Concentration	Key results	資料番号
Kinase selectivity screen	Kinase screening platforms	100 nmol/L	Entrectinib potently inhibited 6 kinases >95% (ALK, ROS1, TXK, TRKA, TRKB, and TRKC), 2 kinases >80% (CSF1R and JAK2), 4 kinases >60% (ITK, LTK, MuSK, and TYK2) and 18 kinases >40%	4.2.1.2-1
Binding assay	Inhibition rate against binding of radiolabeled ligands to receptors/transporters/ion channels (39 molecules)	10 µmol/L	[>50% inhibition] α_{1A}, α_{2A}, D_1, D_{2S}, H_1, H_2, M_1, kappa (KOP), µ (MOP), PPARγ, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, Ca^{2+} channel (L, dihydropyridine site), Ca^{2+} channel (L, verapamil site), potassium channel hERG, Na^{+} channel (site 2), norepinephrine transporter, dopamine transporter, 5-HT transporter	4.2.1.2-2
Enzyme activity assay	Enzyme activity inhibition rate (2 enzymes)		[>50% inhibition] None	
Binding assay;	Inhibition rate against binding of radiolabeled ligands to receptors/transporters/ion channels (50 molecules);	10 µmol/L	[>50% inhibition] α_{2C}, CB_2, D_3, D_5, M_4, M_5, 5-HT_{5A}, 5-HT_6, 5-HT_7, sigma 2, sst_4, GR, Ca^{2+} channel (L, diltiazem site), choline transporter (CHT1)	4.2.1.2-3
Enzyme activity assay	Enzyme activity inhibition rate (9 enzymes)		[>50% inhibition] COX2	

Test article: 代謝物 M5

Study type	Test method	Concentration	Key results	資料番号
Binding assay	Inhibition rate against binding of radiolabeled ligands to receptors/transporters/ion channels (39 molecules)	10 μmol/L	[>50% inhibition] α_{1A}, D_{2S}, H_1, kappa (KOP), μ (MOP), PPARγ, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, Ca^{2+} channel (L, dihydropyridine site), Ca^{2+} channel (L, verapamil site), potassium channel hERG, Na^+ channel (site 2), norepinephrine transporter, dopamine transporter, 5-HT transporter	4.2.1.2-4
Enzyme activity assay	Enzyme activity inhibition rate (2 enzymes)		[>50% inhibition] None	
Binding assay;	Inhibition rate against binding of radiolabeled ligands to receptors/transporters/ion channels (50 molecules);	10 μmol/L	[>50% inhibition] α_{2C}, CB_2, D_3, δ (DOP), OX_1, 5-HT_{5a}, 5-HT_6, sst_4	4.2.1.2-5
Enzyme activity assay	Enzyme activity inhibition rate (9 enzymes)		[>50%inhibition] COX2	

2.6.3.4　安全性薬理試験

Test article: entrectinib

Study Type	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)/ Duration	Sex/N	Mean C_{max} (μmol/L)	Noteworthy Findings	資料番号
CNS – modified Irwin's test (GLP)	SD rat	Oral	0, 50, 100, 200 /single dose or 14 days)	5F/group	NOEL (M/F) Day 1: 3.32/4.58	NOEL: 100 mg/kg/day 200 mg/kg/day: No effect on Day 1, but abnormal gait on Day 14 No effect on body temperature	4.2.1.3-1 (4.2.3.2-3と同じ)
Cardiovascular hERG assay (non-GLP)	HEK 293 cells	*In vitro*	0.05, 0.5, 1.5, 15 μmol/L	-	-	Concentration-dependent inhibition ranging from 16% to 91% at tested concentrations (IC_{50} = 0.6 μmol/L)	4.2.1.3-2
Cardiovascular telemetry (non-GLP)	Beagle dog	Oral	300 /single dose	3F	NOEL (M/F) Day 1: 1.94/2.18 (TK data from study No. 0228-[redacted])	NOEL: 300 mg/kg: Increases in transient/slight blood pressure and body temperature were seen, but no physiological significance. No effects on heart rate and ECG parameters	4.2.1.3-3
Cardiovascular telemetry (GLP)	Beagle dog	Oral	0, 60, 120 /single dose (escalating dose)	2M/2F	NOEL (M/F) Day 1: 4.08/3.83 (TK data from study No. 0157-[redacted])	NOEL: 120 mg/kg: No effects on arterial blood pressure, heart rate, ECG parameters and body temperature	4.2.1.3-4
Respiratory (GLP)	SD rat	Oral	0, 50, 100, 200 /single dose	8F/group	NOEL (M/F) Day 1: 4.61/4.60 (TK data from study No. 0163-[redacted])	NOEL: 200 mg/kg: No effects on respiration-related parameters	4.2.1.3-5

Test article: 代謝物 M5

Study Type	Species/Strain	Method of Administration	Dose (mg/kg)/ Duration	Sex/N	Mean C_{max} (ng/mL)	Noteworthy Findings	資料番号
Cardiovascular hERG assay for M5 (non-GLP)	hERG 発現 哺乳類細胞	*In vitro*	0.3, 1, 3, 10 μmol/L	-	-	IC_{50} = 10.4 μmol/L (There is a possibility of estimating hERG inhibition low because of poor solubility of test article)	4.2.1.3-6

N = 個体数，CNS = 中枢神経系，ECG = 心電図，GLP =医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準，
hERG = ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子，NOEL = 無影響量，PO = 経口，SD = Sprague Dawley

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。