# 2.6.1　緒言

## 目次

1.　緒言 ..... 2
2.　参考文献 ..... 4

## 図目次

図 1　テポチニブの構造 ..... 2

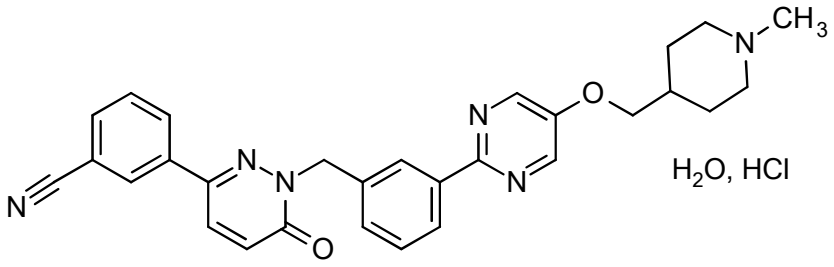
## 略語一覧

| | | |
|---|---|---|
| ATP | adenosine triphosphate | アデノシン三リン酸 |
| Ex14 | exon 14 | エクソン 14 |
| HGF | hepatocyte growth factor | 肝細胞増殖因子 |
| IL-8 | interleukin-8 | インターロイキン-8 |
| MET | mesenchymal-epithelial transition factor | 間葉上皮転換因子 |
| *MET* | mesenchymal-epithelial transition factor gene | 間葉上皮転換因子の遺伝子 |
| *MET*ex14 | exon 14 of *MET* gene | *MET* 遺伝子のエクソン 14 領域 |
| NSCLC | non-small cell lung cancer | 非小細胞肺癌 |
| PD | pharmacodynamic(s) | 薬力学 |
| PK | pharmacokinetic(s) | 薬物動態 |

# 1. 緒言

テポチニブ（化学名: 3-(1-{3-[5-(1-Methyl-piperidin-4-ylmethoxy)-pyrimidin-2-yl]-benzyl}-6-oxo-1,6-dihydro-pyridazin-3-yl)-benzonitrile), hydrochloride hydrate、開発記号 MSC2156119J 又は EMD1214063）は、受容体型チロシンキナーゼ MET（mesenchymal-epithelial transition factor）に対する I 型の可逆的な ATP（adenosine triphosphate）競合的低分子阻害剤である（CTD 3.2.S、1.1 項及び CTD 2.6.5、Appendix 参照）。テポチニブの化学構造を図 1 に示す。MET のキナーゼドメインに結合したテポチニブの構造が解明され、MET 分子に対する結合様式が確認されている。

**図 1　　テポチニブの構造**




Source（CTD3.2.S、1.2 項参照）.

- $C_{29}H_{31}N_6O_3Cl$ ($C_{29}H_{28}N_6O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$)
- 分子量: 547.05

テポチニブ（MSC2156119J）の基本的な物理化学的性質は、CTD 3.2.S、1.3 項及び 3.1 項に記載した。

間葉上皮転換因子遺伝子 *MET* は、細胞遊走、生存及び増殖を含む多面的作用を示しうる受容体型チロシンキナーゼ MET をコードする。その内因性リガンドは、細胞分散因子としても知られる肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor; HGF）である。

HGF の MET への結合は、受容体の二量体化を誘導してキナーゼドメイン中のチロシン残基を自己リン酸化し、MET 分子中にいわゆる「多機能結合部位」を形成させる。この HGF に誘導される MET の活性化に加えて、*MET* 遺伝子増幅などの *MET* 遺伝子の過剰発現または発癌性変異により、恒常的に活性化した受容体を産生するリガンド非依存的な活性化も起こりうる。MET リン酸化は、Grb2 及び Gab1 のような多数のエフェクター及びアダプタータンパク質の動員を可能にし、Ras/ERK 経路及び PI3K/Akt 経路などの細胞内シグナル伝達カスケードの活性化をもたらす（Comoglio 2018）。

MET は胚発生に必須であると共に、損傷した臓器、特に肝臓での創傷治癒及び再生に関与している（Bladt 1995、Chmielowiec 2007、Taub 2004）。MET/HGF 経路が発癌及び転移性腫瘍進行で主要な役割を果たしていることを示す、幾つかの証拠がある。活性化した MET は、上皮間葉転換を促進し、血管形成を刺激し、癌細胞の増殖、遊走及び浸潤を増加させ、アポトーシス及び他の癌治療に対する耐性を与える（Wu 2017、Pennacchietti 2003）。

腫瘍では MET の異常な活性化を引き起こす、以下のような幾つかの機序が知られている。

1) *MET* 遺伝子エクソン 14 のスキッピング変異（*MET*ex14）、*MET* 遺伝子の増幅、*MET* 遺伝子融合などの *MET* 遺伝子の発癌性変異。
2) 発癌性変異がない場合での MET 過剰発現。
3) HGF の自己分泌又は傍分泌による HGF の発現量増加（Wu 2017）。

特に *MET* 遺伝子の発癌性変異は、多くの種類の腫瘍で腫瘍性形質転換を引き起こして持続させることが報告されている。それらは、腫瘍での MET キナーゼの恒常的活性化、及び腫瘍の MET キナーゼ阻害に対する感受性を特徴とする、腫瘍の増殖及び生存が MET に強く依存した状態である「発癌依存性」をもたらす（Comoglio 2018）。

近年、*MET*ex14 スキッピング変異が注目されている。この変異には、*MET* 遺伝子のエクソン 14 のスプライス供与部位又はスプライス受容部位に影響を及ぼす様々な種類の点突然変異或いは挿入/欠失変異が含まれている。この変異は、安定性が増すと共に、増強されたより長期のシグナル伝達能力を持った短躯型の受容体を発現させ、最終的には MET による発癌活性化をもたらす（Cortot 2017）。この変異は、非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer; NSCLC）の約 3%、他の種類の癌では 1%未満の患者に観察されている。この変異は、NSCLC の中では、*EGFR*、*KRAS*、*ALK* 及び *ROS1* などの他の確立されたドライバー変異と相互に排他的に存在していると考えられる。*MET*ex14 変異は、MET 阻害剤に対する感受性と関連することが示されている（Frampton 2015、Awad 2016、Schrock 2016）。

テポチニブは、MET が活性化し、その増殖及び生存を MET に依存する腫瘍に対して、単剤療法又は併用療法の一部として使用されることが意図されている。CTD 2.6.2 及び CTD 2.6.3 では、*MET*ex14 スキッピング変更を有する NSCLC 患者に対するテポチニブ単剤療法の適応を支持するため、テポチニブ単剤療法のデータに焦点を当てる。薬効を裏付ける試験では、テポチニブが非常に選択的で、かつ強力な MET キナーゼ阻害剤であることが確認された。テポチニブは高分布容積（血漿中濃度より腫瘍組織内濃度の方が高値）を示したことから、in vitro 及び in vivo 試験で得られた腫瘍組織への集積及び保持並びに持続的な MET 阻害が結果として認められた。

テポチニブによる MET 阻害は、活性化 MET を有する腫瘍モデルにおいて、血漿中の MET シグナル伝達の阻害、及び腫瘍細胞の増殖、腫瘍の増殖及び生存の阻害、並びに腫瘍由来で血管新生を促進するインターロイキン 8（Interleukin-8; IL-8）の減少と関連していた。

テポチニブ単剤療法による in vivo 抗腫瘍作用は、異なる MET 活性化の機序を有する様々な癌種由来のモデルで観察された。しかし、テポチニブは、*MET*ex14 スキッピング変異や高度の *MET* 遺伝子増幅などの *MET* 遺伝子の発癌性変異を有する腫瘍で特に強い作用を示した。こうした腫瘍へのテポチニブ単剤療法による治療は、確立された腫瘍に対して、全般的に著しい腫瘍収縮としばしば完全な退縮をもたらした。

薬物動態/薬力学（PK/PD）試験及び腫瘍増殖モデリングにおいて、持続的かつほぼ完全（>95%）な MET 阻害が、腫瘍退縮のために必要であることが示され、最大の抗腫瘍効果の少なくとも 95%の効果を達成するために必要なテポチニブの血漿中濃度が確立された。これらのデータは、臨床第 II 相 Proof of Concept 試験で使用された 1 日 1 回 500 mg の用量選択を支持するものであった。

以下のセクションに示される非臨床試験成績は、発癌性 *MET* 変異を伴う腫瘍でのテポチニブ単剤療法の開発、特に *MET*ex14 スキッピング変異を有する NSCLC 患者へのテポチニブの適用を支持するものである。

テポチニブは、*MET*ex14 スキッピング変異を有する切除不能な進行・再発の NSCLC 患者への治療として、1 日 1 回 500 mg の推奨用量で投与される。

## 2. 参考文献

Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. J Clin Oncol. 2016 34:721-30.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, et al. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature. 1995 376:768-71.

Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. J Cell Biol. 2007 177:151-62.

Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. Nat Rev Cancer. 2018; 18:341-58.

Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C, et al. Exon 14 Deleted MET Receptor as a New Biomarker and Target in Cancers. J Natl Cancer Inst. 2017 109(5): 1-12.

Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. Cancer Discov. 2015 5:850-9.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell. 2003 3:347-61.

Schrock AB, Frampton GM, Suh J, et al. Characterization of 298 Patients with Lung Cancer Harboring MET Exon 14 Skipping Alterations. J Thorac Oncol. 2016 11:1493-502.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5:836-47.

Wu YL, Soo RA, Locatelli G, et al. Does c-Met remain a rational target for therapy in patients with EGFR TKI-resistant non-small cell lung cancer? Cancer Treat Rev. 2017 61:70-81.

# 2.6.2　薬理試験の概要文

## 目次

1.　まとめ ..... 8

2.　効力を裏付ける試験 ..... 11
2.1　効力を裏付ける in vitro 試験 ..... 12
2.1.1　MET 結合特性（PSR-NCETech-EMD1214063-004-proteros） ..... 12
2.1.2　生化学的キナーゼアッセイでの用量依存的な MET 阻害作用（PSR-NCETech-EMD1214063-001） ..... 13
2.1.3　テポチニブの選択性 (PSR-NCETech-EMD1214063-002、PSR-NCETech-EMD1214063-003、SER1071 及び 20150521-EMD-RC-KP-38) ..... 13
2.1.4　腫瘍細胞での HGF 依存性及び非依存性 MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-001） ..... 14
2.1.5　腫瘍細胞での MET シグナル伝達に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-001） ..... 16
2.1.6　腫瘍細胞の増殖及び足場非依存性増殖に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-002） ..... 17
2.1.7　腫瘍細胞の遊走に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-002） ..... 18
2.2　効力を裏付ける in vivo 試験 ..... 18
2.2.1　*MET*ex14 スキッピング変異又は高度 *MET* 遺伝子増幅を有する腫瘍 ..... 19
2.2.1.1　*MET*ex14 スキッピング変異を有する H596（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（ONC207-1-83MFH） ..... 20
2.2.1.2　*MET*ex14 スキッピング変異及び高度 *MET* 遺伝子増幅を有する Hs746T（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（PSR-ONC-EMD1214063-004） ..... 21
2.2.1.3　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する EBC-1（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（PSR-ONC-EMD1214063-004） ..... 22
2.2.1.4　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MKN-45（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-325-1-42-MFH） ..... 23
2.2.1.5　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）腫瘍の増殖及び AFP 分泌に対するテポチニブの抑制作用（CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW） ..... 23
2.2.1.6　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍の増殖、AFP 分泌及び肺転移巣形成に対するテポチニブの抑制作用（CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW） ..... 25
2.2.2　MET 融合蛋白質を有する腫瘍 ..... 28
2.2.2.1　MET 融合蛋白質（Tpr-Met）を発現する NIH 3T3 腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（PSR-ONC-EMD1214063-004） ..... 29
2.2.3　*MET* の発癌性変異を伴わず HGF/MET を共発現又は MET を過剰発現する腫瘍 ..... 30
2.2.3.1　MET を過剰発現する H441（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-190-1-66-MFH） ..... 30
2.2.3.2　HGF/MET を共発現する U-87MG（神経膠芽腫）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-190-1-51-MFH） ..... 31

2.2.3.3 HGF/MET を共発現する KP-4（膵癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-315-1-9-MFH） ..... 31
2.2.3.4 *EGFR* 変異を有し、MET を過剰発現する NSCLC 細胞の異種移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV 347-1-12-MFH、ONC373-1-38MFH 及び ONC373-1-39MFH） ..... 32
2.2.4 患者由来転移性脳腫瘍の異種移植モデルを用いた試験 ..... 34
2.2.4.1 患者由来転移性脳腫瘍の異種移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用と腫瘍の分子特性との関係（ONC20190605LC 及び ONC20190302CR） ..... 34
2.2.4.2 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する原発性肺腫瘍由来転移性脳腫瘍の PDX モデルでの腫瘍増殖に対するテポチニブの抑制作用（Crown Bioscience_E0177-U1708） ..... 36
2.3 PK/PD 試験 ..... 36
2.3.1 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する Hs746T 胃癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験（PSR-ONC-EMD1214063-003 及び PSR-ONC-EMD1214063-005） ..... 37
2.3.2 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験（RF6770 及び ONC367-1-65MFH） ..... 39
2.3.3 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対するテポチニブの用量依存的な阻害作用（ONC207-1-35MFH） ..... 41
2.3.4 PK/PD モデリング（RF6770） ..... 41
2.4 ヒト主要代謝物 MSC2571109A の効力を裏付ける試験 ..... 42
2.4.1 A549（NSCLC）細胞での HGF 依存性 MET リン酸化に対する MSC2571109A の阻害作用（ONCIRA00346CK） ..... 42
2.4.2 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対する MSC2571109A の in vivo 作用（ONC402-3-12MFH） ..... 42
2.4.3 KP-4 腫瘍を用いた MSC2571109A の PK/PD 試験（ONC401-1-11MFH、ONC401-1-12MFH、ONCKWI00221CK 及び ONCKWI00219CK） ..... 43

3. 副次的薬理試験 ..... 45
3.1 マウス皮膚の創傷治癒への影響（Merck[redacted]/237b） ..... 45

4. 安全性薬理試験 ..... 46
4.1 In vitro 安全性薬理試験 ..... 46
4.1.1 受容体結合、酵素阻害及び機能阻害プロファイリング（参考資料 8920141、参考資料 8920142、参考資料 8920150、参考資料 8920154 及び参考資料 8920158） ..... 46
4.1.2 Kv11.1（hERG）機能への影響（080415.DCC 及び参考資料 071025.TSP） ..... 47
4.1.3 Kv11.1（hERG）蛋白質輸送への影響（081124.TSP） ..... 47
4.1.4 心臓イオンチャネルへの影響（MSE-[redacted]-005B） ..... 47
4.1.5 摘出モルモット乳頭筋の収縮力及び不応期への影響（GSP_IO_001_[redacted]） ..... 48
4.2 In vivo 安全性薬理試験 ..... 48
4.2.1 心血管系 ..... 48
4.2.1.1 覚醒ラットの心血管系機能への影響（GSP0001CVP） ..... 48
4.2.1.2 覚醒イヌの心血管系機能への影響（GSP0002ECG） ..... 48
4.2.1.3 麻酔イヌの心血管系機能への影響（PDA0018） ..... 49
4.2.1.4 反復投与毒性試験で評価した覚醒ビーグル犬の心血管系機能への影響（T8421、T8427 及び[redacted]-DA009-N0） ..... 50
4.2.2 呼吸系 ..... 50
4.2.2.1 覚醒ラットの呼吸系機能への影響（[redacted].198/4） ..... 50

4.2.2.2 反復投与毒性試験で評価した覚醒イヌの呼吸機能への影響（T8421 及び T8427）.....50
4.2.3 中枢神経系.....50
4.2.3.1 覚醒ラットの中枢神経系機能への影響（T16160）.....50
4.2.3.2 反復投与毒性試験で検査した覚醒イヌの反射機能への影響（T8421 及び T8427）.....51
4.3 ヒト主要循環血中代謝物 MSC2571109A の安全性薬理試験.....51
4.3.1 受容体結合及び酵素阻害プロファイリング（参考資料 100021444）.....51
4.3.2 Kv11.1（hERG）機能への影響（RC10）.....51
4.3.3 心臓イオンチャネルへの影響（MRS031115-1）.....52
5. 薬力学的薬物相互作用.....52
6. 考察及び結論.....52
7. 図表.....56
8. 参考文献.....56

## 表目次

表 1 テポチニブとその遊離塩基の in vitro キナーゼスクリーニング試験.....13
表 2 腫瘍細胞での MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用.....15
表 3 KP-4 腫瘍を用いた MSC2571109A 及びテポチニブの反復投与 PK/PD 試験：血漿及び腫瘍組織中の MSC2571109A 及びテポチニブ濃度.....44
表 4 500 mg/日のテポチニブを投与した定常状態のヒトにおけるテポチニブと代謝物 MSC2571109A の血漿中最大濃度（$C_{max}$）.....54

## 図目次

図 1 ヒト MET 及びテポチニブ（遊離塩基）の結晶構造.....12
図 2 A549（NSCLC）細胞での HGF 依存性 MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用.....16
図 3 GTL-16、Hs746T 及び EBC-1 細胞での MET リン酸化及び下流のシグナル伝達に対するテポチニブの阻害作用.....17
図 4 H441（NSCLC）細胞の HGF 依存性遊走に対する 1 µM のテポチニブの阻害作用.....18
図 5 *MET*ex14 スキッピング変異を有する H596（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用.....20
図 6 *MET*ex14 スキッピング変異及び高度 *MET* 遺伝子増幅を有する Hs746T（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブ（遊離塩基）の抑制作用.....21
図 7 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する EBC-1（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブ及びその遊離塩基の抑制作用.....22
図 8 高度 MET 遺伝子増幅を有する MKN-45（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用.....23
図 9 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用.....24

図 10　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）腫瘍を有するマウスでのテポチニブによる血清 AFP 濃度低下作用 ..... 25
図 11　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 26
図 12　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍を有するマウスでのテポチニブによる血清中 AFP 濃度低下作用 ..... 27
図 13　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍を有するマウスでの肺転移巣形成に対するテポチニブの抑制作用 ..... 28
図 14　MET 融合蛋白質（Tpr-Met）を発現する NIH 3T3 腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 29
図 15　MET を過剰発現する H441（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 30
図 16　HGF/MET を共発現する U-87MG（神経膠芽腫）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 31
図 17　HGF/MET を共発現する KP-4（膵癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 32
図 18　*EGFR* 変異を有し、MET を過剰発現する H1975（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 33
図 19　EGFR 変異を有し、MET を過剰発現する PC-9 及び HCC827（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 33
図 20　患者由来転移性脳腫瘍の異種移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用と腫瘍の分子特性との関係 ..... 35
図 21　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する転移性脳腫瘍の PDX モデルでの腫瘍増殖に対するテポチニブの抑制作用 ..... 36
図 22　Hs746T 胃癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験: 腫瘍組織中のリン酸化 MET 濃度、腫瘍及び血漿組織中のテポチニブ濃度、並びに血漿中 IL8 濃度 ..... 38
図 23　KP-4 膵癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験: 腫瘍組織中のリン酸化 MET 濃度、腫瘍及び血漿組織中のテポチニブ濃度、並びに血漿中 IL8 濃度 ..... 40
図 24　HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対するテポチニブの用量依存的な阻害作用 ..... 41
図 25　HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対する MSC2571109A の in vivo 作用 ..... 43
図 26　KP-4 腫瘍を用いた MSC2571109A 及びテポチニブの反復投与 PK/PD 試験: 腫瘍組織中のリン酸化 MET 濃度 ..... 45

## 略語一覧

| | | |
|---|---|---|
| 5d+/2d- | treatment on 5 sequential days followed by 2 days off | 5 日間連日投与後 2 日間休薬 |
| A3 | adenosine A3 receptor | アデノシン A3 受容体 |
| AFP | alpha-fetoprotein | α-フェトプロテイン |
| ANOVA | analysis of variance | 分散分析 |
| ATP | adenosine triphosphate | アデノシン三リン酸 |
| AUC | area under the concentration vs time curve | 血漿中濃度-時間曲線下面積 |
| $AUC_{24}$ , $AUC_{0\text{-}24}$ | area under the concentration vs time curve up to the sampling time 24 hour | 投与後 24 時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 |
| $AUC_{\tau}$ | area under the concentration vs time curve within the dosing interval | 投与後 0 時間から次の投与までの血漿中濃度-時間曲線下面積 |
| BLOQ | below limit of quantification | 定量下限値未満 |
| $C_{max}$ | maximum concentration | 血漿中最大濃度 |
| CNS | central nervous system | 中枢神経系 |
| DA | dopamine | ドーパミン |
| DMSO | dimethyl sulfoxide | ジメチルスルフォキシド |
| dP/dt | time differential of blood pressure | 血圧の時間微分 |
| $dP/dt_{max}$ | maximum value of dP/dt | 血圧波微分の最大値 |
| ECG | electrocardiogram, elecrocardiography | 心電図、心電図検査 |
| EGFR | epidermal growth factor receptor | 上皮成長因子受容体 |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay | 酵素結合免疫吸着測定法 |
| Ex14 | exon 14 | エクソン 14 |
| $f_u$ | fraction unbound | 非結合型分率 |
| FFPE | formalin-fixed paraffin-embedded | ホルマリン固定パラフィン包埋標本 |
| Gab1 | Grb2 bindingprotein 1 | Grb2 結合蛋白質 1 |
| GCN | gene copy number | 増幅した遺伝子のコピー数 |
| 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 |
| Grb2 | growth factor receptor-bound protein 2 | 増殖因子受容体結合蛋白質 2 |
| hCav1.2 | human cardiac ion channels voltage-gated calcium 1.2 | $C_{AV}$1.2 型ヒトカルシウムイオンチャネル |

| | | |
|---|---|---|
| HCC | hepatocellular carcinoma | 肝細胞癌 |
| *hERG* | human ether-à-go-go related gene | ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 |
| HGF | hepatocyte growth factor | 肝細胞増殖因子 |
| hHCN4 | human cardiac ion channels hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium 4 | HCN4 型ヒト心筋カリウムイオンチャネル |
| hKCNQ1/hminK | human potassium voltage-gated channel KCNQ1 assembling the human minimal potassium channel subunit (minK) | KCNQ1/minK 型ヒト心筋カリウムイオンチャネル |
| hKir2.1 | human cardiac ion channels inward-rectifying voltage-gated potassium 2.1 | Kir2.1 型ヒト心筋カリウムイオンチャネル |
| hKv1.5 | human cardiac ion channels voltage-gated potassium 1.5 | Kv1.5 型ヒト心筋カリウムイオンチャネル |
| hKv4.3/hKChIP2 | human cardiac ion channels voltage-gated potassium 4.3 | Kv4.3 型ヒト心筋カリウムイオンチャネル |
| hNav1.5 | human cardiac ion channels voltage-gated sodium 1.5 | Nav1.5 型ヒト心筋ナトリウムイオンチャネル |
| HPLC | high performance liquid chromatography | 高速液体クロマトグラフィー |
| HPLC-MS/MS | HPLC with tandem mass spectrometric detection | 高速液体クロマトグラフィー接続直列型質量分析 |
| H&E | hematoxylin and eosin | ヘマトキシリン - エオジン染色 |
| I1 | imidazoline receptor 1 | イミダゾリン I1 受容体 |
| $IC_{50}$ ($IC_{25}$, $IC_{75}$) | half maximal inhibitory concentration (25% or 75% inhibitory concentration) | 50%阻害濃度（25%、75%阻害濃度） |
| ICH | International Conference on Harmonization of Technical Requirements and Registration of Pharmaceuticals for Human Use | 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 |
| IHC | immunohistochemistry | 免疫組織化学（的検査） |
| IL-8 | interleukin-8 | インターロイキン-8 |
| LLOD | lower limit of detection | 検出下限値 |
| M1 (M2, M3) | muscarinic receptor 1 (or 2 or 3) | ムスカリン M1（M2, M3）受容体 |
| MET | mesenchymal-epithelial transition factor | 間葉上皮転換因子 |
| *MET* | mesenchymal-epithelial transition factor gene | 間葉上皮転換因子の遺伝子 |

| | | |
|---|---|---|
| *MET*ex14 | exon 14 of *MET* gene | *MET* 遺伝子のエクソン 14 領域 |
| MFI | mean fluorescence intensity | 平均蛍光強度 |
| MT3 | melatonin binding site 3 (formerly known as ML2) | メラトニン結合部位 3 |
| N | number of animals | 動物数 |
| N.A., N/A | not applicable | 非該当 |
| NC | not calculable | 算出不能 |
| NE | norepinephrine | ノルエピネフリン |
| NOD | non-obese diabetic | 非肥満糖尿病の |
| NSCLC | non-small cell lung cancer | 非小細胞肺癌 |
| PD | pharmacodynamic(s) | 薬力学 |
| PDE6 | phosphodiesterase 6 | ホスホジエステラーゼ 6 |
| PDX | patient-derived xenografts | 患者由来異種移植片 |
| Phospho-MET | phosphorylated MET | リン酸化 MET |
| PK | pharmacokinetic(s) | 薬物動態 |
| *PTEN* | phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 | 癌抑制遺伝子の 1 つ |
| QD, qd | once a day | 1 日 1 回 |
| Q2d (q3d) | every second (third) day | 2 日（3 日）に 1 回 |
| RESP | response | 反応 |
| RP2D | recommended phase 2 dose | 第 II 相試験推奨用量 |
| RTV | relative tumor volume | 相対腫瘍量 |
| SCID | severe combined immune deficiency | 重症複合免疫不全 |
| SD | standard deviation | 標準偏差 |
| SEM | standard error of the mean | 平均値の標準誤差 |
| TF1 | tablet formulation 1 | 処方 1 錠剤 |
| $t_{max}$ | time to reach maximum concentration | 最高血漿中濃度到達時間 |
| *tpr* | translocated promoter region | 転座プロモーター領域(遺伝子名) |
| T/C | treated to control | 平均腫瘍体積の対照に対する割合 |
| TV | mean tumor volume | 平均腫瘍体積 |
| Wt | wild type | 野生型 |

# 1. まとめ

間葉上皮転換因子（mesenchymal-epithelial transition factor; MET）は、*MET* 遺伝子によってコードされる受容体型チロシンキナーゼであり、胎児の発生、器官形成及び創傷治癒に不可欠である。癌の病態で、MET 及びそのリガンドである肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor; HGF）は、癌細胞の増殖、生存、遊走及び浸潤、並びに腫瘍血管新生を促進し、他の癌治療への抵抗性を媒介することにより、発癌及び腫瘍の進行に関与している。

テポチニブ塩酸塩水和物（以下、「テポチニブ」）（開発記号 MSC2156119J 又は EMD1214063）は、低分子 MET 阻害剤である。初期創薬段階では、その親化合物、すなわちテポチニブ遊離塩基（開発記号 MSC2156119A 又は EMD1160879）を一部の試験で使用した。

効力を裏付ける試験で、テポチニブは MET キナーゼ活性を強力かつ用量依存的に阻害し、50%阻害濃度（half maximal inhibitory concentration; $IC_{50}$）値は 1 桁のナノモル範囲であった。この効果は、単離 MET キナーゼドメインを用いたキナーゼアッセイ、HGF で刺激した完全長 MET 発現腫瘍細胞、及び *MET* 遺伝子増幅（HGF 非依存性 MET 活性化が生じる）を有する腫瘍細胞で認められた。テポチニブによる阻害作用は長期間持続し、血清蛋白質が存在してもあまり変化しなかった。

400 種類を超える一連の遺伝子組換えキナーゼに対する広範なキナーゼスクリーニングでテポチニブは MET に非常に高い選択性を示した。

テポチニブにより MET シグナル伝達が阻害され、感受性を示す腫瘍細胞をテポチニブで処理すると、腫瘍細胞の増殖、足場非依存性増殖及び HGF 依存性細胞遊走が用量依存的に抑制された。これらの作用はいずれも MET 活性化阻害と相関していた。

In vivo では、非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer; NSCLC）、肝細胞癌（hepatocellular carcinoma; HCC）及び胃癌といった種々の癌種に由来するヒト腫瘍を異種移植したマウスを用いてテポチニブを評価した。テポチニブの単剤での抗腫瘍効果は用量依存的であった。特に、*MET* 遺伝子の発癌性変異を有する腫瘍モデル、すなわち *MET* エクソン 14 スキッピング変異（*MET* exon 14 skipping alterations; *MET*ex14）を有する 2 種類の腫瘍モデル、発癌性の遺伝子組換え Tpr-Met 融合蛋白質を発現している 1 種類の腫瘍モデル、及び高度 *MET* 遺伝子増幅［腫瘍内の平均 *MET* 遺伝子コピー数（gene copy number; GCN）が 10 を超えるものと定義］を有する数種類の腫瘍モデルで顕著な in vivo 効果が認められた。これらの発癌性変異が存在すると、ほとんどの場合でテポチニブの単剤投与により完全な腫瘍退縮を含む強い効果が得られた。MET を過剰発現している（*MET* 増幅及びその他の発癌性 *MET* 変異をいずれも伴わない）一部の腫瘍及び HGF/MET 自己分泌循環を有する腫瘍でも抗腫瘍効果（主に腫瘍増殖抑制）が認められたが、発癌性変異を有する腫瘍と比較すると、概して弱いものであった。

高度の感受性を示す胃癌 Hs746T（*MET*ex14 スキッピング及び高度 *MET* 増幅）異種移植モデルを用いた薬物動態（pharmacokinetics; PK）/薬力学（pharmacodynamics; PD）試験で MET リン酸化を評価したところ、テポチニブの単回投与で MET 阻害作用が長時間持続することが確認された。MET リン酸化の阻害に伴って、血漿中ヒトインターロイキン（interleukin; IL）-8 濃度の低下、リン酸化ヒストン H3 及びサイクリン D1 濃度の低下、並びに腫瘍組織内 p27 のアップレギュレーションが認められた。これらの試験結果により、テポチニブの作用機序が腫瘍細胞増殖の抑制、細胞周期停止の誘導及び腫瘍血管新生促進因子（IL-8）の低減であることが、in vivo で確認された。さらに、これらの結果から、標的結合をモニタリングするための PD マーカーとして MET リン酸化を利用する根拠が得

られた。ヒト膵臓癌 KP-4 異種移植モデルを用いた単回投与 PK/PD 試験及び反復投与有効性試験から、最大の抗腫瘍効果を得るには持続的な MET 阻害が必要であることが示された。これらの試験のデータを用いて用量－曝露量－PD－効果の関係を定量的に推定し、生物学的作用量の特定及び臨床試験での投与レジメンの設定をサポートするための PK/PD モデリングを行った。

効力を裏付ける in vitro 及び in vivo 試験のデータから、テポチニブは強度の MET 活性化を有する腫瘍（MET 依存性腫瘍）に高い選択性を示し、その結果、これらの腫瘍に顕著な抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。このことから、テポチニブを投与する患者を、腫瘍の MET 依存性を確実に予測できるバイオマーカーに基づいて選別する必要があると考えられる。非臨床データによると、特に *MET* 遺伝子の発癌性変異（高度 *MET* 増幅、*MET*ex14 スキッピング及び *MET* 遺伝子の活性化型融合など）が MET の強力な活性化因子であり、高い特異性を有するテポチニブ投与への感受性を予測できると考えられる。

マウスを用いた in vivo 副次的薬理試験では、テポチニブを 50 mg/kg/日までの用量で 3～10 日間連日経口投与したとき、溶媒と比較して、創傷治癒（創幅、視覚的重症度スコア、創面積、再上皮化率及び肉芽組織成熟度）に対する作用は認められなかった。

テポチニブは進行癌患者の治療を目的としているため、医薬品規制調和国際会議（International Conference on Harmonization; ICH）S9 ガイドライン「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」の対象であり、それによると、具体的なリスクがない場合は、患者を対象とした試験及び製造販売承認をサポートするための独立した安全性薬理試験は一般的に必要ない。それでもなお、テポチニブ又はその遊離塩基を用いてオフターゲット作用並びに心血管系、呼吸系及び中枢神経系（central nervous system; CNS）機能への影響の有無を評価する広範な in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験を、ICH ガイドライン［ICH S7A「安全性薬理試験ガイドライン」（ステップ 4、2000 年）、ICH S7B「ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価」（ステップ 4）、及び ICH M3（R2）「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験実施についてのガイダンス」（2009 年）］に従って実施した。ラット及びイヌでのテポチニブの代謝プロファイルはヒトと同様であることから、毒性試験と同じく、これらが安全性薬理試験に適した動物種であると判断された。ほとんどの in vivo 試験は、臨床使用時の予定経路である経口投与で実施した。

比較又は安全域算出の根拠として、患者を対象とした最初の試験（試験番号 EMR200095-001）で治療用量 500 mg/日のテポチニブを錠剤（tablet formulation; TF）1 として投与したときの定常状態（サイクル 1、試験 14 日）で得られた最高血漿中濃度（maximum plasma concentration; $C_{max}$）の幾何平均値を使用した。定常状態での $C_{max}$ 値は 1291 ng/mL（遊離型：25.8 ng/mL）であり、これは総 $C_{max}$ 値 2.6 μM、遊離型 $C_{max}$ 値 0.05 μM［非結合型分率（fraction unbound; $f_u$）：2%］に相当する（CTD2.7.2、表 3 参照）。

In vitro オフターゲットプロファイリングアッセイで、オフターゲットへの結合に対する $IC_{50}$ 値/MET キナーゼへの結合に対する $IC_{50}$ 値比が 50 を下回ったのは、2 種類の受容体（メラトニン ML2 受容体及びイミダゾリン I1 受容体）のみであった。しかし、これらのオフターゲットは問題となるものではない（ML2 受容体）か、又は in vivo 試験でそのような相互作用が生じることを示すエビデンスがないものであった（I1 受容体）。心血管系の in vitro 試験でテポチニブは Kv11.1［ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子（human ether-à-go-go related gene; *hERG*）］チャネル電流を阻害し、その $IC_{50}$ 値は 1.2 μM であった。この濃度は、ヒトに臨床用量 500 mg を投与したときの定常状態で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値 0.05 μM（$f_u$：2%）の 24 倍である。テポチニブ及びその遊離塩基は 10 μM までの濃度で Kv11.1（hERG）チャネルトラフィッキング及びその他の重要な心臓イオンチャネル（hKv4.3/hKChIP2、

hCav1.2、hKv1.5、hKCNQ1/hminK、hKir2.1、hHCN4）に影響を及ぼさなかったが、例外として 10 μM のテポチニブ（遊離塩基）で hNav1.5 のわずかな（最大 26%）阻害が認められた。モルモット乳頭筋の収縮力への影響は累積濃度 30 μM までのテポチニブ（遊離塩基）で認められず、10 及び 30 μM で不応期がごくわずかに（最大 11%）延長した。

心血管系の in vivo 試験では、覚醒ラットにテポチニブ（遊離塩基）を 50 mg/kg/日までの用量で 8 日間連日経口投与したとき、心拍数及び動脈血圧への影響は認められなかった。覚醒イヌにテポチニブを 70 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、心拍数、動脈血圧及び心電図（electrocardiogram; ECG）パラメータ（心拍数で補正した QT 間隔を含む）への影響は認められなかった。また、イヌを用いた反復投与毒性試験（最長 39 週間投与）で動脈血圧及び ECG パラメータを測定したところ、39 週間試験で検討した最高用量である 30 mg/kg/日までのいずれの用量でも投与に関連した変化は認められなかった。30 mg/kg/日の用量で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値は、雄が 15.2 ng/mL、雌が 33.2 ng/mL であり、患者に推奨治療用量 500 mg/日を投与したときの平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL と同程度であった。受容体プロファイリングでテポチニブがイミダゾリン I1 受容体を阻害する可能性が示唆されたため、麻酔イヌを用いて局所及び全身血行動態パラメータに対するテポチニブ（遊離塩基、70 mg/kg、単回十二指腸内投与）の影響の有無を検討した。病態生理学的に意義のある影響は認められなかった。左室全体の $dP/dt_{max}$ の増加、局所心筋仕事量の増加及び代謝性冠血管拡張で示される軽度の陽性変力作用のみが認められた。

また、覚醒ラットにテポチニブを 200 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、呼吸系機能パラメータ（全身プレチスモグラフィー）、CNS 及び末梢神経系の状態を表すパラメータ（機能観察総合評価法）並びに体温への影響は認められなかった。イヌを用いた 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験で 40 mg/kg/日までの用量を投与したとき、呼吸数及び神経系反射（瞳孔対光反射、眼瞼反射、膝蓋腱反射及び肛門反射）への影響は認められなかった。

ヒト循環血中主要代謝物 MSC2571109A［キラル代謝物 M506（MSC2569775）の R-光学鏡像体］は、ヒトマスバランス試験で最初に特定された（報告書番号 EMR200095-007）。ICH S9 によると、ヒトで認められている代謝物を別個に評価する必要はない。それでもなお、ヒト主要代謝物 MSC2571109A の特性を評価する in vitro 及び in vivo 薬理試験並びに in vitro 安全性薬理試験を実施した。

MSC2571109A は細胞アッセイで HGF 誘導 MET リン酸化を阻害し（MSC2571109A の 2 種類のバッチを独立して測定したときの平均 $IC_{50}$ 値はそれぞれ 13 及び 26 nM）、その効力の範囲はテポチニブ（$IC_{50}$ 値は 1 桁のナノモル範囲）と同程度であった。しかし、in vivo では、MSC2571109A はテポチニブとは異なり、テポチニブを 200 mg/kg の用量で 1 日 1 回（every day; qd）投与したときよりも高い血漿中及び腫瘍内 MSC2571109A 曝露量が得られる用量で抗腫瘍効果を示さなかった。テポチニブは腫瘍組織内に豊富にみられるのに対し、MSC2571109A の単回及び反復投与試験で得られた腫瘍組織内 MSC2571109A 濃度は血漿中 MSC2571109A 濃度よりも低かった。さらに、MSC2571109A は MET リン酸化を一過性にしか阻害しなかったが、テポチニブは単回又は反復投与後 24 時間以上にわたり MET リン酸化を効果的に阻害した。したがって、ヒト主要代謝物 MSC2571109A はテポチニブの有効性にほとんど寄与しないと結論された。

MSC2571109A の in vitro 安全性薬理試験との比較又はそれによる安全域算出の根拠として、健康被験者に 500 mg/日の用量でテポチニブを 8 日間反復経口投与したときの定常状態で得られた $C_{max}$ の幾何平均値（CTD2.7.2、表 24 参照）を使用した。定常状態での MSC2571109A の $C_{max}$ 値は 313 ng/mL

（遊離型：3.7 ng/mL）であり、これは総 $C_{max}$ 値 0.62 μM、遊離型 $C_{max}$ 値 0.007 μM（$f_u$：1.2%）に相当する。

オフターゲットプロファイリング試験では、MSC2571109A は 4 種類のオフターゲット［アデノシン A3 受容体、ムスカリン M1 及び M2 受容体、並びにホスホジエステラーゼ-6（phosphodiesterase-6, PDE6）］のみに対して 10 μM で 50%を超える阻害を示した。これらのオフターゲット作用を示した濃度 10 μM は、ヒトに 500 mg/日を投与したときの定常状態で得られた MSC2571109A の平均遊離型 $C_{max}$ 値 0.007 μM の 1400 倍を超えるものであることから、臨床でオフターゲット作用が生じるリスクはないと考えられる。

In vitro Kv11.1（hERG）アッセイでは、MSC2571109A は 3 μM（実濃度：2.7 μM）までの濃度でテール電流振幅に明らかな影響を及ぼさなかったが、10 μM でテール電流振幅を 24.9%減少させた。MSC2571109A の影響が認められなかった実濃度 2.7 μM と、ヒトに臨床用量 500 mg/日のテポチニブを投与したときの定常状態で得られた MSC2571109A の平均遊離型 $C_{max}$ 値 0.007 μM と比較して算出された安全域は広かった（約 386 倍）。MSC2571109A は 30 μM までの濃度でその他の重要な心臓イオンチャネル（hKv4.3/hKChIP2、hCav1.2、hKv1.5、hKCNQ1/hminK、hKir2.1、hHCN4）を阻害しなかった。

## 2. 効力を裏付ける試験

MET 受容体型チロシンキナーゼは、細胞の遊走、生存及び増殖を含む多面的作用を媒介する。MET は生理学的条件下で浸潤性増殖並びに筋肉、肝臓及び胎盤といった複数の胚組織の形態形成を制御することから、胚発生に不可欠である。さらに MET は創傷治癒及び損傷した器官（特に肝臓）の再生に関与している（Bladt 1995、Chmielowiec 2007、Taub 2004）。

MET のリガンドは HGF であり、これは「細胞分散因子」としても知られている。HGF が MET に結合すると、受容体の二量体化並びに MET のキナーゼドメイン及び多機能結合部位に存在するチロシン残基の自己リン酸化が引き起こされる。MET のリン酸化により増殖因子受容体結合蛋白質 2（growth factor receptor-bound protein 2; Grb2）及び Grb2 結合蛋白質 1（Gab1）といった数種類のエフェクター及びアダプター蛋白質が動員され、その結果、Ras/ERK 及び PI3K/Akt 経路などの細胞内シグナル伝達カスケードが活性化される（Comoglio 2018）。

MET/HGF 系は発癌及び腫瘍の進行に大きく関与している。腫瘍内で MET シグナル伝達が異常に活性化されると、癌細胞の増殖、生存、上皮間葉転換、遊走及び浸潤が促進され、腫瘍血管新生が刺激され、他の癌治療に抵抗性を示すようになる（Wu 2017、Pennacchietti 2003）。腫瘍内 MET 活性化のメカニズムには、MET 又は HGF の過剰発現又は *MET* 遺伝子増幅、*MET*ex14 スキッピング若しくは *MET* 融合といった発癌性変異が含まれる（Wu 2017）。

テポチニブはアデノシン三リン酸（adenosine triphosphate; ATP）競合的かつ可逆的なタイプ I の低分子 MET 阻害剤である。本章では、テポチニブの作用機序及び抗腫瘍効果を検討した非臨床 in vitro 及び in vivo 試験を要約する。テポチニブ（塩酸塩水和物）とその遊離塩基はいくつかの生化学的アッセイ、細胞アッセイ及び in vivo 試験で活性がほぼ同じであることが確認された（報告書番号 PSR-NCETech-EMD1214063-001 及び PSR-ONC-EMD1214063-004 参照）。

## 2.1　効力を裏付ける in vitro 試験

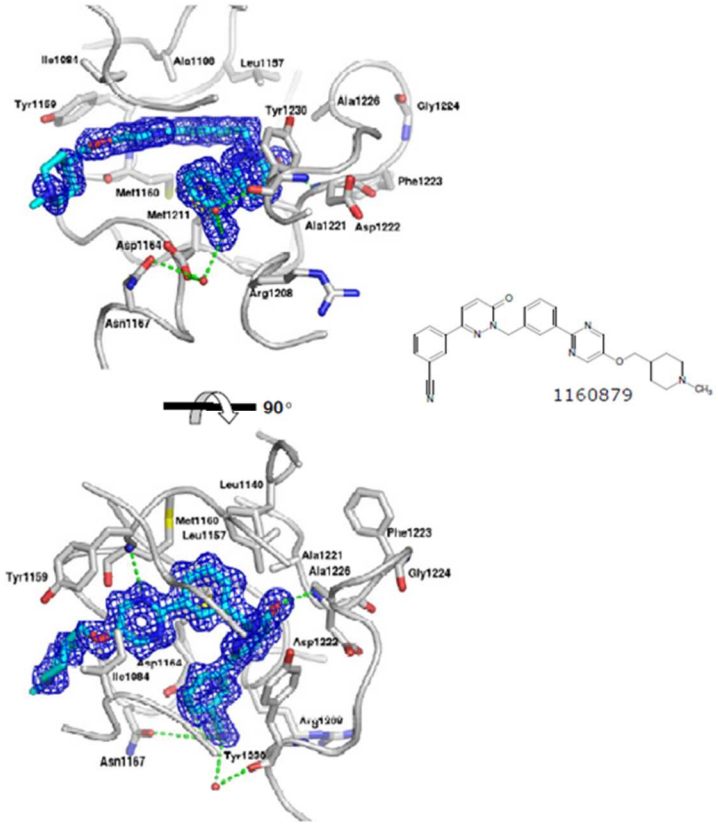
In vitro 薬理試験で、テポチニブは高度に選択的かつ強力な MET 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤であることが示された。遺伝子組換え MET 蛋白質を用いた生化学的アッセイ並びに HGF で MET を活性化した腫瘍細胞及び MET が恒常的に（HGF 非依存的に）活性化している腫瘍細胞を用いた細胞アッセイでテポチニブの活性が認められた。MET を阻害すると、それに伴って下流のシグナル伝達並びに MET 依存的な腫瘍細胞の増殖、生存、足場非依存性増殖及び遊走が効果的に抑制された。

### 2.1.1　MET 結合特性（PSR-NCETech-EMD1214063-004-proteros）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.1

テポチニブの MET への結合特性を明らかにするため、テポチニブの遊離塩基と MET キナーゼドメインとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。本化合物は U 字型コンフォメーションの ATP 結合部位に結合したことから、テポチニブはタイプ I の ATP 競合的かつ可逆的な低分子 MET 阻害剤であることが示された（図 1）。

**図 1　ヒト MET 及びテポチニブ（遊離塩基）の結晶構造**




Source: Study Report PSR-NCETech-EMD1214063-004-proteros / Figure 1. Crystal structure of the MET kinase domain in complex with tepotinib (free base, EMD 1160879, for nomenclature refer to Module 3.2.S.1.1 and Section 2.6.5 Appendix) at a resolution of 1.20 Å.

### 2.1.2 生化学的キナーゼアッセイでの用量依存的な MET 阻害作用（PSR-NCETech-EMD1214063-001）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.2

His6 タグを付けた遺伝子組換えヒト MET キナーゼドメイン（974 位～末端のアミノ酸残基）、[$\gamma^{33}$P] 標識 ATP 及びビオチン化ペプチド基質［ビオチン化ポリ（AlaGluLysTyr）、6:2:5:1］を用いた生化学的フラッシュプレートアッセイでテポチニブの MET キナーゼ活性阻害能を評価した。テポチニブは 2 回の独立した測定で MET キナーゼ活性を阻害し、$IC_{50}$ 値はそれぞれ 1.7 及び 1.8 nM であった。テポチニブの遊離塩基は 4 回の独立した測定で MET キナーゼ活性を阻害し、平均 $IC_{50}$ 値は 3.7 nM であった。

### 2.1.3 テポチニブの選択性（PSR-NCETech-EMD1214063-002、PSR-NCETech-EMD1214063-003、SER1071 及び 20150521-EMD-RC-KP-38）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.3～6

表 1 に要約する幾つかの in vitro キナーゼスクリーニング試験でテポチニブの選択性を評価した。全体として、これらのキナーゼスクリーニング試験では、MET 及び変異型 MET 以外の 400 種類を超える一連のキナーゼ及び変異型キナーゼに対してテポチニブ又はその遊離塩基を評価した。

**表 1 テポチニブとその遊離塩基の in vitro キナーゼスクリーニング試験**

| Study | Test compound | Concentration(s) | # of kinases and kinase variants |
|---|---|---|---|
| PSR-NCETech-EMD1214063-002 | Free base of tepotinib (MSC2156119A) | 10 µM | 31<br>and<br>5 MET kinase domain mutants |
| PSR-NCETech-EMD1214063-003 | Free base of tepotinib (MSC2156119A) | 1 µM | 74 |
| SER1071 | Tepotinib | 1 µM, 0.1 µM | 298<br>and<br>MET wild-type + 6 MET kinase domain mutants |
| 20150521-EMD-RC-KP-38 | Tepotinib | 1 µM | 385<br>and<br>MET wild-type + 13 MET kinase domain mutants |

Source: Study Reports PSR-NCETech-EMD1214063-002; PSR-NCETech-EMD1214063-003; SER1071 and 20150521-EMD-RC-KP-38. Summary of in vitro kinase screens performed with tepotinib and its free base. The preformed screens are partially redundant regarding the kinases tested. For example, all 31 kinases tested at 10 µM in Study PSR-NCETech-EMD1214063-002 were also assessed in at least one of the other screens at 1 µM concentration. Overall, more than 400 different kinases or kinase variants were analyzed in these four kinase screens. MET: Mesenchymal-epithelial transition factor.

テポチニブの遊離塩基は 10 μM で MET とは無関係の 31 種類のキナーゼのうち 5 種類（ALK、Axl、Blk、Ron 及び TrkB）の活性を 50%超阻害した（報告書番号 PSR-NCETech-EMD1214063-002）。テポチニブのヒト血漿蛋白結合率が 98%であることを考慮すると、10 μM の濃度は、第 I 相試験 EMR 200095-001 で 1 日用量 500 mg（錠剤 TF1）を投与したときの定常状態（サイクル 1、投与 14 日）で得られた遊離型 $C_{max}$ 値の平均値の約 190 倍、最高値の約 80 倍に相当する（試験番号 EMR200095-001）。このスクリーニングで分析した全 31 種類のキナーゼを別の 1 種類以上のスクリーニングでも使用し、1 μM の濃度で評価した。表 1 に記載したスクリーニング全体で、テポチニブ又はその遊離塩基が 1 μM で 50%を超える阻害作用を示したのは、MET とは無関係の 400 種類を超えるキナーゼのうち Axl、IRAK1、IRAK4、TrkA 及び TrkC のみであった（報告書番号 20150521-EMD-RC-KP-38、PSR-NCETech-EMD1214063-003 及び SER1071）。この濃度で IRAK4 及び TrkC のみが 75%を超えて阻害されたが、この阻害作用がみられたのは 1 種類のキナーゼスクリーニングのみであり（報告書番号 20150521-EMD-RC-KP-38）、これらのキナーゼを含む別のスクリーニングでは同様の阻害作用は認められなかった（報告書番号 SER1071）。1 μM の濃度は、患者に 1 日用量 500 mg を投与したときの定常状態で得られたテポチニブの平均遊離型 $C_{max}$ 値の約 19 倍に相当することから、これらのオフターゲット活性で病態生理学的に意義のある影響は生じないと考えられる。テポチニブは 0.1 μM の濃度では、この濃度で検討した一連の 298 種類のキナーゼのうち MET とは無関係のキナーゼをいずれも阻害しなかった（報告書番号 SER1071）。

これらのいずれのキナーゼスクリーニングアッセイでも、テポチニブは 1 及び 0.1 μM の濃度で野生型 MET をほぼ完全に（99%以上）阻害した。さらに、テポチニブは、キナーゼドメイン又は膜近傍ドメインの点変異（T992I、V1092I、T1173I 及び M1250T など）で生じた数種類の変異型 MET も効果的に（80%超）阻害した（報告書番号 20150521-EMD-RC-KP-38 及び SER1071）。20150521-EMD-RC-KP-38 試験では、D1228 及び Y1230 位のキナーゼドメイン変異を有する変異型 MET に対して、テポチニブは 1 μM で活性を示さなかった（キナーゼ活性阻害率：20%以下）。SER1071 試験では、テポチニブは 1 μM でこれらの変異型 MET を阻害したが（75%超）、0.1 μM での阻害活性は弱いものに過ぎなかった（阻害率：23%～53%）。乳頭状腎癌を含む多くの臨床腫瘍検体で MET のキナーゼドメイン又は膜近傍ドメインの点変異が特定されている（Tovar 及び Graveel 2017）。特記すべきこととして、MET の D1228 及び Y1230 位のアミノ酸残基に影響を及ぼす変異は、クリゾチニブや capmatinib といったタイプ I の MET 阻害剤に対する耐性の獲得と関連している（Bahcall 2016、Heist 2016、Li 2017、Ou 2017）。

キナーゼプロファイリングデータから、テポチニブは高度に選択的な MET 阻害剤であることが示された。したがって、非臨床モデル（in vitro 及び in vivo）及び患者で認められたテポチニブの抗腫瘍効果は明らかに MET 阻害作用によるものと考えられる。

### 2.1.4　腫瘍細胞での HGF 依存性及び非依存性 MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-001）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.7

生化学的アッセイ以外に、生存腫瘍細胞として 2 種類の NSCLC 細胞株（A549 及び EBC-1）及び 2 種類の胃癌細胞株（GTL-16 及び Hs746T）を用いてテポチニブの MET 阻害能を検討した。EBC-1、GTL-16 及び Hs746T 細胞は *MET* 遺伝子増幅に伴い、リガンドである HGF の非存在下でも MET

の恒常的なリン酸化及び活性化がみられる（Asaoka 2010、Kim 2018、Lutterbach 2007）。また、Hs746T 細胞は *MET*ex14 スキッピング変異も有している（Asaoka 2010、Kim 2018）。A549 細胞は発癌性 MET 変異を有しておらず、MET 受容体を HGF 刺激により活性化する必要がある（Lutterbach 2007）。細胞を無血清培地中でテポチニブにより 45 分間前処理した。その後、A549 細胞は 100 ng/mL の HGF で 5 分間刺激した後に溶解し、EBC-1、GTL-16 及び Hs746T 細胞は HGF 刺激非存在下でテポチニブ処理を行った直後に溶解した。酵素結合免疫吸着測定法（enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）で MET チロシンリン酸化レベルを測定することにより、MET 活性化を評価した。テポチニブは 4 種類の全ての細胞株で MET リン酸化を強力に阻害し、$IC_{50}$ 値は 1 桁のナノモル範囲であった（表 2）。したがって、細胞アッセイで得られた阻害活性は、生化学的アッセイで得られた活性と高度に類似していた。

表 2　　腫瘍細胞での MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用

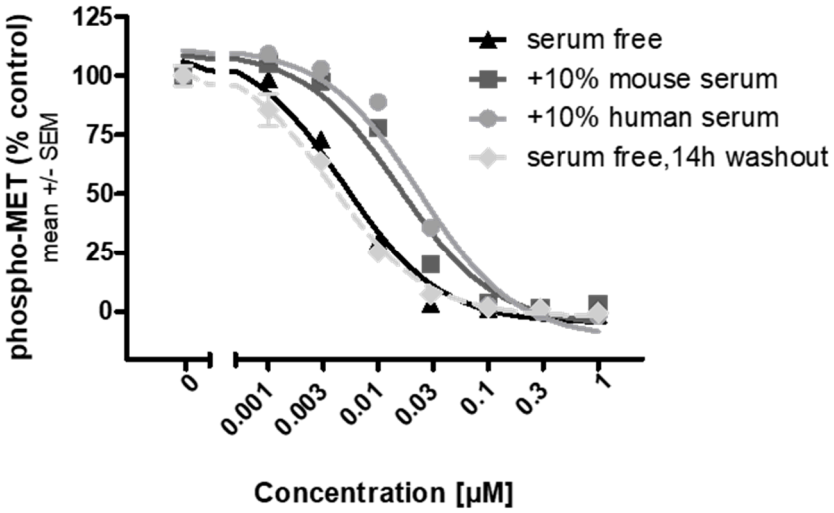
| Cell line | Mode of MET activation | Tepotinib $IC_{50}$ |
|---|---|---|
| A549 (NSCLC) | Stimulation with 100 ng/mL HGF | 5.4 nM |
| EBC-1 (NSCLC) | *MET* gene amplification | 1.1 nM |
| GTL-16 (gastric cancer) | *MET* gene amplification | 2.9 nM |
| Hs746T (gastric cancer) | *MET* gene amplification and *MET*ex14 skipping | 2.5 nM |

Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-001. Inhibition of MET phosphorylation in A549 (NSCLC), EBC-1 (NSCLC), GTL-16 (gastric cancer), and Hs746T (gastric cancer) cell lines. EBC-1, GTL-16, and Hs746T cells are *MET* amplified (Hs746T also harbors a *MET*ex14 skipping alteration) and have constitutively phosphorylated (activated) MET. A549 cells express normal MET levels and MET phosphorylation needs to be induced by HGF. Phospho-MET levels were determined by a capture ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). HGF: Hepatocyte growth factor, $IC_{50}$: Half maximal inhibitory concentration, MET: Mesenchymal-epithelial transition factor, NSCLC: Non-small cell lung cancer.

洗浄試験では、A549 細胞を上記のようにテポチニブで 45 分間処理したが、100 ng/mL の HGF で刺激する前に、細胞をテポチニブ不含培地で 14 時間インキュベートした。45 分間のテポチニブとのインキュベーション（及びその後の細胞外化合物の除去）により、テポチニブ除去 14 時間後でも HGF 誘導 MET リン酸化が完全に阻害され、平均 $IC_{50}$ 値は 5.3 nM であった（図 2）。これらのデータから、テポチニブの速やかな取込み及び細胞内滞留により MET 阻害作用が長時間持続することが示された。さらに、A549 細胞での HGF 誘導 MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用は、10%（v/v）マウス又はヒト血清が存在してもあまり変化せず、平均 $IC_{50}$ 値はそれぞれ 21.0 及び 23.0 nM であった（図 2）。

これらの所見を総合すると、テポチニブは生存腫瘍細胞の MET を生化学的アッセイと同程度の効力で阻害することが示された。さらに、リガンド依存性及び非依存性 MET 活性化を有する細胞株で、MET 活性化のメカニズムに関係なくテポチニブの強力な MET 阻害作用が認められた。テポチニブの阻害作用は、血清蛋白質が存在してもあまり変化しなかった。

図 2 A549（NSCLC）細胞での HGF 依存性 MET リン酸化に対するテポチニブの阻害作用



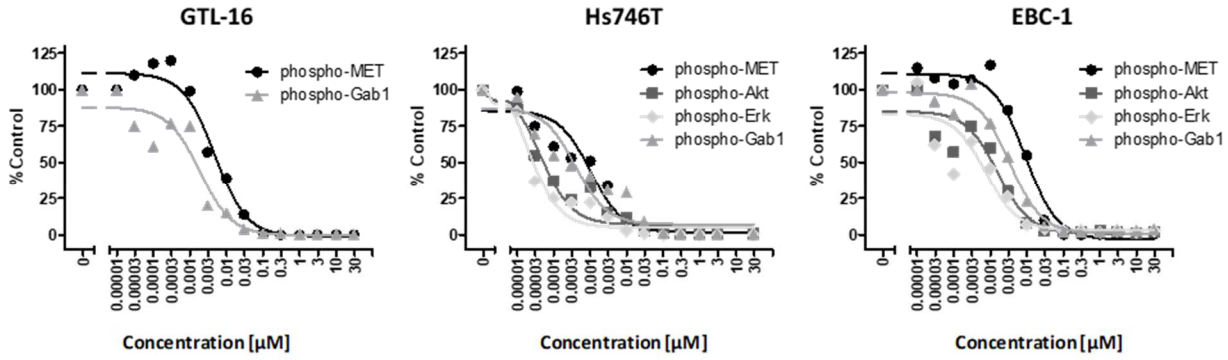

Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-001 / Figure 1. Dose-dependent inhibition of MET phosphorylation in A549 NSCLC cells. A549 cells were incubated for 45 min with tepotinib in serum-free medium or medium containing 10% mouse or human serum. Subsequently, cells were stimulated with 100 ng/mL HGF for 5 min before cell lysis. In one experimental set-up A549 cells were incubated in compound-free, serum-free medium for 14 hours after tepotinib treatment and before HGF stimulation and cell lysis (“14 h washout”). MET phosphorylation was determined by a capture ELISA. Mean values of three replicates per concentration are plotted. HGF: Hepatocyte growth factor, MET: Mesenchymal-epithelial transition factor, NSCLC: Non-small cell lung cancer, SEM: Standard error of the mean.

### 2.1.5 腫瘍細胞での MET シグナル伝達に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-001）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.7

テポチニブによる MET 阻害が下流シグナル伝達に及ぼす作用を評価するため、EBC-1、GTL-16 及び Hs746T 細胞で MET の Y1234/35 位、Gab1 の Y627 位、Akt の S473 位、及び ERK1/2 の T202/Y204 位のリン酸化を、リン酸化部位特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより分析した（図 3）。ペルオキシダーゼ標識二次抗体が触媒する反応で得られた発光シグナルを数値化し、得られたシグナル強度から $IC_{50}$ 値を算出した。テポチニブは 0.01 nM～30 µM の様々な濃度で検討を行った。この検出法により、テポチニブは EBC-1、GTL-16 及び Hs746T 細胞の MET リン酸化に対して数ナノモルの範囲で阻害作用を示すことが確認され、$IC_{50}$ 値はそれぞれ 9.2、4.8 及び 1.0 nM であった。テポチニブはアダプター/足場蛋白質 Gab1 のリン酸化も阻害し、$IC_{50}$ 値は 3.4 nM（EBC-1）、1.9 nM（GTL-16）及び 0.4 nM（Hs746T）であった。さらに、テポチニブは EBC-1 及び Hs746T 細胞の抗アポトーシス性 Akt シグナル伝達活性化及び ERK リン酸化（後者は増殖及びその他の細胞機能を媒介する Ras/Raf/Mek/Erk キナーゼカスケードの活性化を意味する）を効果的に阻害し、$IC_{50}$ 値は数ナノモル～ナノモル未満の範囲であった。GTL-16 細胞では Akt 及び Erk のリン酸化が十分な量で検出されず、信頼性のある定量ができなかった。

図 3　GTL-16、Hs746T 及び EBC-1 細胞での MET リン酸化及び下流のシグナル伝達に対するテポチニブの阻害作用




Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-001 / Figures 5-7. Analysis of tepotinib-mediated inhibition of phosphorylation of MET (Y1234/35), Gab1 (Y627), Akt (S473), and ERK (T202/Y204) in Hs746T, GTL-16, and EBC-1 cells by Western blotting (N=1). Luminescence signals from a reaction catalyzed by the peroxidase-coupled secondary antibody were digitally captured, and the determined signal intensities were quantified and used to calculate $IC_{50}$ values. Akt: Protein kinase B, Erk: Extracellular signal-regulated kinase 1, Gab1: Grb2-associated binding protein 1, MET: Mesenchymal-epithelial transition factor.

### 2.1.6　腫瘍細胞の増殖及び足場非依存性増殖に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-002）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.8

MET 及び下流シグナル伝達経路に対する強力な阻害作用を確認した後、テポチニブの細胞機能に対する阻害作用を検討した。MET は腫瘍細胞の増殖及び生存を促進する。テポチニブの腫瘍細胞増殖に対する作用を、胃癌細胞株 MKN-45 及び SNU-16 を用いた水溶性テトラゾリウム塩-1 アッセイで評価した。MKN-45 細胞は *MET* 遺伝子増幅に伴い MET の過剰発現及び恒常的活性化がみられるが、SNU-16 細胞は *MET* GCN が正常であるため非活性化型 MET を低レベルで発現している（Asaoka 2010、Kim 2018）。MKN-45 細胞をテポチニブ（遊離塩基）とともに 48 時間インキュベートすると生存が大幅に抑制され、$IC_{50}$ 値は 6.2 nM であった。一方、SNU-16 細胞はテポチニブ（遊離塩基）による MET 阻害に対する感受性がより低く、$IC_{50}$ 値は 2.8 µM であった（本項にはデータを示していない）。これらのデータから、テポチニブ処理に対する腫瘍細胞の感受性は MET 活性化に極めて依存しており、MET 依存性であることが示された。

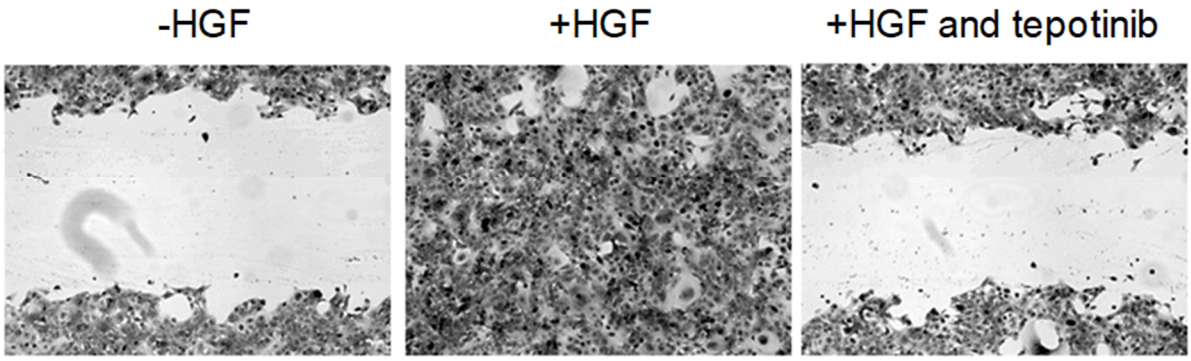
癌化した細胞の特徴は、3 次元での足場非依存性増殖能及び細胞外マトリックスに接触しない浮遊状態での生存能である。この状況を模倣するため、3 次元軟寒天マトリックス中（非癌化細胞はアノイキスにより死滅する）で細胞を増殖させた。マウス NIH 3T3 線維芽細胞をヒト HGF 及びヒト MET でトランスフェクトすることにより癌化させた S114 細胞は軟寒天中で増殖し、マウスに注入すると腫瘍を形成した。軟寒天で形成されたこれらの細胞のコロニーをテポチニブで 5 日間処理したとき、濃度依存的に増殖が阻害され、$IC_{50}$ 値は 1.8 nM であった（本項にはデータを示していない）。

### 2.1.7　腫瘍細胞の遊走に対するテポチニブの阻害作用（PSR-ONC-EMD1214063-002）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.8

HGF の別名「細胞分散因子」は、HGF/MET 系の活性化が細胞の運動性、遊走及び浸潤に顕著な影響を及ぼすことを意味している。HGF 依存性細胞遊走に対するテポチニブの阻害作用を、MET を過剰発現している H441 NSCLC 細胞を用いた in vitro「スクラッチアッセイ」で検討した。高密度 H441 細胞層を滅菌済みピペットの先端で引っ掻き、HGF（100 ng/mL）の存在下又は非存在下でインキュベートした。外因性 HGF の添加により細胞の遊走が誘発され、それによりスクラッチ領域が 24 時間以内に効果的に閉鎖した。HGF 非存在下ではスクラッチ領域の幅に変化は認められなかった。テポチニブ（0.1 nM の低濃度）で処理すると H441 細胞の遊走が抑制され、100 nM～10 µM の濃度ではほぼ完全に抑制された（図 4）。

図 4　H441（NSCLC）細胞の HGF 依存性遊走に対する 1 µM のテポチニブの阻害作用




Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-002. “Scratch assay” to assess tepotinib-mediated inhibition of tumor cell migration. A scratch was induced in a dense layer of H441 cells (MET overexpression). Addition of HGF (100 ng/mL) resulted in closure of the scratch by inducing cell migration. This was effectively inhibited by tepotinib at 1 µM HGF: Hepatocyte growth factor, MET: Mesenchymal-epithelial transition factor, NSCLC: Non-small cell lung cancer.

## 2.2　効力を裏付ける in vivo 試験

種々の癌種（NSCLC、胃癌及び HCC）に由来する様々な in vivo 腫瘍モデルでテポチニブの単剤での効力評価を行った。テポチニブは in vitro で MET に高度の選択性を示したことから、増殖及び生存が MET に依存している腫瘍に単剤で効果を示すと考えられた。したがって、in vivo 薬理試験では MET 経路が活性化している腫瘍モデルに特に重点をおいた。試験の目的は、MET の変化（バイオマーカー）から腫瘍の MET 依存性及びテポチニブの抗腫瘍効果を予測できるか否かを検討することであった。異なるメカニズムで MET 活性化が生じている数種類の腫瘍を用いてテポチニブを評価した。これらの腫瘍は、*MET*ex14 スキッピング変異、高度 *MET* 遺伝子増幅及び *MET* 融合といった *MET* 遺伝子の発癌性変異を有している腫瘍、MET/HGF が共発現している腫瘍（自己分泌による MET 活性化）、並びに発癌性変異以外の原因で MET が過剰発現している腫瘍であった。

腫瘍がいずれの MET 活性化メカニズムを有する場合でも、テポチニブは多くの腫瘍に対して単剤で顕著かつ用量依存的な効果を示した。ただし、テポチニブの抗腫瘍効果は発癌性 *MET* 変異（高度

*MET* 遺伝子増幅、*MET*ex14 スキッピング変異、*MET* 融合）を有する腫瘍で特に顕著であった。これらの腫瘍をテポチニブで処理すると、完全な腫瘍退縮を含む腫瘍の顕著な縮小が高頻度に認められた。一方、HGF の発現レベルが上昇している腫瘍及び発癌性 *MET* 遺伝子変異以外の原因で MET が高度に過剰発現している腫瘍では概してテポチニブの抗腫瘍効果がより弱く、完全な腫瘍退縮は認められなかった。

本項に記載するいずれの試験でも、テポチニブ（200 mg/kg qd まで）単剤投与時に、投与に関連した体重減少は認められなかったことから、テポチニブの忍容性は良好であることが示された。

腫瘍は（記載のない限り）皮下に移植した。一部の腫瘍増殖抑制作用のデータは、対照群に対する投与群（treated to control; T/C）の平均腫瘍体積（mean tumor volume; TV）の値として示しており、以下の式で算出した。

腫瘍退縮なし（投与群の投与終了時の TV - 投与群の投与開始時の TV ≥ 0）：

% T/C = ［(投与群の投与終了時の TV - 投与群の投与開始時の TV) / (対照群の投与終了時の TV - 対照群の投与開始時の TV)］ × 100

腫瘍退縮あり（投与群の投与終了時の TV - 投与群の投与開始時の TV < 0）：

% T/C = ［(投与群の投与終了時の TV - 投与群の投与開始時の TV) / 投与群の投与開始時の TV］ × 100

### 2.2.1 *MET*ex14 スキッピング変異又は高度 *MET* 遺伝子増幅を有する腫瘍

近年、*MET* 遺伝子のエクソン 14 のエクソンーイントロン境界線に影響を及ぼす多様な一連の変異（点変異、挿入／欠失）（*MET*ex14 スキッピング変異）が NSCLC の約 3%で生じており、その他の数種類の癌種にもそれより低い割合で生じていることが報告されている。*MET*ex14 スキッピング変異が生じるとスプライシングが変化するため、エクソン 14 がコードしている配列が mRNA 及び蛋白質レベルで完全に欠損する。その結果、MET の細胞内膜近傍ドメインが欠損し、それによって MET キナーゼ活性及び MET 蛋白質発現レベルを制御する負の調節エレメントが欠損する。NSCLC の *MET*ex14 スキッピング変異は *EGFR*、*KRAS*、*ALK* 又は *ROS1* といった遺伝子に認められているその他のドライバー変異とは相互排他的に生じると考えられる。*MET*ex14 スキッピング変異は発癌性 MET 活性化を引き起こし、MET 阻害剤への感受性と関連していることが示されている（Frampton 2015、Awad 2016）。

*MET*ex14 スキッピング変異を有する非臨床腫瘍モデルとして利用できるものは限られている。検討した肺癌細胞株 H596 及び胃癌細胞株 Hs746T 由来の両方の *MET*ex14 陽性モデルでテポチニブの有効性が認められた。Hs746T 細胞は *MET*ex14 スキッピング変異と同時に高度 *MET* 遺伝子増幅（GCN が 10 を超える）も有している。Hs746T 細胞のような *MET*ex14 スキッピング変異と *MET* 遺伝子増幅の同時発生は患者でも報告されている。*MET*ex14 スキッピング変異を有する NSCLC 腫瘍の約 15%～21%が同時に *MET* 増幅も有している（Cortot 2017）。

一方、*MET* 増幅は *MET*ex14 スキッピング変異を伴わずに生じることが多い。NSCLC ではその他の発癌性ドライバーが存在すると *MET* GCN 増加がみられる割合が減少し、高度 *MET* 増幅を有する

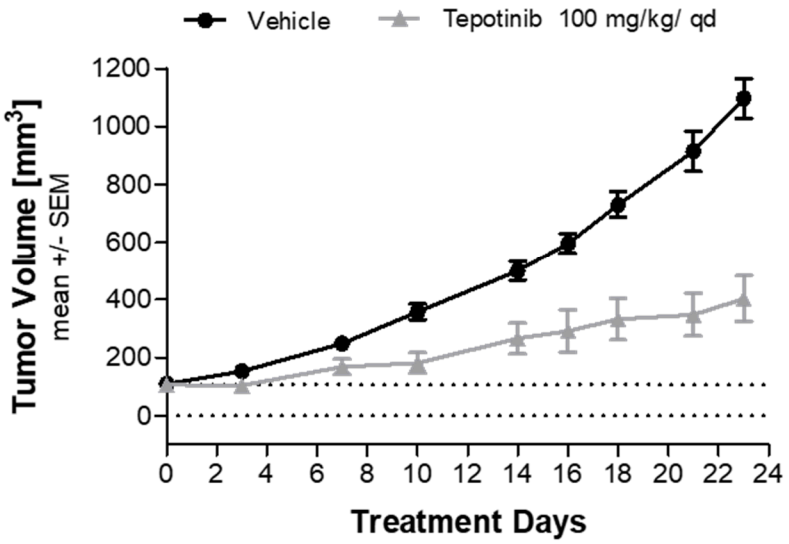
NSCLC ではその他の発癌性ドライバーがほとんど認められない（Drilon et al., 2016）。したがって、高度 *MET* 増幅自体が、腫瘍の MET 依存性を示す発癌性ドライバーである。

### 2.2.1.1 *MET*ex14 スキッピング変異を有する H596（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（ONC207-1-83MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.9

H596 細胞は *MET*ex14 スキッピング変異を有しており、*MET* GCN は正常値である。また、H596 細胞はホスファチジルイノシトール-4,5-二リン酸 3-キナーゼ触媒サブユニット α（phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha; PIK3CA）変異を有しており、高レベルの EGFR を発現している（Li 2008、Smith 2017、Tanizaki 2011）。さらに、生着した H596 細胞由来腫瘍（約 100～150 $mm^3$）を有するマウスにテポチニブを 100 mg/kg qd の用量で 23 日間連日経口投与すると腫瘍増殖が顕著に抑制され、投与 23 日の T/C 値は 30%であった（図 5）。

図 5 *MET*ex14 スキッピング変異を有する H596（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report ONC207-1-83MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous H596 xenografts in humanized HGF SCID female mice (n=10/group). Established tumors (about 100 to 150 $mm^3$) were treated po with tepotinib (100 mg/kg qd) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 23 days. HGF: Hepatocyte growth factor, NSCLC: Non-small cell lung cancer, qd: Every day, SCID: Severe combined immunodeficiency, SEM: Standard error of the mean.

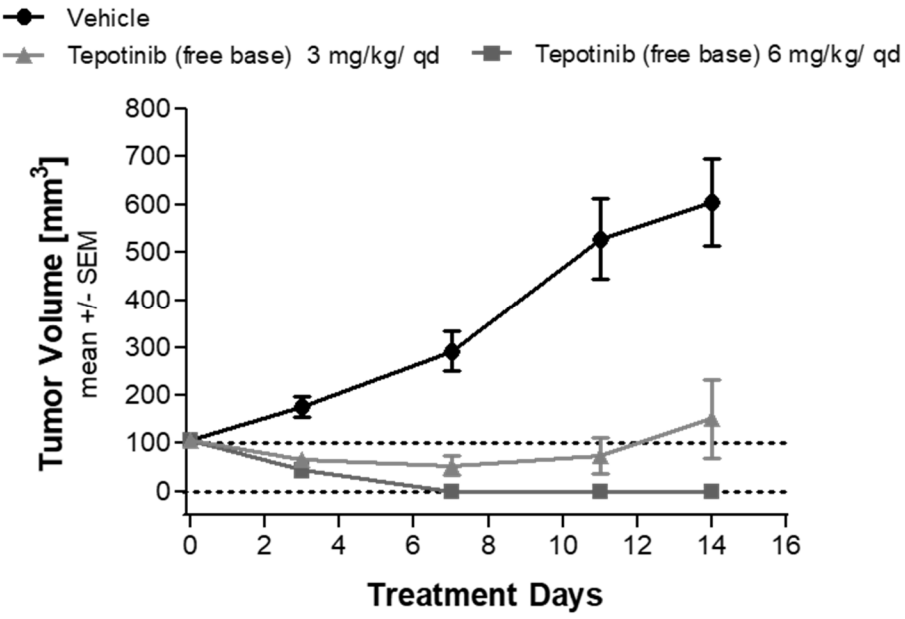
### 2.2.1.2 *MET*ex14 スキッピング変異及び高度 *MET* 遺伝子増幅を有する Hs746T（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（PSR-ONC-EMD1214063-004）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.10

生着した Hs746T 細胞由来腫瘍（約 100 $mm^3$）を有するマウスにテポチニブ（遊離塩基）を非常に低用量の 3 mg/kg qd で経口投与したときの T/C 値は 3%であり、試験終了時に 10 例中 5 例で腫瘍退縮が認められた。6 mg/kg qd では投与した 10 例中 10 例で完全な腫瘍退縮が認められた（図 6）。

さらに別の独立した試験でマウスにテポチニブ（遊離塩基）を 10 mg/kg の用量で 1 日 1 回、30 mg/kg の用量で 2 日に 1 回（every second day; q2d）又は 30 mg/kg の用量で 3 日に 1 回（every third day; q3d）経口投与したところ、それぞれ 10 例中 8 例、9 例中 9 例、及び 9 例中 9 例で完全な腫瘍退縮が認められたことから、Hs746T 腫瘍はテポチニブ投与に高い感受性を示すことが確認された（本項にはデータを示していない）。

図 6 *MET*ex14 スキッピング変異及び高度 *MET* 遺伝子増幅を有する Hs746T（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブ（遊離塩基）の抑制作用



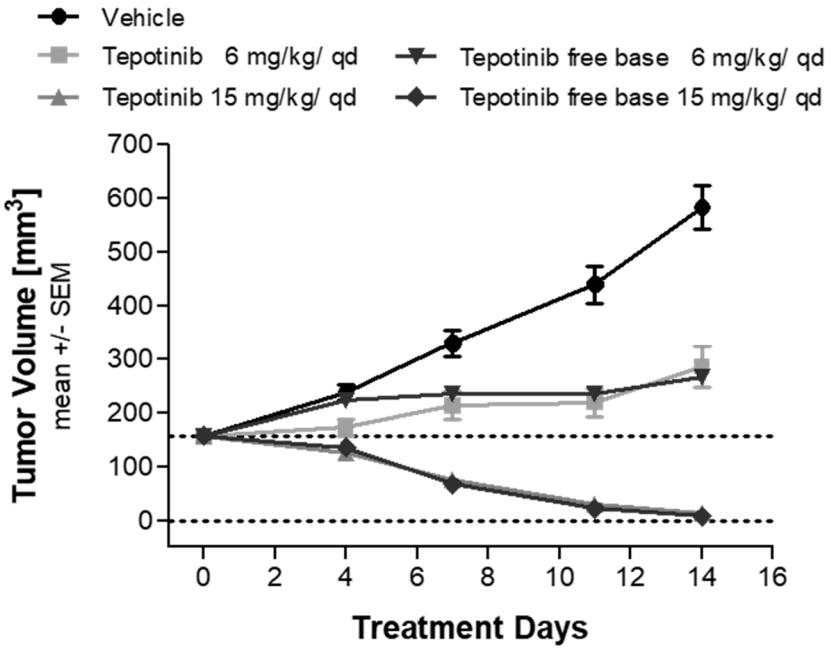

Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-004 / Figure 5. Tumor growth curves of subcutaneous Hs746T xenografts in female CD-1 nude mice (n=10/group). Established tumors (about 100 $mm^3$) were treated with tepotinib (3 or 6 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 14 days. qd: Every day, SEM: Standard error of the mean.

### 2.2.1.3 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する EBC-1（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（PSR-ONC-EMD1214063-004）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.10

EBC-1 NSCLC 細胞は高度 *MET* 増幅を有しており、*MET*ex14 スキッピング変異は有していない（Lutterbach 2007）。生着した EBC-1 異種移植腫瘍を有するマウスにテポチニブ及びその遊離塩基を 6 mg/kg qd の用量で 14 日間経口投与したとき、同程度の腫瘍増殖抑制作用（T/C 値はそれぞれ 48%及び 43%）が認められた（図 7）。15 mg/kg qd の用量では腫瘍退縮が効果的に誘導され、テポチニブ及びその遊離塩基でそれぞれ 10 例中 5 例及び 10 例中 7 例で完全な退縮が認められた。この in vivo 試験ではテポチニブとその遊離塩基の薬理学的同等性が確認された。

図 7 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する EBC-1（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブ及びその遊離塩基の抑制作用




Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-004 / Figure 2. Tumor growth curves of subcutaneous EBC-1 xenografts in female CD-1 nude mice (n=10/group). Established tumors (about 150 to 160 $mm^3$) were treated with tepotinib, its free base (both at 6 or 15 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 14 days. NSCLC: Non-small cell lung cancer, qd: Every day, SEM: Standard error of the mean.

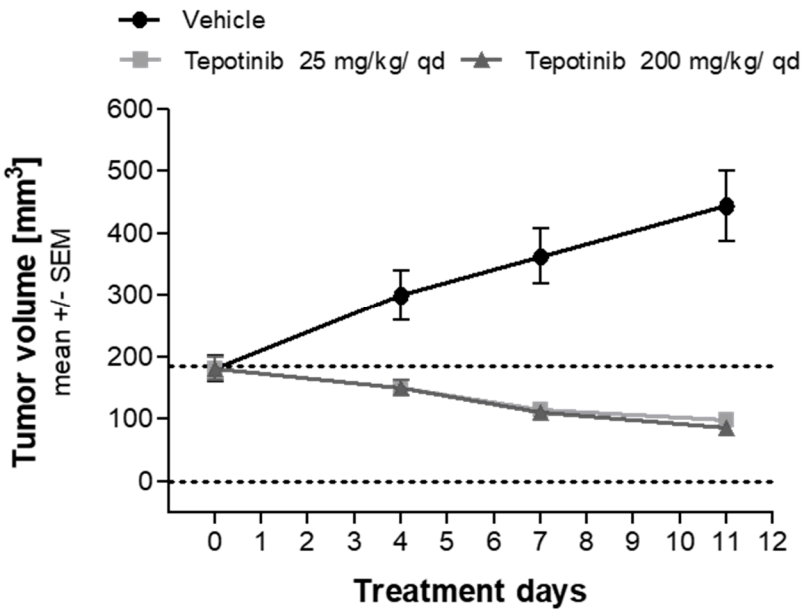
別の in vivo 試験でも EBC-1 腫瘍の増殖に対するテポチニブ（遊離塩基）の用量依存的な作用が更に確認されている。生着した EBC-1 腫瘍を有するマウスに 6 mg/kg qd の用量で連日経口投与すると腫瘍増殖がわずかに遅延し（投与 13 日の T/C 値：68%）、25 mg/kg qd の用量では 10 例中 10 例で完全な腫瘍退縮が認められた（本項にはデータを示していない）。

### 2.2.1.4 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MKN-45（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-325-1-42-MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.11

胃癌細胞株 MKN-45 も高度 *MET* 遺伝子増幅を有している（Asaoka 2010、Kim 2018）。生着した MKN-45 腫瘍を有するマウスにテポチニブを 25 及び 200 mg/kg qd の用量で連日経口投与すると、腫瘍増殖が顕著に抑制され、投与 11 日の T/C 値はそれぞれ-46%及び-52%であり（図 8）、いずれの用量でも 8 例中 4 例で部分的な腫瘍退縮（投与開始時と比較して投与終了時に腫瘍体積が 50%以上減少した場合と定義）が認められた。

図 8 高度 MET 遺伝子増幅を有する MKN-45（胃癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report DOV-325-1-42-MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous MKN-45 xenografts in female CD-1 nude mice (n=8/group). Established tumors (about 100 to 250 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 25 or 200 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 11 days. qd: Every day, SEM: Standard error of the mean.

### 2.2.1.5 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）腫瘍の増殖及び AFP 分泌に対するテポチニブの抑制作用（CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW）

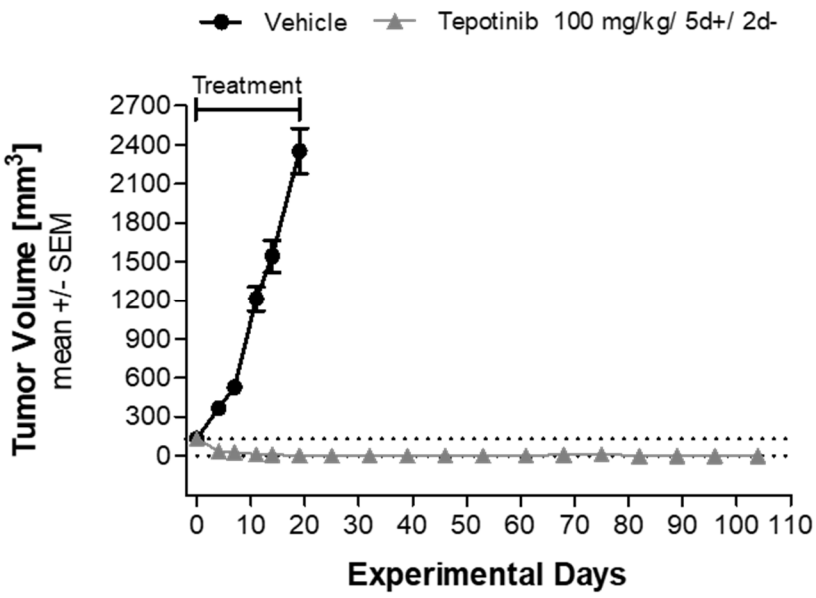
概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.12

ヒト HCC 細胞株 MHCC97H は、高い転移能を示すヒト原発性肝細胞癌細胞 LCI-D20 から得られた（Tian 1999）。MHCC97H 腫瘍細胞は高度 *MET* 遺伝子増幅に伴い MET の過剰発現及び恒常的活性化がみられる（Xie 2013、Zhang 2018）。MHCC97H 腫瘍細胞は α-フェトプロテイン（alpha-fetoprotein;

AFP）を分泌しており、これは HCC の重要なマーカーとして臨床で広く使用されている。ヒト HCC 細胞株 MHCC97H に対するテポチニブの作用を皮下移植及び同所性移植の両方で評価した。

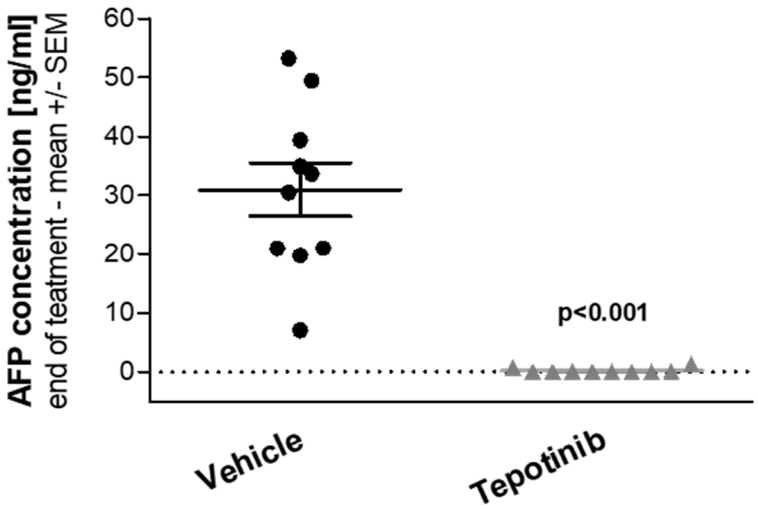
皮下に生着した MHCC97H 腫瘍を有するマウスにテポチニブを 100 mg/kg の用量で 5 日間連日経口投与後 2 日間休薬（treatment on 5 sequential days followed by 2 days off; 5d+/2d-）のサイクルにより 3 週間試験すると、10 例中 10 例で腫瘍が顕著に縮小し、そのうち 10 例中 9 例では完全な腫瘍退縮が認められた。これらのマウスでは、投与終了後 3 ヵ月間の追跡期間に腫瘍は検出されなかった（図 9）。試験 20 日（投与終了日）の血清中 AFP 濃度は、テポチニブ投与群の方が対照群より有意に低かった（$p < 0.001$）（図 10）。

図 9　　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW / Figure 2. Tumor growth curves of subcutaneously inoculated MHCC97H xenografts in male Balb/c nude mice (n=10/group). Established tumors (mean volume about 130 $mm^3$) were treated with tepotinib at 100 mg/kg (5d+/2d- po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 3 weeks. 5d+/2d-: Treatment on 5 sequential days followed by 2 days off, SEM: Standard error of the mean.

図 10　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）腫瘍を有するマウスでのテポチニブによる血清 AFP 濃度低下作用




Source: Study Report CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW. Serum AFP levels in subcutaneous MHCC97H tumor bearing male Balb/c nude mice (n=10/group) at Day 20 were measured by ELISA. Differences between the mean values of AFP levels between tepotinib treated (100 mg/kg/5d+/2d-) and vehicle control treated (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) mice were analyzed using the Student's t test ($p < 0.001$). AFP: alpha-fetoprotein, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, HCC: Hepatocellular carcinoma, SEM: Standard error of the mean.

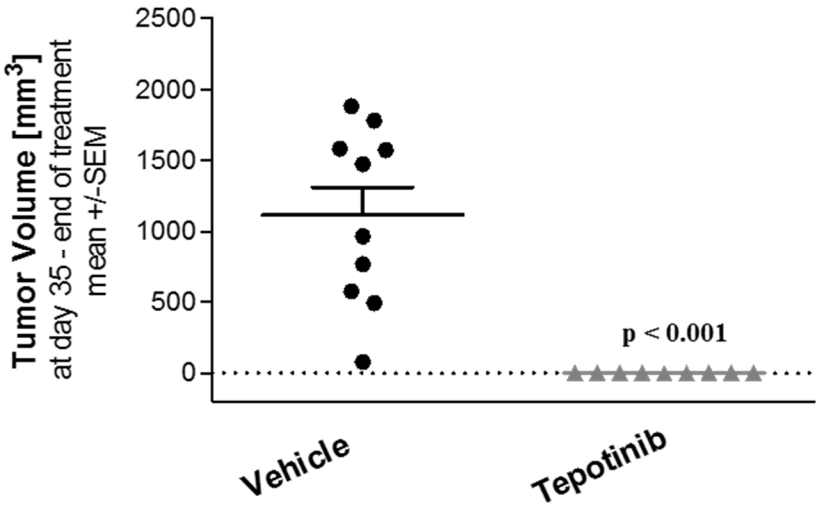
### 2.2.1.6　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍の増殖、AFP 分泌及び肺転移巣形成に対するテポチニブの抑制作用（CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.13

高度 *MET* 増幅 MHCC97H 腫瘍モデルのテポチニブ投与に対する感受性も同所性移植で検討した。マウスの肝臓左葉に MHCC97H 腫瘍片を移植した。腫瘍片移植後 7 日にテポチニブの経口投与を 100 mg/kg 5d+/2d-の用法用量で開始した。5 週間の試験後にマウスを屠殺し、血清中 AFP 濃度、全肝重量並びに原発性（肝臓内）腫瘍のサイズ及び重量を含む一連のパラメータを評価した。原発性腫瘍の体積（図 11）及び重量（本項にはデータを示してない）並びに循環血中 AFP 濃度（図 12）はテポチニブ投与群の方が対照群よりも有意に低い値であった（$p < 0.001$）。投与終了時に 9 例中 2 例ではもはや腫瘍が検出されず、残りのマウスでは投与終了時に検出された腫瘍の体積（1 $mm^3$ 未満）が最初に移植した腫瘍片（2～3 $mm^3$）よりも十分に小さかった（図 11）。

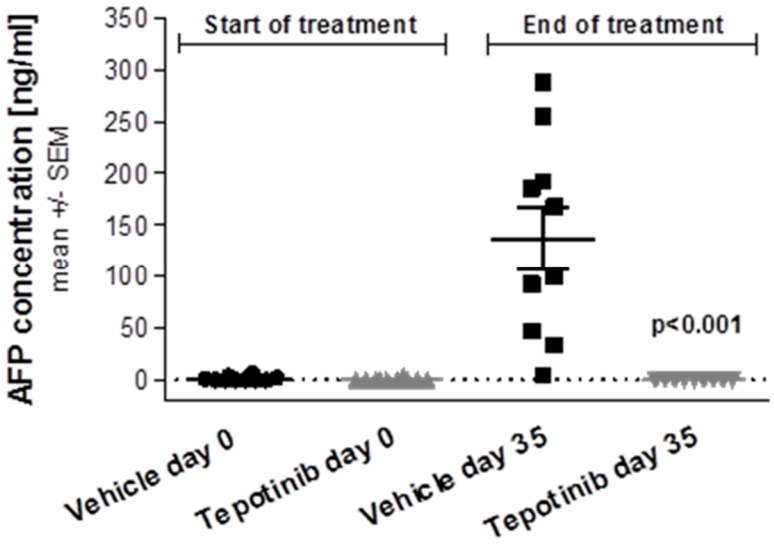
肝臓に移植した MHCC97H 腫瘍は高頻度で肺に転移するが、テポチニブ投与により、対照群と比較して肺内転移巣の数が有意に減少した（$p < 0.01$、図 13）。

図 11　　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用



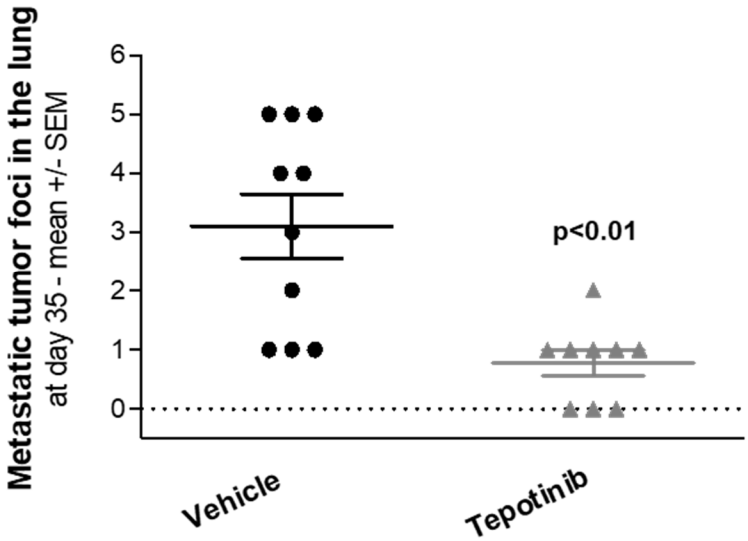

Source: Study Report CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW. Fragments derived from subcutaneously grown MHCC97H tumors were implanted into the left lobe of the liver of male BALB/c nude mice (n=9 or 10/group). Treatment with tepotinib at 100 mg/kg/5d+/2d- or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) started 7 days after tumor fragment implantation. After 5 weeks of treatment, mice were sacrificed, and primary (intrahepatic) tumor size was assessed. Mice treated with tepotinib had significantly smaller intrahepatic tumors compared to the control group ($p < 0.001$; Student's t test). SEM: Standard error of the mean.

図 12　　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍を有するマウスでのテポチニブによる血清中 AFP 濃度低下作用




Source: Study Report CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW. Serum AFP levels were measured by ELISA before and after treatment in all animals (n=9 or 10/group). Differences between the mean values of AFP levels between tepotinib treated (100 mg/kg/5d+/2d-) and vehicle control treated (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) animals at Day 35 (end of treatment) were analyzed for significance using the Student's t test ($p < 0.001$). AFP: alpha-fetoprotein, ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, SEM: Standard error of the mean.

図 13 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する MHCC97H（HCC）細胞の同所性移植腫瘍を有するマウスでの肺転移巣形成に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW. At necropsy, lungs (n=9 or 10/group) were inflated with 10% buffered formalin through the trachea and both the left and right lung of each animal were collected, formalin-fixed and embedded in paraffin. From each animal 3 H&E stained FFPE sections were examined for incidence of lung metastases and the number of metastatic foci. Contingency table analysis and chi square-tests were applied to study the relationship between treatment and lung metastasis. $p \leq 0.05$ was considered to be statistically significant. Tepotinb: 100 mg/kg/5d+/2d-, vehicle control: 20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5. FFPE: Formalin-fixed paraffin-embedded, H&E: Hematoxylin and eosin, SEM: Standard error of the mean.

以上の in vivo 薬理データを総合すると、テポチニブは *MET*ex14 スキッピング変異又は高度 *MET* 遺伝子増幅を有する腫瘍に顕著な抗腫瘍効果を示すことが明らかである。多くの場合、顕著な腫瘍縮小又は完全な腫瘍退縮までもが低用量のテポチニブで十分に達成された。これらのデータから、*MET*ex14 スキッピング変異及び高度 *MET* 遺伝子増幅は、腫瘍の MET シグナル伝達依存性を示す強力な発癌性ドライバーであることが立証された。

### 2.2.2 MET 融合蛋白質を有する腫瘍

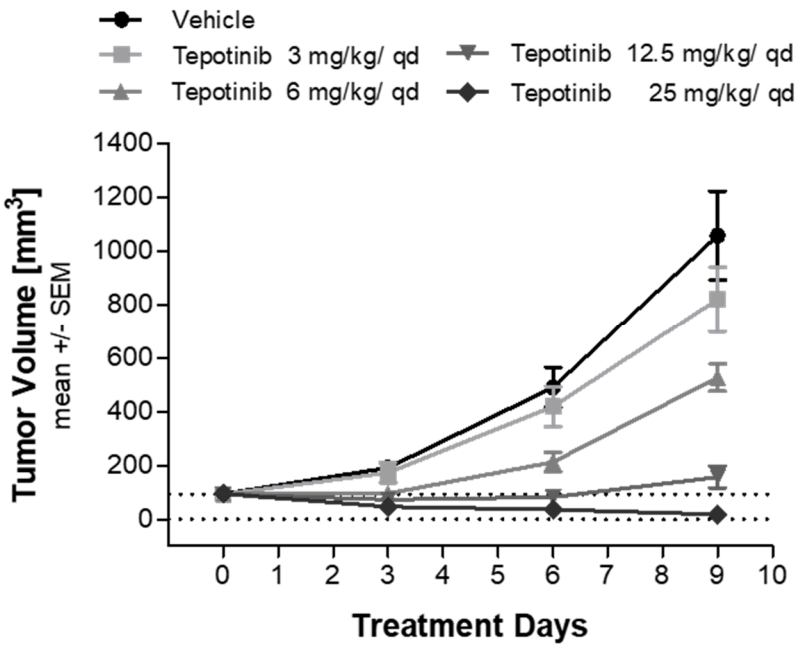
NSCLC を含む種々の適応癌の患者で MET 融合がみられた事例が報告されている。MET 融合は発癌性 MET 活性化を引き起こし、MET 阻害剤投与に感受性を示すと考えられる（Bender 2016、Davies 2017、Gow 2018）。1 番染色体と 7 番染色体の間の転座により強力なチロシンキナーゼ癌遺伝子 Translocated promoter region（Translocated promoter region; Tpr）-Met が形成される。この蛋白質は発癌性化学物質で処理した細胞で最初に特定された後、一部の胃癌でも認められた（Soman 1991）。NIH3T3 マウス線維芽細胞は Tpr-Met を発現させると癌化し、それをヌードマウスに移植すると侵襲性腫瘍を形成する。

### 2.2.2.1　MET 融合蛋白質（Tpr-Met）を発現する NIH 3T3 腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（PSR-ONC-EMD1214063-004）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.10

生着した Tpr-Met 発現 NIH 3T3 腫瘍（サイズ：約 90 $mm^3$）を有するマウスにテポチニブを 9 日間経口投与すると用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。12.5 mg/kg qd の用量で腫瘍増殖が強力に抑制され、25 mg/kg qd では 8 例中 4 例で完全な腫瘍退縮（視認可能及び触知可能な腫瘍がない場合と定義）が認められた（図 14）。いずれの用量でも忍容性は良好で、明らかな体重減少は認められなかった。

**図 14　MET 融合蛋白質（Tpr-Met）を発現する NIH 3T3 腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用**




Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-004 / Figure 3. Tumor growth curves of Tpr-Met expressing NIH 3T3 subcutaneous xenografts in female CD-1 mice (n=8/group). Established tumors (about 90 $mm^3$) were treated po with tepotinib at the indicated doses or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5) for 9 days; qd: Every day, SEM: Standard error of the mean.

同じ試験報告書に要約されている別の試験では、体積約 550 $mm^3$ の Tpr-Met 腫瘍を有する動物にテポチニブを 25 mg/kg qd の用量で投与し、テポチニブが大型の進行腫瘍のサイズも減少させるか否かを検討した。7 日間の短期の投与で腫瘍増殖が強力に抑制され、ほとんど測定不可能なサイズにまで腫瘍が退縮した（本項にはデータを示してない）。

これらのデータから、テポチニブは MET 融合蛋白質発現腫瘍に対して高度の活性を示し、生着した大型の MET 依存性腫瘍を縮小させることが明らかになった。

### 2.2.3　*MET* の発癌性変異を伴わず HGF/MET を共発現又は MET を過剰発現する腫瘍

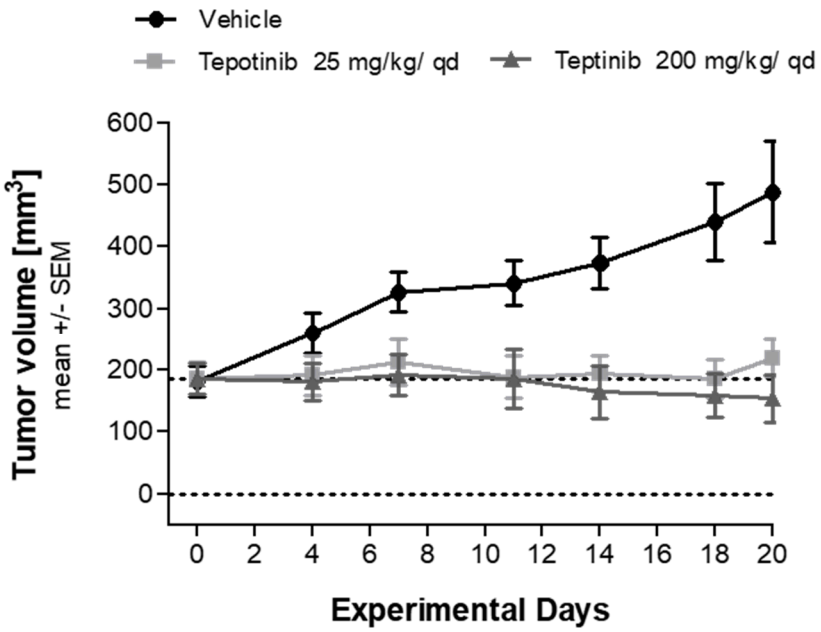
一部の腫瘍（MET の高度の過剰発現に伴って MET が恒常的に活性化している腫瘍を含む）では、発癌性 *MET* 遺伝子変異以外の原因で HGF 又は MET の発現レベルが上昇している（Wu 2017）。そうした HGF/MET の自己分泌循環を有するモデル、又は MET 過剰発現を有するモデルでもテポチニブの効力の検討を行った。

#### 2.2.3.1　MET を過剰発現する H441（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-190-1-66-MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.14

H441 NSCLC 細胞は高度 *MET* 遺伝子増幅及びその他の発癌性変異を有していないが、MET の過剰発現及び恒常的活性化がみられる（Matsubara 2010、Wu 2013）。生着した腫瘍を有するマウスにテポチニブを 25 及び 200 mg/kg qd の用量で連日経口投与すると腫瘍増殖が効果的に抑制され（試験 20 日の T/C 値はそれぞれ 11%及び-17%、図 15）、最高用量の 200 mg/kg qd では 8 例中 2 例で部分的な腫瘍退縮が認められた。

図 15　MET を過剰発現する H441（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用



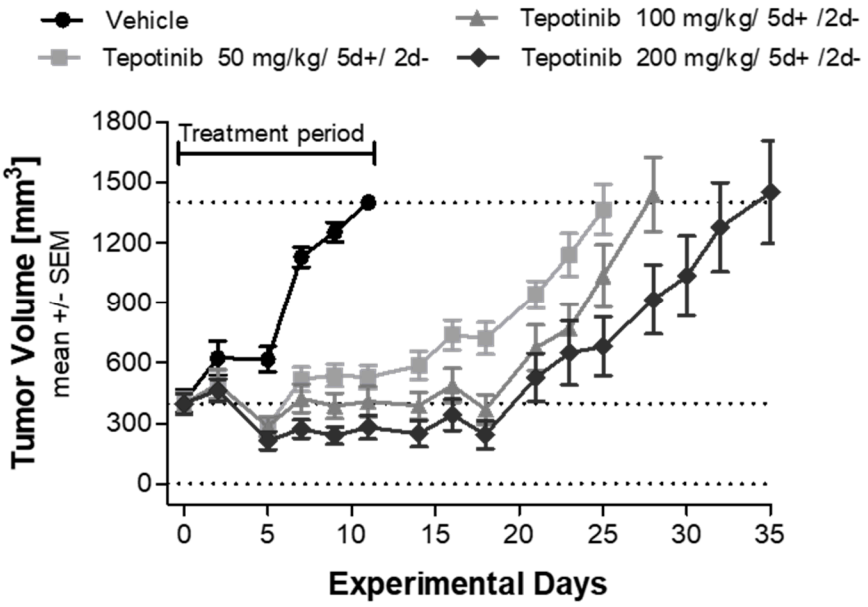

Source: Study Report DOV-190-1-66-MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous H441 xenografts in female CD-1 nude mice (n=8/group). Established tumors (mean volume about 180 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 25 or 200 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 20 days. NSCLC: Non-small cell lung cancer, qd: Every day, SEM: Standard error of the mean.

### 2.2.3.2 HGF/MET を共発現する U-87MG（神経膠芽腫）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-190-1-51-MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.15

神経膠芽腫U-87MG細胞では、HGF と MET の共発現に伴い MET の恒常的活性化がみられる（Zhang 2013、Zou 2012）。十分に生着したヒト U-87MG 腫瘍を有するマウスにテポチニブを 50、100 及び 200 mg/kg 5d+/2d-の用法用量で経口投与すると腫瘍増殖が用量依存的に抑制され、試験 11 日の T/C 値は、各用量でそれぞれ 13%、1%及び-30%であった（図 16）。最高用量の 7 例中 4 例で部分的な腫瘍退縮が認められた。

図 16 HGF/MET を共発現する U-87MG（神経膠芽腫）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report DOV-190-1-51-MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous U-87 MG xenografts in female CD-1 nude mice (n=8/group (n=7 for the 200 mg/kg dose group because one animal had to be euthanized at day 4 due to a po trauma)). Established tumors (mean volume about 400 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 50, 100, or 200 mg/kg po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5; all treatments 5d+/2d-, po) for 11 days. 5d+/2d-: Treatment on 5 sequential days followed by 2 days off, SEM: Standard error of the mean.

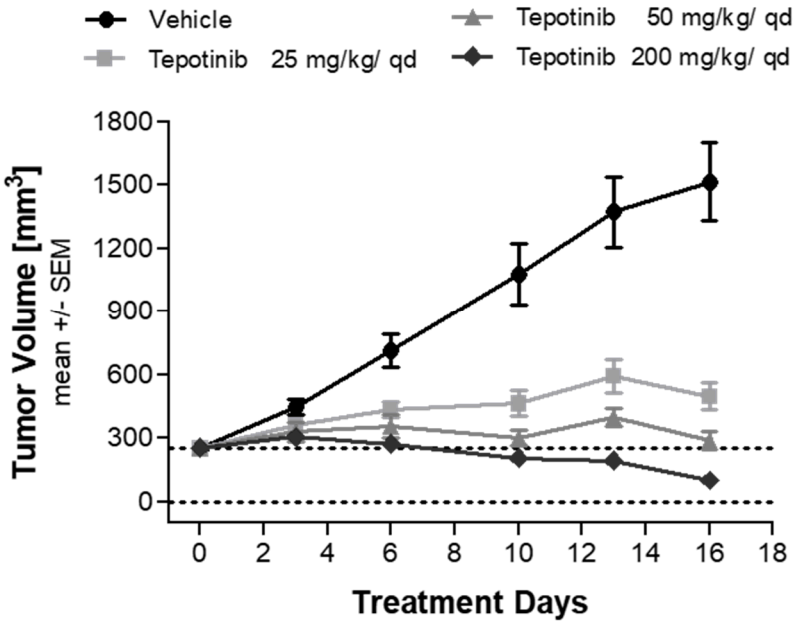
### 2.2.3.3 HGF/MET を共発現する KP-4（膵癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV-315-1-9-MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.16

ヒト膵癌細胞株 KP-4 でも MET と HGF が共発現しており、その結果、自己分泌による MET 活性化がみられる（Jin 2008）。生着した腫瘍を有するマウスにテポチニブを 25、50 及び 200 mg/kg qd の用量で経口投与すると、腫瘍増殖が用量依存的に抑制され、投与 16 日の T/C 値は各用量それぞれ

19%、3%及び-60%であった（図 17）。200 mg/kg qd 群では部分的な腫瘍退縮が 10 例中 7 例で認められたが、25 及び 50 mg/kg qd 群では認められなかった。

図 17 HGF/MET を共発現する KP-4（膵癌）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用



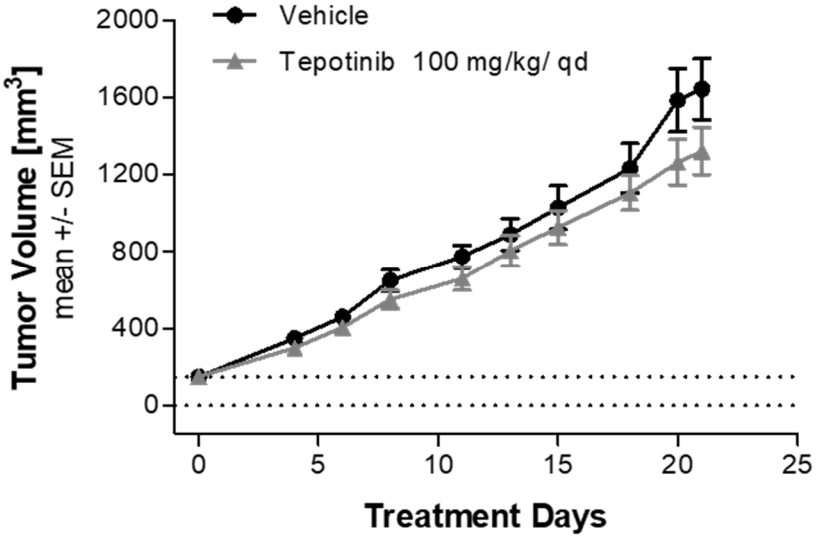

Source: Study Report DOV-315-1-9-MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous KP-4 xenografts in female Balb/c nude mice (n=10/group). Established tumors (volume about 250 to 260 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 25, 50, or 200 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 15 days. qd: Every day; SEM: Standard error of the mean.

### 2.2.3.4 *EGFR* 変異を有し、MET を過剰発現する NSCLC 細胞の異種移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用（DOV 347-1-12-MFH、ONC373-1-38MFH 及び ONC373-1-39MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.17～19

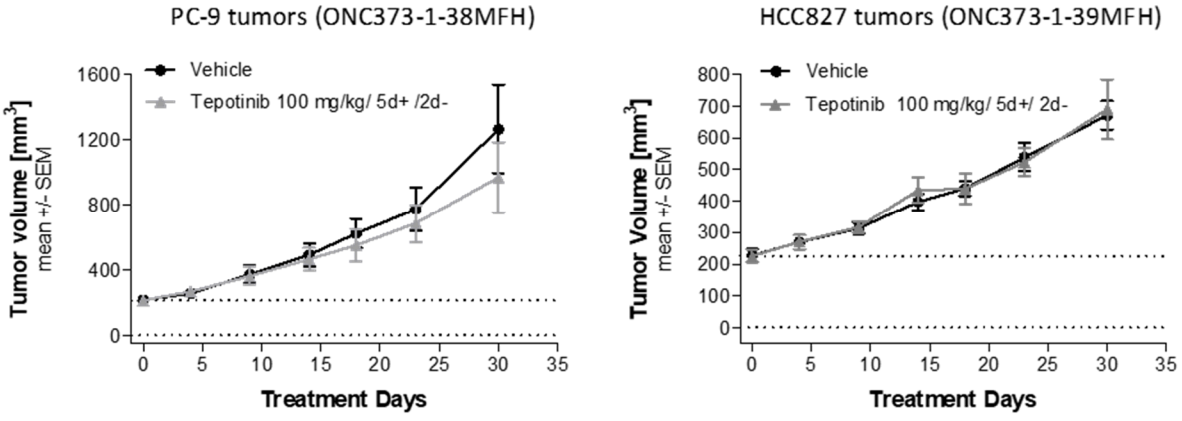
NSCLC 細胞株 H1975、PC-9 及び HCC827 を用いた in vivo モデルでもテポチニブの単剤での効力を評価した。3 種類全ての細胞株で MET 蛋白質の高発現及び MET の恒常的リン酸化がみられる（Kubo 2009、Matsubara 2010、Nakamura 2008）。同時に、それらの細胞株は、NSCLC の発癌性ドライバー変異とされている EGFR キナーゼドメインの活性化変異（H1975：EGFR L858R 及び T790M、PC-9 及び HCC827：EGFR E746～A750 欠失）を有している（Kubo 2009）。これらの腫瘍は MET の発現レベルが高いにも関わらず、テポチニブ（用法用量 100 mg/kg qd 又は 5d+/2d-）の単剤投与で腫瘍増殖が抑制されず、溶媒対照群と比較した腫瘍増殖の遅延は認められなかった（図 18 及び図 19）。

図 18 *EGFR* 変異を有し、MET を過剰発現する H1975（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report DOV-347-1-12-MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous H1975 xenografts in female CD-1 nude mice (n=9 (tepotinib) or 10 (vehicle control)/group). Established tumors (volume 110 to 190 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 100 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 21 days. qd: Every day; SEM: Standard error of the mean.

図 19 EGFR 変異を有し、MET を過剰発現する PC-9 及び HCC827（NSCLC）腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Reports ONC373-1-38MFH / Figure 1 and ONC373-1-39MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous PC-9 and HCC827 xenografts in female transgenic human HGF mice (n=10). Established tumors (PC-9 model: volume 110 to 350 $mm^3$; HCC827 model: volume 150 to 350 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 100 mg/kg/5d+/2d- po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 30 (PC-9) or 31 (HCC827) days. HGF: Hepatocyte growth factor; SEM: Standard error of the mean.

要約すると、テポチニブは MET の高度の過剰発現を有する腫瘍又は発癌性変異以外の原因で HGF 又は MET の発現レベルが上昇している腫瘍に対しても単剤で顕著な効果を示した。しかし、MET 融合蛋白質、*MET*ex14 スキッピング変異、及び特に高度 *MET* 遺伝子増幅といった MET の発癌性変異を有する腫瘍と比較すると、概して最大効果が弱く、完全な腫瘍退縮は認められなかった。発癌性 *EGFR* キナーゼドメイン変異を有する 3 種類の腫瘍モデルでは、MET の発現レベルが高く、MET が恒常的に活性化しているにもかかわらず、テポチニブによる増殖抑制が認められなかった。MET 及び HGF の発現レベルは MET 依存性を確実に予測するものではないことが、これらのデータから示されたため、テポチニブ単剤療法の対象患者を選別するための最良の予測バイオマーカーではないと考えられた。

### 2.2.4　患者由来転移性脳腫瘍の異種移植モデルを用いた試験

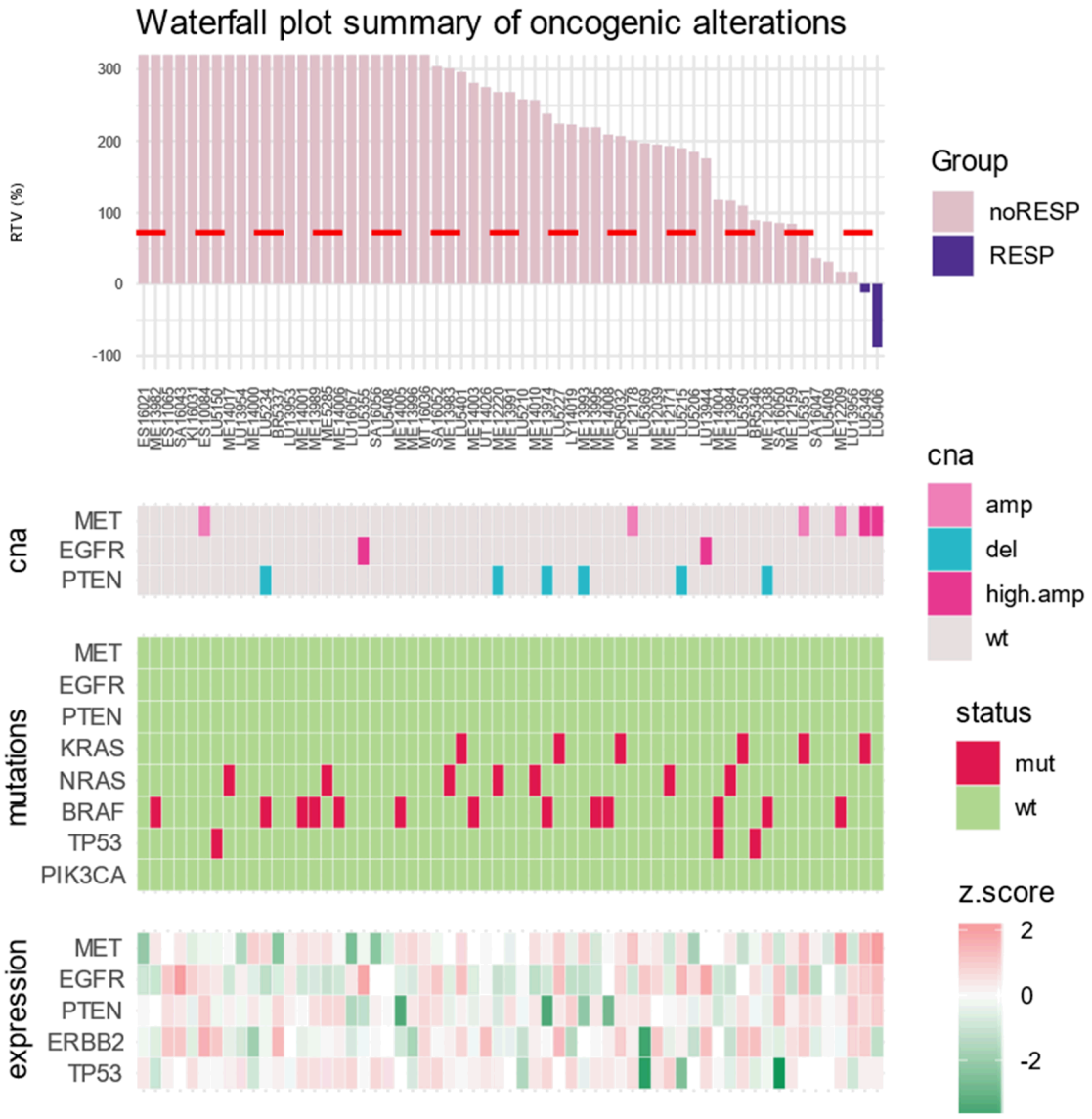
#### 2.2.4.1　患者由来転移性脳腫瘍の異種移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用と腫瘍の分子特性との関係（ONC20190605LC 及び ONC20190302CR）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.20 及び 21

ヒト転移性脳腫瘍から得られた 63 種類の移植腫瘍を用いてテポチニブの抗腫瘍効果を検討した（報告書番号 ONC20190605LC）。これらの患者由来異種移植腫瘍（patient-derived xenografts; PDX）に対して、分子的マーカー及びプロファイルによる選別はいずれも行わなかった。そのうち 61 種類の腫瘍では、癌特異的変異、GCN 変化及び遺伝子発現のレトロスペクティブ分析を nCounter® System（NanoString Technologies 社）により実施した（報告書番号 ONC20190302CR）。

皮下に生着したヒト転移性脳腫瘍 PDX（開始時の体積：150～250 $mm^3$）を有するマウス（1 群 1 匹）にテポチニブを 30 mg/kg qd の用量で経口投与した。分子的プロファイルが得られた 61 種類のうち 2 種類のモデル（LU5349 及び LU5406）で腫瘍が縮小し、これらはいずれも原発性肺腫瘍由来転移性脳腫瘍から得られたものであった。LU5349 ではテポチニブの効果が中等度であったが、LU5406 ではテポチニブの投与により高度の腫瘍退縮が認められた（図 20）。両腫瘍ともに高度 *MET* 遺伝子増幅を有しており（MET GCN は LU5349 が 11、LU5406 が 24）、検討したその他の腫瘍ではこの増幅が認められなかった（図 20）。

図 20　患者由来転移性脳腫瘍の異種移植腫瘍の増殖に対するテポチニブの抑制作用と腫瘍の分子特性との関係



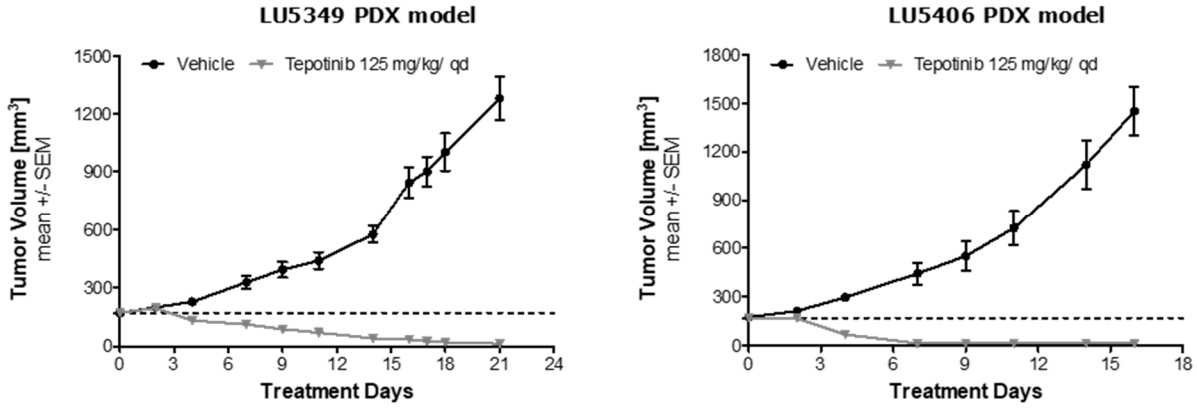

Source: Study Reports ONC20190605LC and ONC20190302CR / Figure 1. Relative differences in tumor size of brain metastases-derived PDX under tepotinib treatment (waterfall plot) and associated molecular profiles. The red dotted line indicates a tumor volume increase of +73% which served as a reference to visualize the border between “stable disease” and “progressive disease” according to a simplified, preclinical adaptation of clinical RECIST response criteria. RESP (response) is defined in this plot as tumor shrinkage. Single tumor pieces were subcutaneously implanted into the flank of NOD-SCID mice (n=1/group). When tumors reached a volume of about 150 to 250 $mm^3$, animals were treated with tepotinib at 30 mg/kg/qd po. Tumors from untreated satellite animals were used to analyze expression of cancer genes, cancer specific mutations and gene copy number status (“amp”: > 4 gene copies; “high amp”: > 10 gene copies, “del”: <1.2 gene copies) by Nanostring. Selected cancer genes are shown. Amp: amplified, cna: Copy number alterations, del: deletion, mut: mutated, NOD: Non-Obese Diabetic, PDX: Patient-derived xenograft, RESP: Response, RTV: relative tumor volume = (% (tumor volume at the end of treatment – tumor volume at treatment start)/tumor volume at the end of treatment), SCID: Severe combined immunodeficiency, wt: wild-type.

### 2.2.4.2　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する原発性肺腫瘍由来転移性脳腫瘍の PDX モデルでの腫瘍増殖に対するテポチニブの抑制作用（Crown Bioscience_E0177-U1708）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.22

前項でテポチニブに反応した 2 種の腫瘍がテポチニブ投与に感受性を示すことを裏付けるため、1 群あたりの動物数を増やし（1 群 5 匹）、より高用量（125 mg/kg qd、経口投与）のテポチニブを用いて再試験を行った（図 21）。この条件下でテポチニブを投与したとき、高度の腫瘍収縮が起こり、いずれのモデルでも 5 例中 5 例で完全な退縮が認められた。

図 21　高度 *MET* 遺伝子増幅を有する転移性脳腫瘍の PDX モデルでの腫瘍増殖に対するテポチニブの抑制作用




Source: Study Report Crown Bioscience_E0177-U1708 / Figures 2 and 3. Tumor growth curves of high level MET amplified brain metastases-derived PDX (LU5349 and LU5406). Single tumor pieces were subcutaneously implanted into the flank of NOD-SCID mice (n=5/group). Mice with established tumors (volume about 150 to 250 $mm^3$) were treated with tepotinib at 125 mg/kg/qd, po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) until the mean tumor volume of the control group reached 1200 mm3 (after 21 days for LU5349 and 16 days for LU5406). NOD: Non-Obese Diabetic, qd: Every day, PDX: Patient-derived xenograft, SCID: Severe combined immunodeficiency, SEM: Standard error of the mean.

前項に示した未選別の患者由来腫瘍で得られた in vivo データを総合すると、腫瘍細胞株異種移植腫瘍で得られた結果が裏付けられた。すなわち、高度遺伝子増幅などの発癌性 MET 活性化により、テポチニブ単剤療法に対する腫瘍の感受性が予測可能である。

## 2.3　PK/PD 試験

患者を対象とした第 II 相試験の推奨用量（recommended phase 2 dose; RP2D）の設定をサポートするため、また、in vivo 非臨床モデル及び最終的には投与した癌患者での本薬の作用機序を確認するため、PK/PD 試験を実施した。

テポチニブの作用機序及び PK/PD 関係は、最初、*MET*ex14 スキッピング変異陽性及び *MET* 遺伝子増幅を有し、MET が恒常的にリン酸化している Hs746T 胃癌モデルを用いて、単回投与試験により検

討した。Hs746T モデルは MET 阻害に高い感受性を示し（2.2.1.2 項）、低用量（10 mg/kg）のテポチニブ単回経口投与でも十分（90%超）な効果及び持続的な MET 阻害が得られた（図 22）。

テポチニブの PK/PD 関係をより慎重に推定する目的で、膵癌モデル KP-4 を使用した。HGF/MET 自己分泌循環を有する KP-4 腫瘍はテポチニブ投与に感受性を示すが、部分的な腫瘍退縮を得るには Hs746T 腫瘍よりもはるかに高い用量が必要である（図 24）。

臨床試験での用法用量の設定をサポートするため、KP-4 を用いた単回投与 PK/PD 試験及び反復投与有効性試験で得られたデータを用いて PK/PD モデリングを行った（報告書番号 RF6770）。

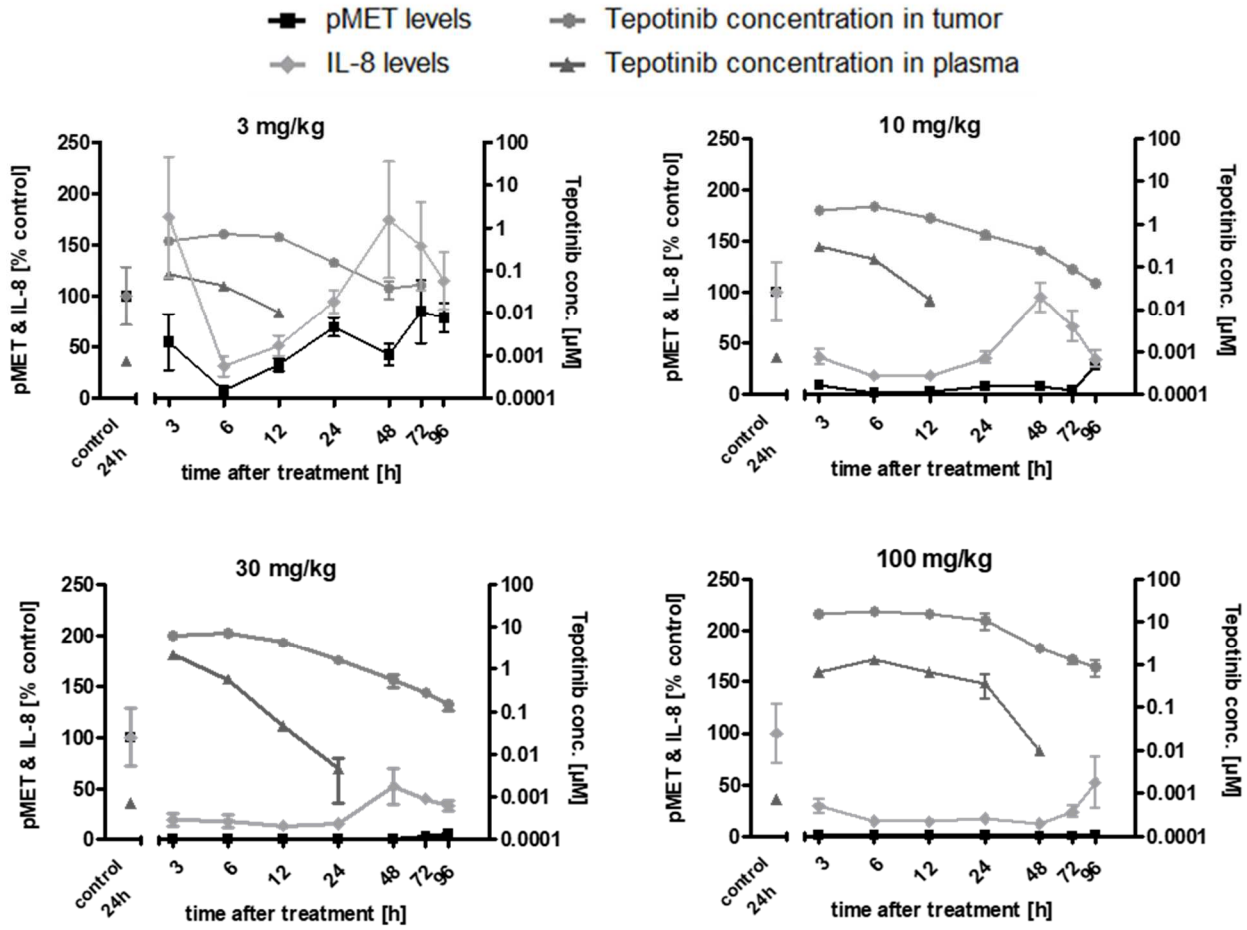
さらに、in vivo 薬理試験での PD マーカー分析から、テポチニブの作用機序は MET シグナル伝達の強力かつ持続的な阻害、MET 制御下の下流因子（血管新生促進因子 IL-8 など）の低減及び腫瘍細胞増殖の抑制であることが確認された。このデータから、in vitro 及び in vivo で得られたテポチニブの抗腫瘍効果のメカニズムが更に明らかになった。

### 2.3.1 高度 *MET* 遺伝子増幅を有する Hs746T 胃癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験（PSR-ONC-EMD1214063-003 及び PSR-ONC-EMD1214063-005）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.23 及び 24

皮下に生着した Hs746T 腫瘍を有するマウスにテポチニブを 3、10、30 又は 100 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与後 3、6、12、24、48 及び 96 時間に動物を屠殺し、腫瘍及び血漿試料を採取した（報告書番号 PSR-ONC-EMD1214063-003）。摘出した腫瘍は速やかに同じサイズの 3 つの腫瘍片に切断した。2 つは PK 及びバイオマーカーの分析用に瞬間凍結し、もう 1 つは免疫組織化学（immunohistochemistry; IHC）分析用にホルマリン固定した。凍結した腫瘍片の 1 つ及び血漿でテポチニブの濃度を測定した。凍結したもう 1 つの腫瘍片は機械的にホモジナイズして溶解した後、リン酸化部位特異的抗体を用いたウェスタンブロッティングにより MET リン酸化を分析した。また、血漿試料を用いて、移植したヒト腫瘍から放出されたヒト IL-8 を分析した（報告書番号 PSR-ONC-EMD1214063-003）。さらに、パラフィン切片を用いて、ヒストン H3 のリン酸化並びにサイクリン D1、p27 及び切断活性化カスパーゼ-3 の蛋白質レベルの IHC 分析を行った（報告書番号 PSR-ONC-EMD1214063-005）。

図 22　Hs746T 胃癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験: 腫瘍組織中のリン酸化 MET 濃度、腫瘍及び血漿組織中のテポチニブ濃度、並びに血漿中 IL8 濃度




Source: Study Report PSR-ONC-EMD1214063-003 / Figure 1. Hs746T cells were subcutaneously implanted on the back of female CD-1 mice. When tumors reached a volume of 600 to 1000 $mm^3$, animals were randomized into different treatment groups (n=4 per group/time point/dose) and treated with a single dose of tepotinib at 3, 10, 30 and 100 mg/kg, po. Tumor and plasma samples were collected 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h after start of treatment. A control group (n=4) was left untreated. Phospho-MET (Y1234/1235) was analyzed in frozen tumor material by Western blotting. IL-8 levels were measured in plasma by a sandwich ELISA. The graphs show mean values ± standard deviations. Quantitative determination of tepotinib in mouse plasma and tumor samples was determined by HPLC-MS/MS. ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay, HPLC-MS/MS: High performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection.

血漿及び腫瘍試料中のテポチニブ濃度を測定したところ、テポチニブの分布容積が大きいことにより血漿中濃度よりも腫瘍内濃度の方が高くなることを示す PK データ（CTD2.6.4、4.2 項参照）が確認された。テポチニブを 10 mg/kg 以上の用量で投与したときの腫瘍内テポチニブ濃度は、検討したいずれの時点でも（投与後 3～96 時間）、in vitro で薬理活性を示す濃度（1 桁のナノモル範囲の $IC_{50}$ 値）以上であった（図 22）。検討した全ての腫瘍でテポチニブにより MET リン酸化が強く阻害された。最低用量（3 mg/kg）のテポチニブでは MET リン酸化が一過性に阻害され、阻害率は投与後 6 時

間に最大（90%）になった後、投与後 24 時間には低下した（30%）。一方、検討したその他 3 つの用量では 72 時間以上にわたり MET リン酸化が 90%超阻害された（図 22）。これらの結果は、有効性試験で 3 mg/kg の用量では腫瘍増殖が有意に抑制され、6 mg/kg 以上の用量で投与したときには高度の腫瘍退縮が認められた（図 6 及び 2.2.1.2 項）ことと一致していた。

IL-8 産生抑制も同様のパターンを示したが、腫瘍由来 IL-8 の血漿中濃度は MET リン酸化よりも早くベースライン値に戻った（図 22）。

この結果から、テポチニブによる腫瘍増殖抑制、MET リン酸化阻害及び腫瘍由来 IL-8 の血漿中濃度減少の間には強い相関関係があることが示された。マウスは IL-8 を発現していないが、ヒトでは IL-8 が腫瘍だけでなく、他の細胞からも MET 阻害に感受性を示さないと考えられる経路で産生されることから、異種移植腫瘍で得られた IL-8 のデータを容易にヒトに応用することはできないと考えられる。腫瘍組織内 MET リン酸化は、テポチニブの標的分子への作用をモニタリングし、第 I 相試験 EMR 200095-001 の用量設定をサポートするための近位 PD バイオマーカーとして使用した。

ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍片の IHC 分析では、テポチニブを 30 及び 100 mg/kg の用量で単回投与したとき、リン酸化ヒストン H3 濃度の低下がみられ、100 mg/kg では低下が持続したが、30 mg/kg ではヒストン H3 リン酸化阻害が一過性であり、投与後 96 時間にベースライン値に戻った。3、10 及び 30 mg/kg の用量でサイクリン D1 発現が一過性に低下し、それぞれ投与後 24、48 及び 96 時間にベースライン値に戻った。最高用量の 100 mg/kg では、サイクリン D1 発現の 50%超の低下が投与後 96 時間以降も持続した。また、3、10、30 及び 100 mg/kg の用量で p27 濃度の一過性の上昇がみられた。p27 は投与後 24～48 時間に上昇が最大となり、投与後 72～96 時間にベースライン値に戻ったが、例外として 100 mg/kg 群の試料では p27 が投与後 96 時間でも上昇したままであった。一部の試料では切断されたカスパーゼ-3 の一過性の増加も認められたことから、テポチニブの単回投与でアポトーシスが誘導されることが明らかになった（本項にはデータを示していない。報告書番号 PSR-ONC-EMD1214063-005）。

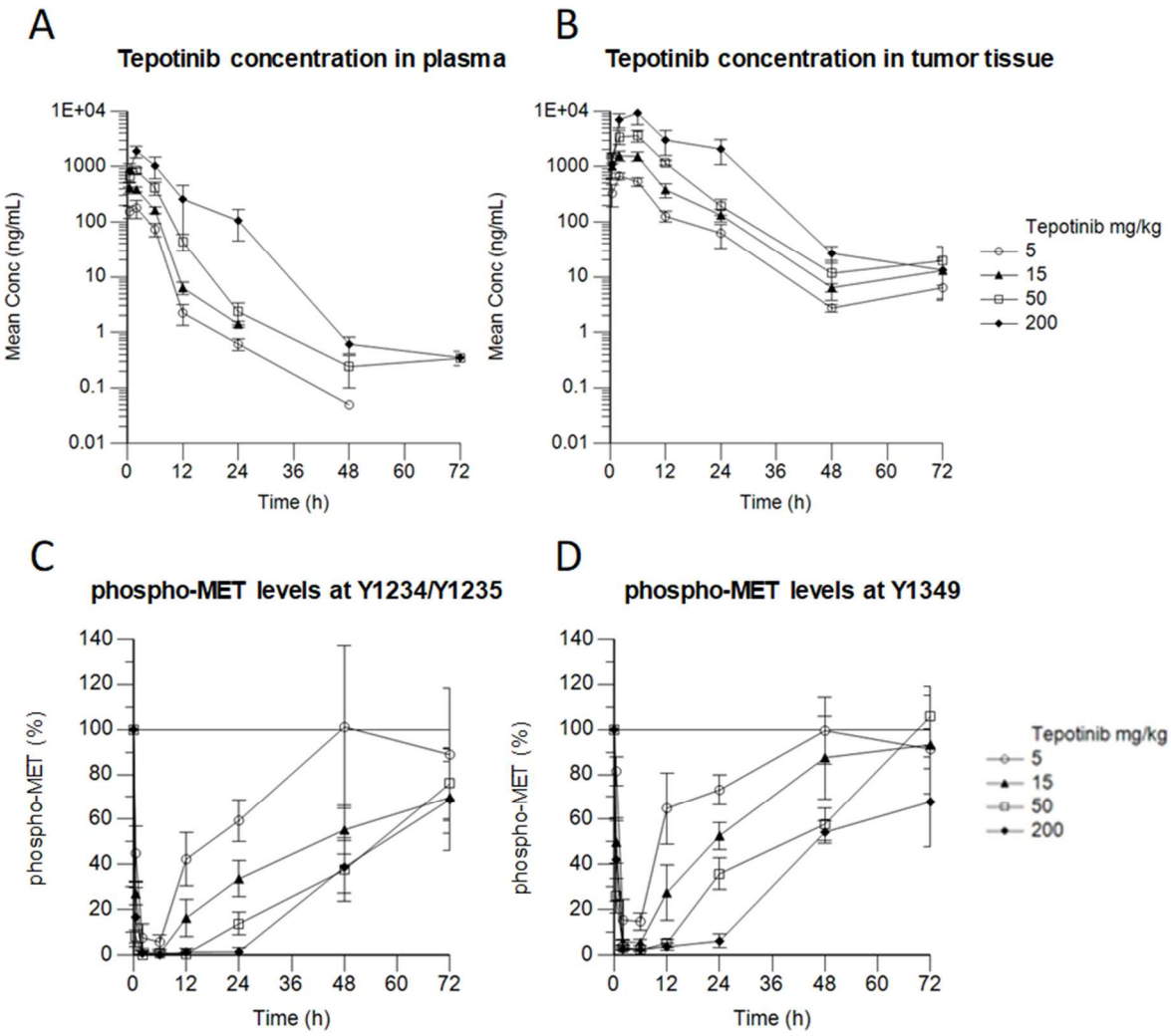
### 2.3.2 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験（RF6770 及び ONC367-1-65MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.25

皮下に生着した KP-4 腫瘍を有するマウスにテポチニブを 5、15、50 及び 200 mg/kg の用量で単回経口投与して、PK/PD 試験を実施した。投与後 0.5、2、6、12、24、48 及び 72 時間に血漿及び腫瘍試料を採取した。

テポチニブの全ての用量で MET リン酸化（Y1234/Y1235 及び Y1349 位）が投与後 6 時間まで効果的に（90%超）阻害された。95%を超える MET リン酸化阻害が 24 時間以上持続したのは、最高用量の 200 mg/kg のみであった（図 23）。

図 23 KP-4 膵癌腫瘍での単回投与 PK/PD 試験: 腫瘍組織中のリン酸化 MET 濃度、腫瘍及び血漿組織中のテポチニブ濃度、並びに血漿中 IL8 濃度



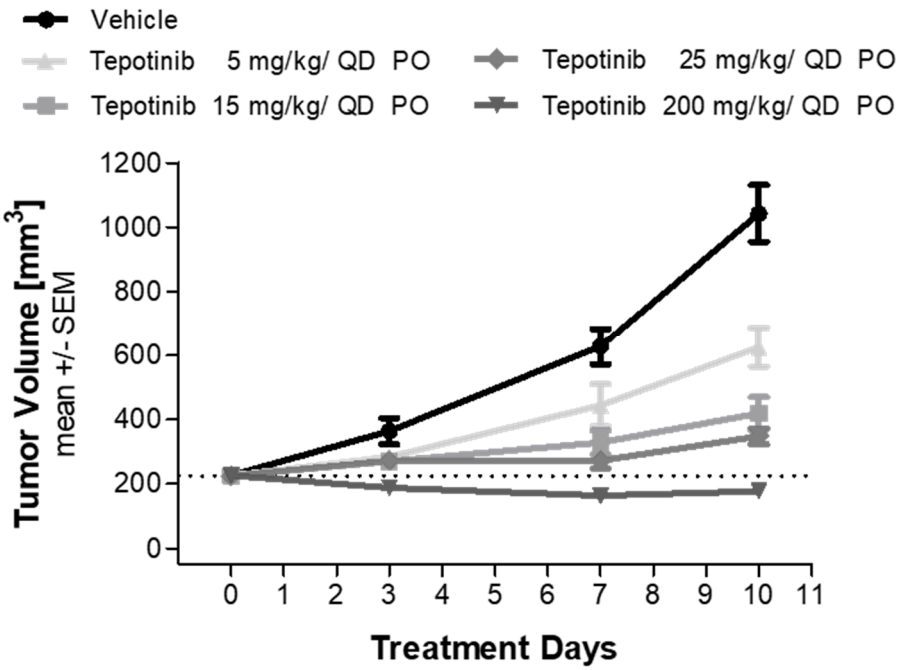

Source: Study Reports RF6770 / Figures 2 and 4, and ONC367-1-65MFH. Established subcutaneous KP-4 xenografts (volume between 300 to 500 $mm^3$) in female Balb/c nude mice (n=5 per group/time point/dose) were treated with a single dose of tepotinib at 5, 15, 50, or 200 mg/kg po or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5). Plasma and tumor samples were collected 0.5, 2, 6, 12, 24, 48, and 72 h after start of treatment. A and B: Mean (n=5) tepotinib concentrations ± SD in plasma and tumor tissue over time. Tepotinib concentrations were determined by UPLC-MS/MS assay. C and D: Mean (n=5) % phospho-MET levels (C: Y134/1235; D: Y1349) ± SD over time in tumor tissue. MET phosphorylation at Y1234/Y1235 and Y1349 was measured in tumor tissue by semiquantitative Luminex assay. MET: Mesenchymal-epithelial transition factor, MS: mass spectrometry, SD: Standard deviation, UPLC-MS/MS: Ultra Performance Liquid Chromatography with tandem mass spectrometric detection.

### 2.3.3 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対するテポチニブの用量依存的な阻害作用（ONC207-1-35MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.26

KP-4 異種移植腫瘍を有するマウスでテポチニブによる用量依存的な MET リン酸化阻害に伴いテポチニブの抗腫瘍効果が認められた。生着した腫瘍（開始時の体積：145～310 $mm^3$）を有するマウスにテポチニブを同じ用量の 5、15、25 及び 200 mg/kg qd で投与すると腫瘍増殖が用量依存的に抑制され、投与 10 日の T/C 値は、各用量それぞれ 49%、24%、15%及び-22%であった（図 24）。

図 24 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対するテポチニブの用量依存的な阻害作用




Source: Study Report ONC207-1-35MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subutaneous KP-4 xenografts in female Balb/c nude mice (n=8/group). Established tumors (volume between 145 to 310 $mm^3$) were treated with tepotinib (at 5, 15, 25, or 200 mg/kg/qd po) or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 10 days. qd: every day, SEM: Standard error of the mean.

### 2.3.4 PK/PD モデリング（RF6770）

概要表 2.6.5、17-B、添付資料番号：4.2.2.7.1

KP-4 を用いた単回投与 PK/PD 試験 ONC367-1-65MFH（2.3.2 項）、反復投与有効性試験 ONC207-1-35MFH（2.3.3 項）及び有効性試験 DOV-315-1-9-MFH（2.2.3.3 項、図 17）で得られた結果に基づいて PK/PD モデリングを行ったところ、KP-4 モデルで腫瘍退縮に相当する 90%及び 95%の最大腫瘍増殖

抑制が得られる血漿中テポチニブ濃度はそれぞれ 215 及び 454 ng/mL と予測された。マウスとヒトの間の血漿蛋白結合率の差を考慮すると、これらはそれぞれヒト血漿中テポチニブ濃度 390 及び 823 ng/mL に相当する。

さらに、この非臨床 PK/PD モデルから、腫瘍退縮を得るには 95%を超える持続的な標的阻害が必要であることが示された（報告書番号 RF6770）。その後、ヒト初回投与試験で得られた PK 及び PD データをこのモデルに統合し、ヒト母集団 PK/PD モデルに基づいて母集団のシミュレーションを実施したところ、500 mg の用量では 90%以上の患者で 95%以上の標的阻害が得られることが示された。この結果から、RP2D を 500 mg に設定した。

## 2.4 ヒト主要代謝物 MSC2571109A の効力を裏付ける試験

ヒト循環血中主要代謝物 MSC2571109A［キラル代謝物 M506（MSC2569775）の R-鏡像異性体］は、最初にヒトマスバランス試験で特定された。テポチニブの有効性への MSC2571109A の寄与を評価する in vitro 及び in vivo 薬理試験を実施した。これらの試験結果から、MSC2571109 は HGF 誘導 MET リン酸化を効果的に阻害し、その効力はテポチニブよりもやや弱い程度であることが明らかになった。しかし、in vivo では、MSC2571109A はテポチニブとは異なり、200 mg/kg の用量のテポチニブと同程度の MSC2571109A 曝露量（より高い $C_{max}$ 値さえも得られる）が得られる用量（50 mg/kg まで）で MSC2571109A を投与しても抗腫瘍効果を示さなかった。特記すべきこととして、マウスに MSC2571109A を 50 mg/kg の用量で投与したときの MSC2571109A 曝露量は、ヒト初回投与試験（試験番号 EMR200095-001）で患者にテポチニブを 1 日用量 1400 mg で投与したときの MSC2571109A 曝露量と同程度と推定された。テポチニブとは異なり、MSC2571109A は腫瘍組織内濃度の方が血漿中濃度よりも低く、速やかに消失すると考えられた。したがって、MSC2571109A はテポチニブの抗腫瘍効果にほとんど寄与しないと考えられた。

### 2.4.1 A549（NSCLC）細胞での HGF 依存性 MET リン酸化に対する MSC2571109A の阻害作用（ONCIRA00346CK）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.27

MSC2571109A の HGF 誘導 MET リン酸化阻害能を、A549 NSCLC 細胞アッセイでテポチニブの試験（2.1.4 項）と同様の方法を用いて検討した。MSC2571109A は HGF 誘導 MET リン酸化を阻害し、MSC2571109A の 2 種類のバッチを独立して測定したときの $IC_{50}$ 値は 13 及び 26 nM であった。対応する試験でのテポチニブの $IC_{50}$ 値は 5.4 nM であった（表 2）。

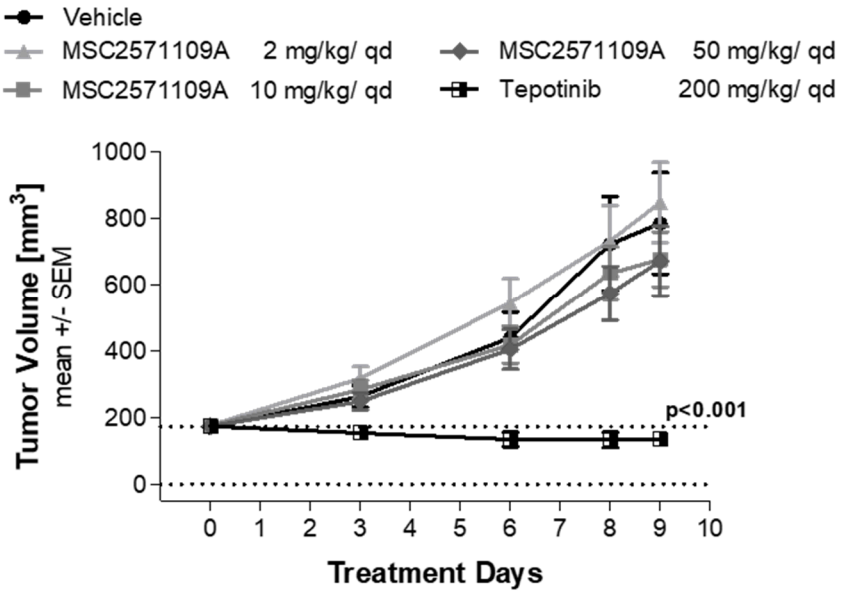
### 2.4.2 HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対する MSC2571109A の in vivo 作用（ONC402-3-12MFH）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.28

MSC2571109A は in vitro アッセイではテポチニブとほぼ同程度の効力を示したにもかかわらず、in vivo では抗腫瘍効果を示さなかった。テポチニブは 200 mg/kg/qd の用量で KP-4 腫瘍増殖を有意に抑制し（$p < 0.001$、反復測定分散分析）、T/C 値が-23%であったのに対し、MSC2571109A は十分な血漿中曝露量が得られているにもかかわらず、検討したいずれの用量でも腫瘍増殖に対する作用を示さな

かった（2、10 及び 50 mg/kg の用量での T/C 値はそれぞれ 109%、81%及び 81%）（図 25、表 3、報告書番号 ONC402-3-12MFH 及び ONC401-1-12MFH）。

図 25　HGF/MET を共発現する KP-4 膵癌腫瘍の増殖に対する MSC2571109A の in vivo 作用




Source: Study Report ONC402-3-12MFH / Figure 1. Tumor growth curves of subcutaneous KP-4 xenografts in female Balb/c nude mice (n=10/group). Established tumors (volume between 100 to 270 $mm^3$) were treated with MSC2571109A (2, 10, or 50 mg/kg/qd po), tepotinib (200 mg/kg/qd po), or vehicle control (20% Solutol / 80% 100 mM sodium-acetate buffer, pH 5.5) for 10 days. Statistical analysis: 2-way ANOVA repeated measures analysis of variance. qd: every day, SEM: Standard error of the mean.

### 2.4.3　KP-4 腫瘍を用いた MSC2571109A の PK/PD 試験（ONC401-1-11MFH、ONC401-1-12MFH、ONCKWI00221CK 及び ONCKWI00219CK）

概要表 2.6.3、2、添付資料番号：4.2.1.1.29～32

MSC2571109A の効力に関して、単回投与試験（報告書番号 ONC401-1-11MFH）及び反復投与試験（報告書番号 ONC401-1-12MFH）で更に評価した。これらの試験では、生着した KP-4 腫瘍を有するマウスに様々な用量の MSC2571109A 又は 200 mg/kg の用量のテポチニブを投与し、様々な時点で MSC2571109A 及びテポチニブの血漿中及び腫瘍組織中濃度を測定した。また、これらの時点で MET リン酸化を測定した［報告書番号 ONCKWI00221CK（単回投与試験でのリン酸化 MET 分析）及び ONCKWI00219CK（反復投与試験でのリン酸化 MET 分析）］。

これらの試験結果から以下のことが明らかになった。

- MSC2571109A の腫瘍組織内濃度は血漿中濃度よりも低かったが、テポチニブは腫瘍組織内に豊富にみられた（表 3）。

- MSC2571109A 又はテポチニブの投与により血漿中及び腫瘍組織内 MSC2571109A 濃度が一過性に上昇し、投与 2～8 時間後に最高値となった。MSC2571109A 濃度は投与 24 時間後に大幅に低下したことから、MSC2571109A は速やかに消失することが示された（表 3）。
- マウスにテポチニブを 200 mg/kg の用量で投与したときの MSC2571109A 曝露量は、マウスに MSC2571109A を最高用量（単回投与試験では 25 mg/kg、反復投与試験では 50 mg/kg）で投与したときと同程度であった（表 3）。
- MSC2571109A は MET リン酸化を一過性にしか阻害しなかったが、テポチニブは単回又は反復投与後 24 時間以上にわたり MET リン酸化を効果的に（95%超）阻害した（図 26）。

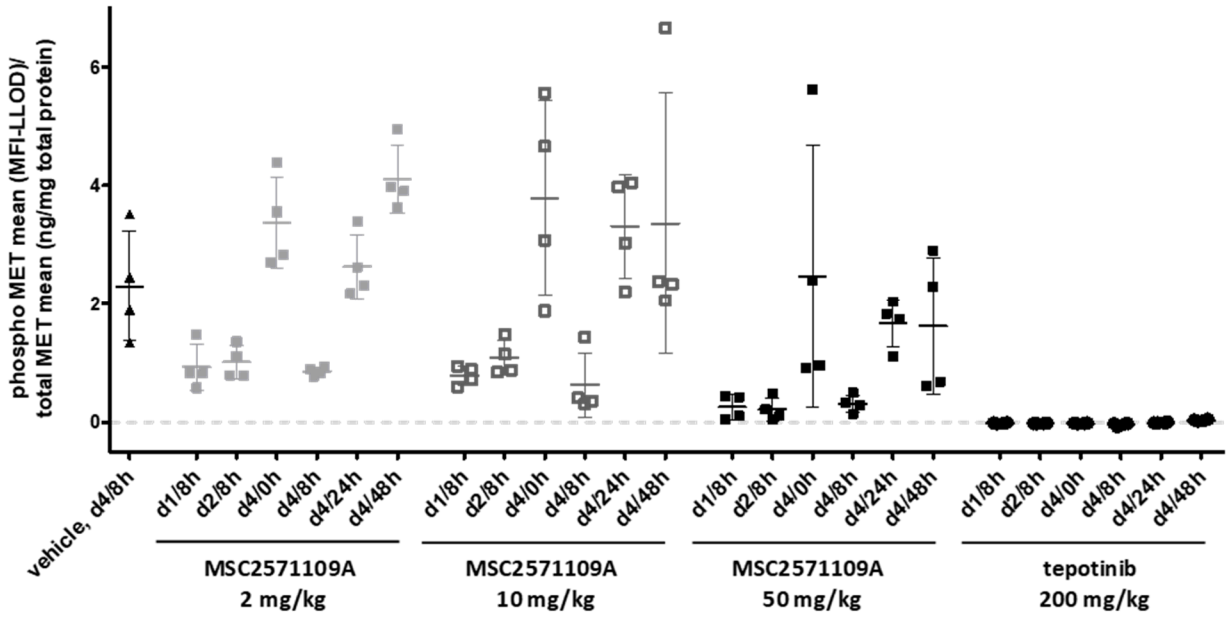
反復投与試験で KP-4 腫瘍を有するマウスに MSC2571109A 又はテポチニブを投与したときの平均血漿中及び腫瘍内 MSC2571109A 及びテポチニブ濃度を表 3 に示す。反復投与試験で MSC2571109A 又はテポチニブを投与したときの腫瘍組織内 MET リン酸化レベルを図 26 に示す（報告書番号 ONC401-1-12MFH）。

表 3　KP-4 腫瘍を用いた MSC2571109A 及びテポチニブの反復投与 PK/PD 試験: 血漿及び腫瘍組織中の MSC2571109A 及びテポチニブ濃度

| | MSC2571109A (50 mg/kg) | | | | | Tepotinib (200 mg/kg) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| MSC2571109A concentration | d1/8h | d2/8h | d4/0h | d4/8h | d4/24h | d1/8h | d2/8h | d4/0h | d4/8h | d4/24h |
| Plasma (ng/mL) | 192 | 266 | 3 | 209 | 7 | 164 | 156 | 19 | 175 | 14 |
| Tumor (ng/mL) | 90 | 113 | BLOQ | 104 | BLOQ | 70 | 66 | 7 | 81 | 15 |
| Tepotinib concentration | d1/8h | d2/8h | d4/0h | d4/8h | d4/24h | d1/8h | d2/8h | d4/0h | d4/8h | d4/24h |
| Plasma (ng/mL) | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | 1010 | 784 | 77 | 996 | 61 |
| Tumor (ng/mL) | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | 10450 | 9503 | 2123 | 15525 | 1228 |

Source: Study Report ONC401-1-12MFH. Established KP-4 xenograft tumors in BALB/c nude mice (tumor volume 300-900 $mm^3$) were treated with MSC2571109A at 2, 10 and 50 mg/kg/qd po or tepotinib at 200 mg/kg/qd po for 1, 2, or 4 days (n=4 animals/dose/time point of sampling; maximal 5 doses with first dose on day 0). The vehicle control (0.5% Methocel/0.25%Tween 20 in water) group was treated qd for 4 Days (n=4). Tumor and plasma samples were collected at Day 1 - 8 hours after the second dose (d1/8h), Day 2 - 8 hours after the third dose (d2/8h), Day 4 before administration of fifth dose (d4/0h), Day 4 - 8 hours after fifth dose (d4/8h), 24 hours after fifth dose at Day 4 (d4/24h), and 48 hours after fifth dose at day 4 (d4/48h; data for this time point is not shown in the table) in the treatment groups, and at Day 4 - 8h after fifth administration (d4/8h) in the vehicle control group. BLOQ: Below limit of quantification, N/A: Not applicable.

図 26 KP-4 腫瘍を用いた MSC2571109A 及びテポチニブの反復投与 PK/PD 試験: 腫瘍組織中のリン酸化 MET 濃度




Source: Study Reports ONC401-1-12MFH and ONCKWI00219CK. Phospho-MET (Y1234/1235) levels (detected by Luminex technology) normalized to total MET measured in tumor samples from study ONC401-1-12MFH. N= 4 tumor samples/group and timepoint (individual values (phospho-MET (MFI-LLOD)/total MET (ng/mg total protein) represent mean of duplicate measurements/sample). Error bars represent mean +/- standard deviation. LLOD: Lower limit of detection, MFI: Mean fluorescence intensity.

MSC2571109A を投与したとき持続的な MET 阻害及び腫瘍増殖抑制がみられなかったのは、MSC2571109A の腫瘍への分布が少なく、消失が明らかに速いことが原因と考えられる。

## 3. 副次的薬理試験

### 3.1 マウス皮膚の創傷治癒への影響（Merck [redacted]/237b）

概要表 2.6.3、3、添付資料番号：4.2.1.2.1

マウス表皮の *MET* 遺伝子を欠損させることにより、MET シグナル伝達系が皮膚の創傷治癒に不可欠であることが示されている（Chmielowiec 2007）。このため、マウスを用いて 5 mm の皮膚全層切開創の治癒に対するテポチニブの作用を検討した。テポチニブを 25 又は 50 mg/kg/日の用量で 3 又は 10 日間連日経口投与したとき（1 群 10 匹）、溶媒と比較して、創傷治癒（創幅、視覚的重症度スコア、創面積、再上皮化率及び肉芽組織成熟度）に対する作用は認められなかった。

# 4. 安全性薬理試験

テポチニブ又はその遊離塩基を用いた in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験で、オフターゲット作用並びに心血管系、呼吸系及び CNS 機能への影響の有無を評価した。また、ヒト循環血中主要代謝物 MSC2571109A の in vitro 安全性薬理試験を実施し、オフターゲット作用又は心血管系への影響（QT 延長）のリスクの有無を評価した。

## 4.1 In vitro 安全性薬理試験

広範な細胞受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対するテポチニブの影響の有無を in vitro で検討した。また、ヒト hERG チャネル機能、hERG チャネル蛋白質輸送及び心臓活動電位の発生に関与する多くの重要なイオンチャネルの機能に対するテポチニブの影響の有無を検討した。さらに、モルモット心臓から単離した乳頭筋の収縮力、不応期及び活動電位持続時間に対するテポチニブの影響の有無も検討した。

### 4.1.1 受容体結合、酵素阻害及び機能阻害プロファイリング（参考資料 8920141、参考資料 8920142、参考資料 8920150、参考資料 8920154 及び参考資料 8920158）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.1～5（いずれも参考資料）

オフターゲット相互作用の有無を検討するため、放射性リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイを含む in vitro 選択的オフターゲットプロファイリングアッセイで、143 種類の細胞受容体、酵素、トランスポーター及びイオンチャネルに対してテポチニブ（遊離塩基）を単一濃度 10 µM で評価した（参考資料 8920141、8920150 及び 8920154）。結合アッセイで 50%を超える作用がみられたオフターゲットは、その標的に特異的な機能アッセイ（利用可能な場合）で更に検討した（参考資料 8920142 及び 8920158）。結合及び酵素プロファイリングアッセイでテポチニブ（遊離塩基）により 50%を超える阻害がみられたオフターゲットは 33 種類（結合アッセイで 27 種類、酵素アッセイで 6 種類）であったが、オフターゲットへの結合の $IC_{50}$ 値 / MET キナーゼへの結合の $IC_{50}$ 値（1.7 nM、報告書番号 PSR-NCETech-EMD1214063-001）比が 50 未満であったのは 2 種類の受容体のみであった。一方はメラトニン ML2（MT3）受容体であり、$IC_{50}$ 値は 2.4 nM であった。ML2（MT3）受容体は、最近キノン還元酵素 2 と同一であることが確認されたメラトニン受容部位である（Nosjean 2000）。ML2 受容体は特徴があまり明らかになっておらず、その変化による下流への影響は不明である。この受容体/酵素は結合アッセイで比較的雑多に反応し、構造的に異なる多くの化合物がこれに結合することから、テポチニブの結合の機能的意義は低いと考えられる。

もう一方の受容体は、血圧の調節に関与していることが知られている（Bousquet 2000）イミダゾリン I1 受容体であり、$IC_{50}$ 値は 35 nM であった。

結合がみられた 27 種類のオフターゲットのうち 9 種類で機能アッセイ又は取込みアッセイを実施したところ（参考資料 8920142 及び 8920158）、テポチニブ（遊離塩基）は α2c アドレナリン受容体、ムスカリン受容体（M1～M3）、ノルエピネフリン（norepinephrine; NE）トランスポーター及びドパミン（dopamine; DA）トランスポーターにアンタゴニスト作用を示した。それぞれの $IC_{50}$ 値は、α2c アドレナリン受容体が 19 µM、NE トランスポーターが 2 µM、DA トランスポーターが 0.55 µM、ムス

カリン M1 受容体が 1.3 μM、ムスカリン M2 受容体が 22 μM、ムスカリン M3 受容体が 1.3 μM であった。

### 4.1.2 Kv11.1（hERG）機能への影響（080415.DCC 及び参考資料 071025.TSP）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.7、及び 4.2.1.3.6（参考資料）

ヒト胎児腎臓（human embryonic kidney; HEK）293 細胞に安定的に発現させた Kv11.1（hERG）チャネルを介したカリウム電流に対するテポチニブの影響を、オートパラレル又はホールセルパッチクランプ法による 2 つの試験で検討した。

最初の予備試験（参考資料 071025.TSP）では、テポチニブ（遊離塩基）を 0.3、1、3、10 及び 30 μM の濃度で検討した。電流阻害の $IC_{50}$ 値は 5.8 μM であった。次に実施した GLP 適用試験（報告書番号 3.9080415.DCC）では、テポチニブは検討した 0.2、1、3 及び 10 μM の各濃度で hERG チャネル電流をそれぞれ約 16%、42%、73%及び 93%阻害した。$IC_{25}$、$IC_{50}$ 及び $IC_{75}$ 値はそれぞれ 0.4、1.2 及び 3.4 μM であった。このアッセイは、hERG チャネルを効果的に阻害する選択的 hERG チャネル阻害剤テルフェナジンを対照薬としてバリデーションを行った。

### 4.1.3 Kv11.1（hERG）蛋白質輸送への影響（081124.TSP）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.8

Kv11.1（hERG）チャネル蛋白質の輸送に対するテポチニブの影響の有無を検討するため、*hERG* 遺伝子を導入した HEK293 細胞表面での Kv11.1（hERG）チャネル蛋白質の発現を、抗体を用いた化学発光アッセイでモニタリングした。

テポチニブは、検討した 1、3 及び 10 μM のいずれの濃度でも、関連する Kv11.1（hERG）チャネル蛋白質の輸送に影響を及ぼさなかった。

### 4.1.4 心臓イオンチャネルへの影響（MSE-[redacted]-005B）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.9

Kv11.1（hERG）チャネル以外に、心臓イオンチャネル hKCNQ1/hminK、hKv1.5、hNav1.5、hHCN4、hKv4.3/hKChIP2、hCav1.2 及び hKir2.1 も心臓活動電位の発生に関与している。オートパッチクランプ法を用いて、これらのイオンチャネルの電流に対するテポチニブ（遊離塩基）の影響を 3 又は 10 μM の濃度で検討した。この試験では Kv11.1（hERG）チャネルへの影響も同様に検討した。

テポチニブ（遊離塩基）は 10 μM の濃度で hNav1.5 誘導電流をわずかに阻害し、パルス 1 及びパルス 28 の阻害率は DMSO 対照よりそれぞれ 14%及び 26%高かったことから、中等度の周波数依存性の阻害を示すことが明らかになった。

テポチニブ（遊離塩基）は検討したその他の心臓イオンチャネルには影響を及ぼさなかった。10 μM での Kv11.1（hERG）チャネル電流阻害率は DMSO 対照より 47%高かったことから、ホールセルパッチクランプ試験で得られた結果（4.1.2 項）が再現された。

### 4.1.5 摘出モルモット乳頭筋の収縮力及び不応期への影響（GSP_IO_001_[redacted]）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.10

一定間隔で収縮する摘出モルモット心臓乳頭筋の収縮力及び不応期に対するテポチニブ（遊離塩基）の影響の有無を 0.3、1、3、10 及び 30 μM の累積濃度で検討した。各濃度の間のインキュベーション時間は最長 70 分間であった。

収縮力に対するテポチニブ（遊離塩基）の影響は認められなかった。テポチニブ（遊離塩基）を 10 及び 30 μM の濃度で添加したとき、不応期がわずかに延長し、溶媒対照群及び時点対照群と比較したときの変化率はそれぞれ+6%及び+11%であった。テポチニブ（遊離塩基）の最高濃度 30 μM では、標本 10 例中 6 例が 70 分間のインキュベーション中に定常状態に達しなかった。

## 4.2 In vivo 安全性薬理試験

### 4.2.1 心血管系

#### 4.2.1.1 覚醒ラットの心血管系機能への影響（GSP0001CVP）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.11

血圧が正常な覚醒非拘束 CD ラットを用いて、テポチニブ（遊離塩基）の心血管系への影響の有無を検討した。ラット（1 群雄 6 匹）に用量 15 若しくは 50 mg/kg/日のテポチニブ（遊離塩基）、溶媒（20% Solutol 含有酢酸ナトリウム緩衝液、pH 5.5）又は飲用水（時点対照）を、それぞれ 5 mL/kg/日の容量で 8 日間連日経口投与した後、5 日間の投与後期間を設けた。心拍数、平均収縮期及び拡張期動脈血圧、並びに自発運動量を 4 日間の前投与期間、8 日間の投与期間及び 5 日間の投与後期間の全体にわたりテレメトリーで連続的に測定した。体重、摂餌量及び摂水量を試験期間全体にわたり測定した。最終投与後 2 時間に血漿中テポチニブ濃度を測定した。

覚醒ラットにテポチニブ（遊離塩基）を 50 mg/kg/日までの用量で 8 日間経口投与したとき、心拍数、平均収縮期及び拡張期動脈血圧、自発運動量、摂餌量、摂水量、並びに体重への影響は認められなかった。テポチニブ（遊離塩基）を 15 及び 50 mg/kg/日の用量で投与したときの血漿中濃度は用量依存的に上昇し、それぞれ 149 ± 14 及び 325 ± 124 ng/mL（後者は遊離型 $C_{max}$ 値 13 ng/mL に相当する）であった。

#### 4.2.1.2 覚醒イヌの心血管系機能への影響（GSP0002ECG）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.12

本 GLP 準拠試験では、覚醒雑種犬又はビーグル犬にテポチニブを単回経口投与したときの心血管系への影響の有無を検討した。1 群 5 匹（雌雄混合）のイヌに 30 若しくは 70 mg/kg の用量のテポチニブ、又は溶媒（0.25%ヒドロキシメチルセルロース水溶液）を 2 mL/kg の容量で投与した。心拍数、動脈血圧及び ECG を測定した。定期的に呼吸数及び直腸温を測定した。臨床症状及び行動への影響の有無も評価した。また、pH、血液ガス（$pCO_2$、$pO_2$）、ヘモグロビン含量、ヘマトクリット、酸塩基状態、血中代謝物（グルコース及び乳酸）及び血漿中テポチニブ濃度測定用の静脈血試料を試験期間中の様々な時点（投与前 20 分並びに投与後 10、20、30、60、120、180 及び 240 分）で採取した。

覚醒イヌにテポチニブを 70 mg/kg までの用量で投与したとき、心拍数、収縮期、拡張期及び平均動脈血圧、並びに心拍数で補正した QT 間隔への影響は認められなかった。呼吸数の増加が 30 mg/kg 群の 5 例中 3 例及び 70 mg/kg 群の 5 例中 1 例にみられ、それに伴って一部の個体で断続的な呼吸が認められた。これらの呼吸系への影響は、テポチニブの胃腸系への影響（一部の個体でみられた軽度下痢、軽度蠕動音、流涎、息詰まり及び嘔吐）に関連するものと考えられる。投与後 24 時間には胃腸系への影響は認められなかった。直腸温、静脈血 pH、酸塩基状態、血液ガス、ヘモグロビン含量、ヘマトクリット、並びに血漿中グルコース及び乳酸濃度への影響は認められなかった。テポチニブを 30 又は 70 mg/kg の用量で単回経口投与したときの曝露量は同程度であり、血漿中濃度は投与後 240 分まで上昇した。用量 70 mg/kg での総 $C_{max}$ 値は 66 ng/mL であり、これは遊離型 $C_{max}$ 値 4 ng/mL に相当する。

結論として、本試験ではテポチニブが有害な不整脈を引き起こす潜在的リスクを有することを示す成績は得られなかった。

#### 4.2.1.3 麻酔イヌの心血管系機能への影響（PDA0018）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.13

テポチニブの受容体プロファイリングの結果から、イミダゾリン I1 受容体を阻害する可能性が示唆された（4.1.1 項）。このため、用量 15 mg/kg のチオペンタールの静脈内投与により麻酔した雑種犬を用いて、テポチニブ（遊離塩基）の心血管系（全身及び局所血行動態）への影響の有無を検討した（報告書番号 PDA0018）。血圧の正常な開胸イヌに用量 70 mg/kg のテポチニブ（遊離塩基）（雌雄混合 5 匹）又は溶媒（0.25%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液）（雌雄混合 7 匹）を単回十二指腸内投与した。種々の血行動態パラメータ（左室圧、大動脈圧、肺動脈圧、中心静脈圧、右室圧、大動脈血流量、左冠動脈前下行肢血流量、大腿動脈血流量、左腎動脈血流量及び左室前壁厚）を投与前、1 分間の投与中及び投与後 240 分間の全体にわたり連続的に測定した。酸塩基状態、pH、血液ガス、ヘマトクリット、血中及び血漿中ヘモグロビン含量、血中グルコース及び乳酸濃度、並びに動脈血漿中テポチニブ濃度も様々な時点で測定した。また、組織（咬筋、左室壁内心筋、腎臓、肺及び肝臓）内テポチニブ濃度も測定した。

テポチニブ（遊離塩基）投与後 40～240 分に、左室 $dP/dt_{max}$（左室圧上昇速度、左室全体の収縮力のパラメータ）の軽度ではあるが有意な増加（p 値<0.05）及び拍出量の軽度増加が認められた。この所見に一致して、負荷非依存性の局所心筋仕事量（心臓サイクル期間の局所前壁厚と左室圧の積を積分した値）の軽度増加も投与後 25～240 分に認められた。これらの変化は負荷が不変の状態［試験期間中に拡張終期前壁厚（前負荷）及び平均大動脈圧（後負荷）が変化しなかった］で認められた。テポチニブ（遊離塩基）投与後 25 分に、局所前壁心筋収縮力の軽度増加に伴い、左冠動脈前下行肢血流量の軽度ではあるが有意な増加及び冠血管抵抗の減少が認められたことから、代謝性冠血管拡張が生じていることが示された。本試験で測定したその他のパラメータへの影響は認められなかった。

テポチニブ（遊離塩基）を 70 mg/kg の用量で単回十二指腸内投与したときの血漿中濃度は比較的低かった（$C_{max}$ 値は投与後 2 時間に 115.0 ng/mL であった）。

結論として、テポチニブ（遊離塩基）を投与した麻酔イヌは、良好な全身及び局所血行動態プロファイルを示した。テポチニブ（遊離塩基）を 70 mg/kg の用量で単回十二指腸内投与したとき、全身

及び局所血行動態パラメータへの影響はほとんど認められなかった。左室全体の $dP/dt_{max}$ 及び負荷非依存性の前壁心筋機能の軽度増加で示される軽度の陽性変力作用が認められた。

#### 4.2.1.4 反復投与毒性試験で評価した覚醒ビーグル犬の心血管系機能への影響（T8421、T8427及び[redacted] DA009-N0）

概要表 2.6.7、7E、7F 及び 7G、添付資料番号：4.2.3.2.6～8

ビーグル犬を用いた 4 週間（報告書番号 T8421）、13 週間（報告書番号 T8427）及び 39 週間（報告書番号[redacted]-DA009-N0）の反復投与毒性試験（CTD2.6.6、3.6、3.7 及び 3.9 項参照）で、テポチニブ投与による心拍数、動脈血圧及び ECG パラメータ（心拍数で補正した QT 間隔を含む）への影響は認められなかった。39 週間反復投与毒性試験の高用量 30 mg/kg/日で得られた平均総 $C_{max}$ 値は、雄が 254 ng/mL、雌が 554 ng/mL であり、これらはそれぞれ遊離型 $C_{max}$ 値 15.2 及び 33.2 ng/mL に相当する。

### 4.2.2 呼吸系

#### 4.2.2.1 覚醒ラットの呼吸系機能への影響（[redacted].198/4）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.14

本 GLP 準拠試験では、覚醒 Wistar ラットにテポチニブを単回経口投与したときの呼吸系機能への影響の有無を全身プレチスモグラフィーで検討した。1 群 8 匹の雄ラットに、用量 25、75 若しくは 200 mg/kg のテポチニブ又は溶媒（0.25%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液）を単回経口投与した。テオフィリン（100 mg/kg、経口投与）を陽性対照とした。投与後 240 分間にわたってパラメータ（呼吸数、呼吸量、1 回換気量、吸気、呼気及び休止時間、最大吸気及び呼気流量、並びにポーズ及びエンハンスドポーズ）を測定した。

覚醒ラットにテポチニブを 200 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、240 分間の測定期間全体で、評価したいずれのパラメータにも明らかな影響は認められなかった。陽性対照のテオフィリンは、機械的呼吸機能に対して既知の促進作用を示した。

#### 4.2.2.2 反復投与毒性試験で評価した覚醒イヌの呼吸機能への影響（T8421 及び T8427）

概要表 2.6.7、7E 及び 7F、添付資料番号：4.2.3.2.6 及び 7

イヌを用いた 4 週間（報告書番号 T8421）及び 13 週間（報告書番号 T8427）の反復投与毒性試験（CTD2.6.6、3.6 及び 3.7 項参照）では、40 mg/kg/日までの用量のテポチニブによる呼吸数への影響は認められなかった。

### 4.2.3 中枢神経系

#### 4.2.3.1 覚醒ラットの中枢神経系機能への影響（T16160）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.15

本 GLP 準拠試験では、覚醒 Wistar ラットにテポチニブを単回経口投与したときの種々の神経系領域（中枢神経、自律神経、神経筋及び感覚運動領域）への影響の有無を機能観察総合評価法で検討した。また、自発運動量及び体温も評価した。ラット（5 匹/性/群）に用量 25、75 又は 200 mg/kg の tebotinib 又は溶媒（0.25%ヒドロキシプロピルメチルセルロース水溶液）を経口投与した。カフェイン（20 mg/kg、経口投与）及びハロペリドール（3 mg/kg、腹腔内投与）を陽性対照とした。投与後 30 分から自発運動量を 1 時間にわたり測定した後、機能観察総合評価（投与後 90～180 分）及び体温測定を行った。

テポチニブを 200 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、機能観察総合評価法で測定した種々の神経系領域に対して病態生理学的に意義のある影響は認められなかった。また、いずれの用量でも自発運動量及び体温に意義のある変化は認められなかった。同じ条件下で、陽性対照物質のハロペリドール及びカフェインはそれらの既知の作用を示した。

#### 4.2.3.2 反復投与毒性試験で検査した覚醒イヌの反射機能への影響（T8421 及び T8427）

概要表 2.6.7、7E 及び 7F、添付資料番号：4.2.3.2.6 及び 7

イヌを用いた 4 週間（報告書番号 T8421）及び 13 週間（報告書番号 T8427）の反復投与毒性試験（CTD2.6.6、3.6 及び 3.7 項参照）で、自律神経系の反射（瞳孔対光反射、眼瞼反射、膝蓋腱反射及び肛門反射）を検査した。テポチニブ投与の影響は、試験した最高用量の 40 mg/kg/日まで認められなかった。

### 4.3 ヒト主要循環血中代謝物 MSC2571109A の安全性薬理試験

#### 4.3.1 受容体結合及び酵素阻害プロファイリング（参考資料 100021444）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.16（参考資料）

テポチニブのヒト主要循環血中代謝物 MSC2571109A とオフターゲットとの相互作用の有無を検討するため、141 種類の細胞受容体、酵素、トランスポーター及びイオンチャネルに対する選択的結合及び酵素阻害の in vitro プロファイリングアッセイを単一濃度 10 μM で実施した。

その結果、10 μM の MSC2571109A の結合により 50%を超える阻害がみられたオフターゲットは、ヒトアデノシン A3 受容体（心臓及び脳に発現、アゴニスト型放射性リガンド使用）、ヒトムスカリン M1 受容体（唾液腺、脳及び前立腺に発現、アンタゴニスト型放射性リガンド使用）及びヒトムスカリン M2 受容体（心臓に発現、アンタゴニスト型放射性リガンド使用）であり、阻害率はそれぞれ 57.7%、57.8%及び 56.2%であった。また、MSC2571109A は非選択的 PDE6 酵素活性も 74.6%阻害した（PDE6 は網膜に発現、セルベースアッセイ）。

#### 4.3.2 Kv11.1（hERG）機能への影響（RC10）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.17

本 GLP 準拠 in vitro 試験では、HEK293 細胞に安定的に発現させた Kv11.1（hERG）チャネルを介したカリウム電流に対する MSC2571109A の影響を、ホールセルパッチクランプ法により名目濃度 0.1、0.3、1、3 及び 10 μM で検討した。

MSC2571109A は（調製時に意図した）名目濃度で 3 μM（試験後の試験液を分析して得られた実濃度：約 2.7 μM）まで影響を及ぼさなかった。名目濃度 10 μM（実濃度：約 7 μM）では、hERG テール電流振幅が 24.9%減少した。

### 4.3.3 心臓イオンチャネルへの影響（MRS031115-1）

概要表 2.6.3、4、添付資料番号：4.2.1.3.18

MSC2571109A の in vitro 心臓イオンチャネルプロファイリング試験を、オートパッチクランプ装置を用いて実施した。この試験では、心臓イオンチャネル hNav1.5、hKv4.3/hKChIP2、hCav1.2、hKv1.5、hKCNQ1/hminK、hHCN4 及び hKir2.1 に対する MSC2571109A の活性を 10 又は 30 μM の濃度で検討した。

検討したいずれのイオンチャネル電流でも 10 及び 30 μM の濃度の MSC2571109A により 10%を超える変化は認められなかった。

## 5. 薬力学的薬物相互作用

テポチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

## 6. 考察及び結論

効力を裏付ける試験の結果から、テポチニブは受容体型チロシンキナーゼの MET を強力かつ選択的に阻害することが示された。構造解析からテポチニブはタイプ I の ATP 競合的 MET 阻害剤であることが確認された。

テポチニブは in vitro で HGF 依存性 MET リン酸化及び恒常的 MET リン酸化を阻害し（$IC_{50}$ 値は 1 桁のナノモル範囲）、下流シグナル伝達の活性化を阻害し、感受性を示す腫瘍細胞の増殖、足場非依存性増殖及び HGF 誘発遊走を抑制した。

In vivo では、NSCLC、HCC 及び胃癌といった種々の癌種の細胞株及び PDX を用いた多数のマウスモデルでテポチニブの抗腫瘍効果が認められた。胃癌細胞株（Hs746T、*MET*ex14 スキッピング変異及び高度 *MET* 遺伝子増幅を有する）及び膵癌細胞株（KP-4、HGF/MET 自己分泌循環による MET 活性化を有する）由来異種移植腫瘍では、低用量（それぞれ 3 及び 5 mg/kg）のテポチニブで MET リン酸化（MET 活性化）の効果的な（約 90%）阻害が認められた。これらのモデルでテポチニブの連日投与により最大の抗腫瘍効果を得るには MET が 24 時間以上阻害（95%超）されるより高い用量が必要であった（Hs746T 及び KP-4 でそれぞれ 10～30 mg/kg 及び 200 mg/kg）。したがって、これらのデータから、最大の抗腫瘍効果を得るには持続的な MET 阻害が必要であることが示された。

In vivo での MET 阻害に伴って、遠位 PD マーカーである IL-8 のダウンレギュレーション並びに増殖マーカーであるリン酸化ヒストン H3、p27 及びサイクリン D1 の変化が認められた。これに一致して、in vitro で MET シグナル伝達阻害及び腫瘍細胞増殖抑制が認められ、in vivo で得られたテポチニブの抗腫瘍効果のメカニズムが明らかになった。

腫瘍での MET の異常な活性化を引き起こすいくつかのメカニズムとして、HGF 発現レベルの上昇による自己分泌/傍分泌の活性化、転写のアップレギュレーションによる MET 過剰発現、*MET* の活性化変異（キナーゼドメインの点変異及び MET 融合を含む）、*MET*ex14 スキッピング変異及び *MET*

遺伝子増幅が報告されている（Wu 2017）。In vivo 有効性データから、テポチニブは本質的にこれら全ての腫瘍内 MET 活性化メカニズムを標的とすることが示された。ただし、テポチニブは特に MET の発癌性活性化を有することが明らかになっている腫瘍に活性を示した。

高度 *MET* 遺伝子増幅（*MET* GCN が 10 を超えるものと定義）を有する異なる癌種に由来する種々の腫瘍で、完全な腫瘍退縮を含む強力な反応が一貫して認められた。低用量のテポチニブでも顕著な腫瘍縮小がみられることが多かった。*MET*ex14 スキッピング変異を有する非臨床モデルとして利用できるものは概して限られているため、さらに広範な非臨床評価を実施することはできない。しかし、テポチニブは検討した 2 種類のモデルで抗腫瘍効果を示した。高度 *MET* 遺伝子増幅と比較して、*MET*ex14 スキッピング変異を有する腫瘍で得られている非臨床エビデンスは広範なものではないが、*MET*ex14 スキッピングは（高度 *MET* 増幅と同様に）MET 阻害への感受性を与える発癌性ドライバーとして知られている（詳細は CTD2.4、2.2 項参照）。*MET* 遺伝子のエクソン 14 は、MET の発現レベル及びキナーゼ活性を制御するのに重要ないくつかの要素を含む膜近傍ドメインをコードしている。エクソン 14 の欠損に伴いこれらの調節エレメントが欠損すると、細胞表面での MET 発現レベルが上昇し、MET シグナル伝達が持続する。興味深いこととして、報告されている大半の MET 融合蛋白質（この変異も発癌性 MET 活性化を媒介する）では、融合相手が N 末端に挿入され、エクソン 15 がコードしている配列から始まる MET の C 末端部分と直接融合することにより、エクソン 14 が除去される。非臨床試験で、エクソン 14 がコードしている配列を Tpr-Met 融合蛋白質に再導入すると癌化が抑制されることが明らかになっていることから（Lu 2017）、エクソン 14 欠損により発癌性 MET 活性化が生じることを示す更なる証拠が得られ、*MET*ex14 スキッピング及び MET 融合蛋白質は癌化を媒介する共通のメカニズムを有していることが示された。テポチニブは Tpr-Met 融合蛋白質を発現している異種移植モデルで完全な腫瘍退縮を含む強い効果を示した。

*MET*ex14 スキッピング変異、高度 *MET* 増幅及び MET 融合はいずれも NSCLC の主な発癌性ドライバーとして知られている。それらは発癌及び腫瘍の進行を十分に促進しうると考えられており、こうした腫瘍は MET に強く依存していることから MET 阻害に感受性を示すと考えられる（Comoglio 2018、Wu 2017）。したがって、Tpr-Met 融合モデル及び高度 *MET* 遺伝子増幅を有する腫瘍で得られた抗腫瘍効果は、*MET*ex14 スキッピング変異を有する腫瘍でテポチニブが効果を示すことを支持するデータと考えられる。

テポチニブの抗腫瘍効果を検討した全ての in vivo 薬理試験で、テポチニブの投与に関連した体重減少及びその他の有害な作用は 1 日用量 200 mg/kg でも認められなかった。このことはテポチニブの忍容性が良好であることを示唆するものであり、安全性薬理試験（4 項）及び毒性試験の結果と一致していた。

結論として、効力を裏付ける薬理試験のデータから、*MET*ex14 スキッピング変異の有無に基づいて選別した NSCLC 患者でテポチニブの開発を行う強い根拠が得られた。

In vivo 副次的薬理試験の結果から、テポチニブは創傷治癒に影響を及ぼさないことが示唆された。

潜在的オフターゲットを特定し、心血管系、呼吸系及び CNS 機能に対する影響を検討するための広範な in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験を、テポチニブ又はその遊離塩基を用いて実施した。また、ヒト主要循環血中代謝物 MSC2571109A の潜在的オフターゲット及び心血管系への影響を検討する in vitro 安全性薬理試験を実施した。これらの試験で得られた結果を、ヒトに臨床用量の 500 mg/日を連日反復経口投与したときの定常状態で得られた（又は推測された）テポチニブ又はそのヒト主要代謝物 MSC2571109A の $C_{max}$ 値を考慮して以下に考察する（表 4）。

表 4　500 mg/日のテポチニブを投与した定常状態のヒトにおけるテポチニブと代謝物 MSC2571109A の血漿中最大濃度（$C_{max}$）

| Test item | tepotinib dose (mg) | Mean $C_{max}$ total (ng/mL) | Mean $C_{max}$ free[a] (ng/mL) | Mean $C_{max}$ total (μM[b]) | Mean $C_{max}$ free[a] (μM[b]) |
|---|---|---|---|---|---|
| tepotinib | 500 | 1291[c] | 25.8 | 2.62 | 0.05 |
| MSC2571109A | 500 | 313[d] | 3.7 | 0.62 | 0.007 |

Abbreviation: $C_{max}$: maximum concentration.
a: Fraction unbound in human plasma of 2% for tepotinib and 1.2% for MSC2571109A (CTD 2.6.5、7-A 及び 7-D 項参照).
b: Calculations were based on the molecular weight of tepotinib of 492.57 g/mol and of MSC2571109A of 506.56 g/mol.
c: Geometric mean measured on Day 14 in study EMR200095-001 (CTD 2.7.2、表 3 参照)
d: Geometric mean measured on Day 8 in study MS200095-032 (CTD 2.7.2、表 24 参照)

薬理活性を有する広範な種類の細胞受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対するテポチニブ（遊離塩基）のオフターゲット作用の有無を in vitro で評価した。オフターゲットへの結合の $IC_{50}$ 値 / MET キナーゼへの結合の $IC_{50}$ 値比が 50 未満であったのは 2 種類の受容体［メラトニン ML2（MT3）受容体及びイミダゾリン I1 受容体］のみであった。ただし、ML2（MT3）受容体との相互作用は安全面及び機能面から意義のあるものではないと判断された。I1 受容体は血圧の調節に関与していることが知られているが、ラット及びイヌを用いた心血管系に特化した試験及びイヌを用いた反復投与毒性試験での心血管系の評価で明らかな影響はみられなかったことから（4.2.1 項）、I1 受容体との臨床的に意義のある相互作用が生じる可能性はないことが示された。

機能アッセイ又は取込みアッセイでテポチニブ（遊離塩基）は α2c アドレナリン受容体、ムスカリン受容体（M1～M3）、NE トランスポーター及び DA トランスポーターにアンタゴニスト作用を示した。得られた $IC_{50}$ 値は、ヒトの定常状態で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値 0.05 μM の 11 倍以上であった。さらに、以下に示す in vivo 安全性薬理試験で心血管系、呼吸系及び CNS に意義のある影響は認められなかった。これらのデータから、全体として、テポチニブと上記オフターゲットとの相互作用の臨床的意義はほとんどないと考えられる。

In vitro 安全性薬理試験で心血管系への影響を評価したところ、テポチニブ又はその遊離塩基は Kv11.1（hERG）チャネル電流を阻害し、$IC_{50}$ 値は 1.2 μM であった。この濃度はヒトの定常状態で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値 0.05 μM の 24 倍であることから、この作用は臨床で問題となるものではないと考えられた。また、テポチニブは試験濃度の 10 μM で心臓イオンチャネル hNav1.5 を阻害した（最大 26%）。さらに、テポチニブ（遊離塩基）は 10 及び 30 μM の濃度でモルモット乳頭筋の不応期をわずかに（最大 11%）延長させた。ただし、これらの変化がみられた濃度は患者の定常状態で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値 0.05 μM の 100 倍を超えるものであり、ラット及びイヌを用いた別の in vivo 心血管系試験でこれらの変化と関連する所見は認められなかった。

ラットを用いたテレメトリーによる心血管系試験では、テポチニブ（遊離塩基）を 50 mg/kg/日までの用量で 8 日間連日経口投与したとき（総 $C_{max}$ 値及び遊離型 $C_{max}$ 値はそれぞれ 325 及び 13 ng/mL、すなわち患者の定常状態で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL の約半分）、心拍数及び動脈血圧への影響は認められなかった。イヌにテポチニブを 70 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、心拍数、動脈血圧及び ECG パラメータへの影響は認められなかった。また、イヌに 70 mg/kg の用量で単回十二指腸内投与したとき、局所及び全身血行動態を表す種々のパラメータに意義のある影響は認められなかった。軽度の陽性変力作用がみられたが、それに関連した心血管系の意義のある所見は認められ

なかった。これらの最後 2 試験でのテポチニブの曝露量は比較的低かった（総 $C_{max}$ 値及び遊離型 $C_{max}$ 値は、経口投与試験がそれぞれ 67 及び 4 ng/mL、十二指腸内投与試験がそれぞれ 115 及び 7.4 ng/mL）。

また、イヌを用いた多くの反復投与毒性試験（最長 39 週間）で動脈血圧及び ECG パラメータへの影響は認められなかった。具体的には、長期の 39 週間投与試験で高用量の 30 mg/kg/日まで心血管系の変化は認められなかった。30 mg/kg/日の用量で得られた平均総 $C_{max}$ 値は、雄が 254 ng/mL、雌が 554 ng/mL であり、これらはそれぞれ遊離型 $C_{max}$ 値 15.2 及び 33.2 ng/mL に相当する。これらの濃度はヒトでの平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL と同程度である。要約すると、in vitro 及び in vivo のデータ全体から、QT 延長のリスクはないことが示唆された。

雄ラットを用いた呼吸器系の試験では、テポチニブを 200 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、明らかな影響は認められなかった。この試験で曝露量データは得られていない。ただし、同様の試験条件下で実施したラット 4 週間反復経口投与毒性試験の平均曝露量データ（報告書番号 T16157、高用量 90 mg/kg/日群の雄での投与初日の $C_{max}$ 値は 251.84 ng/mL）を用いると、$C_{max}$ 値は約 560 ng/mL と算出される（PK は用量比例性を示すと仮定）。算出された $C_{max}$ 値 560 ng/mL は遊離型 $C_{max}$ 値 22.4 ng/mL に相当し、これはヒトでの平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL に近い値である。さらに、イヌを用いた 4 週間及び 13 週間反復経口投与毒性試験でも呼吸数に対する影響は認められなかった（イヌ 4 週間反復経口投与毒性試験の高用量群の雄での投与期間終了時の平均 $C_{max}$ 値は、総 $C_{max}$ が 382 ng/mL、遊離型 $C_{max}$ が 24.4 ng/mL であり、ヒトでの平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL と同程度である）。

ラットにテポチニブを 200 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、機能観察総合評価で CNS への影響は認められなかった。この試験で曝露量データは得られていない。ただし、同様の試験条件下で実施したラット 4 週間反復経口投与毒性試験の平均曝露量データ（報告書番号 T16157、高用量 90 mg/kg/日群の投与初日の $C_{max}$ 値は、雄が 251.84 ng/mL、雌が 421.03 ng/mL）を用いると、$C_{max}$ 値は、雄が約 560 ng/mL、雌が約 936 ng/mL と算出される（PK は用量比例性を示すと仮定）。算出された最も高い $C_{max}$ 値 936 ng/mL は遊離型 $C_{max}$ 値 38.4 ng/mL に相当し、これはヒトでの平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL の 1.5 倍である。さらに、イヌを用いた 4 週間及び 13 週間反復投与毒性試験でもテポチニブは 40 mg/kg/日までの用量で自律神経系の反射機能に影響を及ぼさなかった（4 週間試験の高用量群の雄での投与期間終了時の平均 $C_{max}$ 値は、総 $C_{max}$ が 382 ng/mL、遊離型 $C_{max}$ が 24.4 ng/mL であり、ヒトでの平均遊離型 $C_{max}$ 値 25.8 ng/mL と同程度である）。

In vitro オフターゲットプロファイリング試験では、ヒト主要循環血中代謝物 MSC2571109A は 4 種類のオフターゲット（ヒトアデノシン A3 受容体、ヒトムスカリン M1 及び M2 受容体、並びに PDE6）に対して 10 μM で 50%を超える阻害を示した。しかし、（臨床用量 500 mg/日のテポチニブを投与したときの）定常状態で得られた MSC2571109A の遊離型 $C_{max}$ 値 0.007 μM は、本試験で検討した 10 μM の 1400 分の 1 未満の濃度であることを考慮すると、臨床でこれらのオフターゲットに対する阻害作用は生じないと考えられる。

hERG 試験では、MSC2571109A は 2.7 μM までの濃度で影響を及ぼさなかった。この濃度は、ヒトにテポチニブを 500 mg/日の用量で投与したときの定常状態で得られた MSC2571109A の遊離型 $C_{max}$ 値 0.007 μM の約 385 倍であることから、臨床で hERG を阻害するリスクはないことが示された。In vitro 心臓イオンチャネルプロファイリング試験で、MSC2571109A は 30 μM までの濃度で明らかな影響を及ぼさなかった。

結論として、テポチニブ又はその遊離塩基を用いた in vitro 及び in vivo 安全性薬理試験で、患者に臨床用量 500 mg/日を投与したときの定常状態で得られた平均遊離型 $C_{max}$ 値と同程度以上の濃度又は曝露量（$C_{max}$）まで、意義のあるオフターゲット作用並びに心血管系、呼吸系及び CNS への影響は認められなかった。

また、代謝物 MSC2571109A の in vitro 安全性薬理試験から、臨床用量 500 mg/日のテポチニブを投与したとき、オフターゲット作用及び心血管系への影響（QT 延長）が生じるリスクはないと考えられる。

## 7. 図表

図表は本文中に記載した。

## 8. 参考文献

Asaoka Y, Tada M, Ikenoue T, et al. Gastric cancer cell line Hs746T harbors a splice site mutation of c-Met causing juxtamembrane domain deletion. Biochem Biophys Res Commun. 2010 394:1042-6.

Awad MM, Oxnard GR, Jackman DM, et al. MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. J Clin Oncol. 2016 34:721-30.

Bahcall M, Sim T, Paweletz CP, et al. Acquired METD1228V Mutation and Resistance to MET Inhibition in Lung Cancer. Cancer Discov. 2016 6:1334-41.

Bender S, Gronych J, Warnatz HJ, et al. Recurrent MET fusion genes represent a drug target in pediatric glioblastoma. Nat Med. 2016 22:1314-20.

Bladt F, Riethmacher D, Isenmann S, et al. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. Nature. 1995 376:768-71.

Bousquet P. Identification and Characterization of I1 Imidazoline Receptors: Their Role in Blood Pressure Regulation. AJH. 2000 13: 84S-88S.

Chmielowiec J, Borowiak M, Morkel M, et al. c-Met is essential for wound healing in the skin. J Cell Biol. 2007 177:151-62.

Comoglio PM, Trusolino L, Boccaccio C. Known and novel roles of the MET oncogene in cancer: a coherent approach to targeted therapy. Nat Rev Cancer. 2018; 18:341-58.

Cortot AB, Kherrouche Z, Descarpentries C, et al. Exon 14 Deleted MET Receptor as a New Biomarker and Target in Cancers. J Natl Cancer Inst. 2017 109(5): 1-12.

Davies KD, Ng TL, Estrada-Bernal A, et al. Dramatic Response to Crizotinib in a Patient with Lung Cancer Positive for an HLA-DRB1-MET Gene Fusion. JCO. Precis Oncol 2017 (1):1-9.

Frampton GM, Ali SM, Rosenzweig M, et al. Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. Cancer Discov. 2015 5:850-9.

Gow C-H, et al. Oncogenic Function of a KIF5B-MET Fusion Variant in non-Small Cell Lung Cancer. Neoplasis. 2018 20:838-47.

Heist RS, Sequist LV, Borger D, et al. Acquired Resistance to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. J Thorac Oncol. 2016 11(8):1242-1245.

Jin H, Yang R, Zheng Z, et al. MetMAb, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. Cancer Res. 2008 68:4360-8.

Kim HJ, Kang SK, Kwon WS et al. Forty-nine gastric cancer cell lines with integrative genomic profiling for development of c-MET inhibitor. Int J Cancer. 2018 143:151-159.

Kubo T, Yamamoto H, Lockwood WW, et al. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. Int J Cancer. 2009 124:1778 84.

Li A, Yang JJ, Zhang XC, et al. Acquired MET Y1248H and D1246N Mutations Mediate Resistance to MET Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2017 23:4929 37.

Li T, Ling YH, Perez-Soler R. Tumor dependence on the EGFR signaling pathway expressed by the p-EGFR:p-AKT ratio predicts erlotinib sensitivity in human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells expressing wild-type EGFR gene. J Thorac Oncol. 2008 3:643-7.

Lu X; Peled N, Greer J, et al. MET Exon 14 Mutation Encodes an Actionable Therapeutic Target in Lung Adenocarcinoma. Cancer Res. 2017 77(16) August 15.

Lutterbach B, Zeng Q, Davis IJ, et al. Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. Cancer Res. 2007 67(5):2081-88.

Matsubara D, Ishikawa S, Sachiko O, et al. Co-activation of epidermal growth factor receptor and c-MET defines a distinct subset of lung adenocarcinomas. Am J Pathol. 2010 177:2191-204.

Nakamura Y, Matsubara D, Goto A, et al. Constitutive activation of c-Met is correlated with c-Met overexpression and dependent on cell-matrix adhesion in lung adenocarcinoma cell lines. Cancer Sci. 2008 99:14-22.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, et al. Identification of the Melatonin-binding Site MT3 as the Quinone Reductase 2*. JBC. 2000 October 6; 275 (No 40), 31311-17.

Ou SI, Young L, Schrock AB, et al. Emergence of Preexisting MET Y1230C Mutation as a Resistance Mechanism to Crizotinib in NSCLC with MET Exon 14 Skipping. J Thorac Oncol. 2017 Jan. 12(1):137-140.

Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, et al. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell. 2003 3:347-61.

Smith MA, Licita T, Lakhani A, et al. MET-GRB2 Signaling-Associated Complexes Correlate with Oncogenic MET Signaling and Sensitivity to MET Kinase Inhibitors. Clin Cancer Res. 2017 23:7084-96.

Soman NR, Correa P, Ruiz BA, et al. The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions. Proc Natl Acad Sci. 1991; 88:4892 6.

Tanizaki J, Okamoto I, Okamoto K, et al. MET tyrosine kinase inhibitor crizotinib (PF-02341066) shows differential antitumor effects in non-small cell lung cancer according to MET alterations. J Thorac Oncol. 2011 6:1624-31.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5:836-47.

Tian J, Tang ZY, Ye SL, et al. New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis. Brit J Cancer. 1999 81:814-21.

Tovar EA, Graveel CR. MET in human cancer: germline and somatic mutations. Ann Transl Med. 2017 5:205.

Wu W, Bi C, Credille KM, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis in non-small cell lung cancer by LY2801653, an inhibitor of several oncokinases, including MET. Clin Cancer Res. 2013 19:5699-710.

Wu YL, Soo RA, Locatelli G, et al. Does c-Met remain a rational target for therapy in patients with EGFR TKI-resistant non-small cell lung cancer? Cancer Treat Rev. 2017 61:70-81.

Xie Q, Su Y, Dykema K, et al. Overexpression of HGF Promotes HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma Progression and Is an Effective Indicator for Met-Targeting Therapy. Genes Cancer. 2013 4:247-60.

Zhang Y, Farenholtz KE, Yang Y, et al. Hepatocyte growth factor sensitizes brain tumors to c-MET kinase inhibition. Clin Cancer Res. 2013 19:1433-44.

Zhang Y, Gao X, Zhu Y, et al. The dual blockade of MET and VEGFR2 signaling demonstrates pronounced inhibition on tumor growth and metastasis of hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res. 2018 37:93.

Zou HY, Li Q, Lee JH, et al. Sensitivity of selected human tumor models to PF-04217903, a novel selective c-Met kinase inhibitor. Mol Cancer Ther. 2012 11:1036-47.

# 2.6.3　薬理試験の概要表

目次

1. 薬理試験：　一覧表..... 2
2. 効力を裏付ける試験.....11
3. 副次的薬理試験..... 22
4. 安全性薬理試験..... 23
5. 薬力学的薬物相互作用試験..... 29

# 1. 薬理試験： 一覧表

Test Article: tepotinib

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| **Primary pharmacodynamics** | | | | | |
| **Tepotinib** | | | | | |
| X-ray analysis | Kinase domain of human MET | In vitro (tepotinib free base[b]) | Proteros biostructures GmbH, Martinsried, Germany | PSR-NCETech-EMD1214063-004-proteros | 4.2.1.1.1 |
| In vitro kinase assay | Kinase domain of human MET | In vitro (tepotinib[a], tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-NCETech-EMD1214063-001 | 4.2.1.1.2 |
| In vitro kinase screen | 5 kinase domain mutants of human MET and 31 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro (tepotinib free base[b]) | Millipore Ltd., Dundee, UK | PSR-NCETech-EMD1214063-002, | 4.2.1.1.3 |
| In vitro kinase screen | 74 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro (tepotinib free base[b]) | University of Dundee, Division of Signal Transduction Therapy (DSTT), Dundee, UK | PSR-NCETech-EMD1214063-003 | 4.2.1.1.4 |
| In vitro kinase screen | MET wild-type, 6 kinase domain mutants of human MET, and 298 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro (tepotinib[a]) | Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited, Dundee, UK | SER1071 | 4.2.1.1.5 |
| In vitro kinase screen | MET wild-type, 13 kinase domain mutants of human MET, and 385 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro (tepotinib[a]) | Reaction Biology Corp., Malvern, USA | 20150521-EMD-RC-KP-38 | 4.2.1.1.6 |
| Cellular MET phosphorylation | A549 human non-small cell lung cancer (NSCLC) cells (HGF stimulated) | In vitro (tepotinib[a]) | Merck KGaA, Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-001 | 4.2.1.1.7 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Cellular MET phosphorylation by ELISA | *MET* amplified human cell lines with constitutive MET activation: EBC-1 (NSCLC), Hs746T and GTL-16 (both gastric cancer) | In vitro (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-001 | 4.2.1.1.7 |
| MET signal transduction (phosphorylation of Akt, ERK, and Gab-1) | *MET* amplified human cell lines with constitutive MET activation: EBC-1 (NSCLC), Hs746T and GTL-16 (both gastric cancer) | In vitro (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-001 | 4.2.1.1.7 |
| Cell proliferation | Human gastric cancer cell lines MKN-45 (*MET* amplified, constitutive MET activation) and SNU-16 (normal *MET* GCN, non-activated MET) | In vitro (tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-002 | 4.2.1.1.8 |
| Three-dimensional, anchorage-independent growth | NIH3T3 murine fibroblasts co-transfected with human HGF and human MET | In vitro (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-002 | 4.2.1.1.8 |
| Cell migration | H441 human NSCLC cells | In vitro (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-002 | 4.2.1.1.8 |
| Anti-tumor effects in humanized HGF SCID mice | H596 human NSCLC subcutaneous xenografts with *MET*ex14 skipping alteration | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC207-1-83MFH | 4.2.1.1.9 |
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | Hs746T human gastric cancer subcutaneous xenografts with *MET*ex14 skipping alteration and high level *MET* amplification | In vivo, po (tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-004 | 4.2.1.1.10 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | EBC-1 human NSCLC subcutaneous xenografts with high level *MET* amplification | In vivo, po (tepotinib, tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-004 | 4.2.1.1.10 |
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | MKN-45 human gastric cancer subcutaneous xenografts with high level *MET* amplification | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | DOV-325-1-42-MFH | 4.2.1.1.11 |
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice and assessment of tumor-produced alpha-fetoprotein levels in plasma | MHCC97H human HCC subcutaneous xenografts with high level *MET* amplification | In vivo, po (tepotinib[a]) | CrownBio international R&D center, Beijing, P.R. China | CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW | 4.2.1.1.12 |
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice, and assessment of tumor-produced alpha-fetoprotein levels in plasma | MHCC97H human HCC orthotopic xenografts with high level *MET* amplification | In vivo, po (tepotinib[a]) | CrownBio international R&D center, Beijing, P.R. China | CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW | 4.2.1.1.13 |
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | Human Tpr-Met (MET fusion protein) transformed NIH3T3 murine fibroblasts | In vivo, po (tepotinib, tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-004 | 4.2.1.1.10 |
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | H441 human NSCLC subcutaneous xenografts (MET overexpression) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | DOV-190-1-66-MFH | 4.2.1.1.14 |
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | U-87 MG human glioblastoma subcutaneous xenografts (HGF/MET expression) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | DOV-190-1-51-MFH | 4.2.1.1.15 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer subcutaneous xenografts (HGF/MET expression) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | DOV-315-1-9-MFH | 4.2.1.1.16 |
| Anti-tumor effects in CD-1 nude mice | H1975 human NSCLC subcutaneous xenografts (high MET expression, EGFR mutation) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | DOV-347-1-12-MFH | 4.2.1.1.17 |
| Anti-tumor effects in humanized HGF SCID mice | PC-9 human NSCLC subcutaneous xenografts (high MET expression, EGFR mutation) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC373-1-38MFH | 4.2.1.1.18 |
| Anti-tumor effects in humanized HGF SCID mice | HCC827 human NSCLC subcutaneous xenografts (high MET expression, EGFR mutation) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC373-1-39MFH | 4.2.1.1.19 |
| Anti-tumor effects in NOD-SCID mice | 63 patient-derived subcutaneous xenografts from human brain metastasis | In vivo, po (tepotinib[a]) | EMD Serono, Billerica, MA USA | ONC20190605LC | 4.2.1.1.20 |
| Molecular profiling (Nanostring analyses) | 61 patient-derived subcutaneous xenografts from human brain metastasis | N.A. | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC20190302CR | 4.2.1.1.21 |
| Anti-tumor effects in NOD-SCID mice | Two patient-derived subcutaneous xenografts from human brain metastasis with high level *MET* amplification | In vivo, po (tepotinib[a]) | Crown Bioscience San Diego, CA 92121 | Crown Bioscience_E0177-U1708 | 4.2.1.1.22 |
| Single-dose PK/PD study in CD-1 nude mice | Hs746T human gastric cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-003 | 4.2.1.1.23 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Immunohistochemical PD study | Hs746T human gastric cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PSR-ONC-EMD1214063-005 | 4.2.1.1.24 |
| Single-dose PK/PD study in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC367-1-65MFH | 4.2.1.1.25 |
| Dose-dependent anti-tumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC207-1-35MFH | 4.2.1.1.26 |
| PK/PD modeling of phospho-MET modulation and anti-tumor effects in Balb/c nude mice | Data from studies ONC367-1-65MFH and ONC207-1-35MFH | N.A. | Merck Serono, Istituto di Ricerche Biomediche, Italy | RF6770 | 4.2.2.7.1 |
| **Tepotinib metabolite MSC2571109A** | | | | | |
| Cellular MET phosphorylation | A549 human NSCLC cells (HGF stimulated) | In vitro (MSC2571109A) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONCIRA00346CK | 4.2.1.1.27 |
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (MSC2571109A and tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC402-3-12MFH | 4.2.1.1.28 |
| Single-dose PK/PD study in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (MSC2571109A and tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC401-1-11MFH | 4.2.1.1.29 |
| Repeat-dose PK/PD study in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer subcutaneous xenografts | In vivo, po (MSC2571109A and tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONC401-1-12MFH | 4.2.1.1.30 |
| MET phosphorylation | KP-4 tumors from study ONC401-1-11MFH | N.A. | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONCKWI00221CK | 4.2.1.1.31 |
| MET phosphorylation | KP-4 tumors from study ONC401-1-12MFH | N.A. | Merck KGaA Darmstadt, Germany | ONCKWI00219CK | 4.2.1.1.32 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| **Secondary pharmacodynamics** | | | | | |
| **Tepotinib** | | | | | |
| Wound healing | Mice, C57BL6/J (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Epistem Ltd, Manchester, UK | Merck[redacted]/237b | 4.2.1.2.1 |
| **Safety pharmacology** | | | | | |
| **Tepotinib** | | | | | |
| Receptor binding assay | Radioligand binding assays | In vitro (tepotinib free base[b]) | Cerep, Celle-Lévescault, France | 8920141 | 4.2.1.3.1 （参考資料） |
| Human $M_1$ and $M_3$ receptor functional assay | CHO cells (human recombinant) | In vitro (tepotinib free base[b]) | Cerep, Celle-Lévescault, France | 8920142 | 4.2.1.3.2 （参考資料） |
| Muscarinic receptor binding assay | Cerebral cells (rat) | In vitro (tepotinib free base[b]) | Cerep, Celle-Lévescault, France | 8920150 | 4.2.1.3.3 （参考資料） |
| Binding and enzyme assay | Radioligand binding and enzyme assay | In vitro (tepotinib free base[b]) | Cerep, Celle-Lévescault, France | 8920154 | 4.2.1.3.4 （参考資料） |
| Cellular, tissue functional and uptake assay | CHO cells (human recombinant), tissue (guinea pig), synaptosomes (rat) | In vitro (tepotinib free base[b]) | Cerep, Celle-Lévescault, France | 8920158 | 4.2.1.3.5 （参考資料） |
| *Cardiovascular system* | | | | | |
| Kv11.1 (hERG) channel function | HEK293 cells | In vitro (tepotinib free base[b]) | ChanTest Corporation, Cleveland, USA | 071025.TSP | 4.2.1.3.6 （参考資料） |
| Kv11.1 (hERG) channel function | HEK293 cells | In vitro (tepotinib[a]) | ChanTest Corporation, Cleveland, USA | 080415.DCC | 4.2.1.3.7 |
| Kv11.1hERG channel trafficking | HEK293 cells | In vitro (tepotinib[a]) | ChanTest Corporation, Cleveland, USA | 081124.TSP | 4.2.1.3.8 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Function of various cardiac ion channels [Kv11.1 (hERG), hKCNQ1/hminK, hKv1.5, hNav1.5, hHCN4, hKv4.3/hKChIP2, hCav1.2, hKir2.1] | Different cell lines over-expressing recombinant channels | In vitro (tepotinib free base[b]) | Millipore UK Ltd., Cambridge, United Kingdom | MSE-[redacted]-005B | 4.2.1.3.9 |
| Force of contraction and refractory period in isolated papillary muscles | Guinea pigs (Dunkin Hartley) | In vitro (tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | GSP_IO_001_[redacted] | 4.2.1.3.10 |
| Telemetric measurement of arterial blood pressure, heart rate and motor activity | Rats, CD (conscious) | In vivo, po (tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | GSP0001CVP | 4.2.1.3.11 |
| Measurement of heart rate, arterial blood pressure and ECG | Dogs, mongrel and beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | GSP0002ECG | 4.2.1.3.12 |
| Extensive systemic and regional hemodynamics | Dogs, mongrel (anesthetized) | In vivo, intraduodenal (tepotinib free base[b]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | PDA0018 | 4.2.1.3.13 |
| Heart rate, arterial blood pressure, ECG within repeat-dose toxicity study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T 8421 | 4.2.3.2.6 |
| Heart rate, arterial blood pressure, ECG within repeat-dose toxicity study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T 8427 | 4.2.3.2.7 |
| Heart rate, arterial blood pressure, ECG within repeat-dose toxicity study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | [redacted]-DA009-N0 | 4.2.3.2.9 |
| *Respiratory function* | | | | | |
| Whole body plethysmography | Rats, Wistar (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Porsolt & Partners, Le Genest-Saint-Isle, France | [redacted].198/4 | 4.2.1.3.14 |

| Type of study | Test system | Method of administration (test article) | Testing facility | Study number | Location CTD Section |
|---|---|---|---|---|---|
| Respiratory function within repeat dose study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T 8421 | 4.2.3.2.6 |
| Respiratory function within repeat dose study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T 8427 | 4.2.3.2.7 |
| *Central nervous system* | | | | | |
| Functional observational battery (FOB) | Rats, Wistar (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T16160 | 4.2.1.3.15 |
| Reflex tests within repeat-dose toxicity study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T 8421 | 4.2.3.2.6 |
| Reflex tests within repeat-dose toxicity study | Dogs, beagle (conscious) | In vivo, po (tepotinib[a]) | Merck KGaA Darmstadt, Germany | T 8427 | 4.2.3.2.7 |
| **Tepotinib metabolite MSC2571109A** | | | | | |
| Binding and enzyme assays | Radioligand binding assays, enzymes isolated from different cell lines (most human) or tissues | In vitro | Eurofins CEREP France, Celle-Lévescault, France | 100021444 | 4.2.1.3.16 （参考資料） |
| *Cardiovascular system* | | | | | |
| Kv11.1 (hERG) channel function | HEK293 cells | In vitro | Cytocentrics Bioscience GmbH, Rostock, Germany | RC10 | 4.2.1.3.17 |
| Function of various cardiac ion channels (hKCNQ1/hminK, hKv1.5, hNav1.5, hHCN4, hKv4.3/hKChIP2, hCav1.2, hKir2.1) | Different cell lines overexpressing recombinant channels | In vitro | Eurofins Pharma Bioanalytics Services US Inc., St Charles, USA | MRS031115-1 | 4.2.1.3.18 |

ECG: Electrocardiogram; EGFR: Epidermal growth factor receptor; Gab-1: Grb-2 associated binding protein 1; hCav1.2: Human cardiac ion channel voltage-gated calcium 1.2; HEK293 cells: Human embryonic kidney 293 cells; hERG: human ether-a-go-go-related gene; HGF: Hepatocyte growth factor; hHCN4: Human cardiac ion channel hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium 4; hKCNQ1: Human potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1; hKir2.1: Human cardiac ion channel inward-rectifying voltage-gated potassium 2.1; hKv1.5: Human cardiac ion channel voltage-gated potassium 1.5; hKv4.3/hKChIP2: Human cardiac ion channel voltage-gated

potassium 4.3; hNav1.5: Human cardiac ion channel voltage-gated sodium 1.5; Kv11.1 (hERG) channel; M1: Muscarinic 1; M3: Muscarinic 3; PD: Pharmacodynamics; PK: Pharmacokinetics.
a: Also identified as MSC2156119J or EMD 1214063.
b: Also identified as MSC2156119A or EMD 1160879.

## 2. 効力を裏付ける試験

Test Article: tepotinib

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tepotinib** | | | | | | |
| X-ray analysis | Kinase domain of human MET | In vitro | N.A. | N.A. | Crystal structure of the MET kinase domain with tepotinib (free base) confirms binding to the ATP pocket in a U-shaped conformation indicating that tepotinib is a type I, ATP competitive, reversible small molecule inhibitor of MET | PSR-NCETech-EMD1214063-004-proteros |
| In vitro kinase assay | Kinase domain of human MET | In vitro | N.A. | N.A. | In vitro kinase activity of MET was inhibited by tepotinib with $IC_{50}$ values of of 1.7 and 1.8 nM in two independent experiments and by the free base of tepotinib with an average $IC_{50}$ value of 3.6 nM (four independent experiments) | PSR-NCETech-EMD1214063-001 |
| In vitro kinase screen | 5 kinase domain mutants of human MET and 31 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro | N.A. | N.A. | In vitro kinase activity of all MET mutants was inhibited by tepotinib (free base) by more than 50% at 10 µM.<br>In vitro kinase activity of ALK, Axl, Blk, Ron and TrkB was inhibited by tepotinib (free base) by more than 50% at 10 µM. | PSR-NCETech-EMD1214063-002 |
| In vitro kinase screen | 74 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro | N.A. | N.A. | Tepotinib (free base) did not significantly inhibit any of the tested protein kinase activities at 1 µM | PSR-NCETech-EMD1214063-003 |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| In vitro kinase screen | MET wild-type, 6 kinase domain mutants of human MET, and 298 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro | N.A. | N.A. | Tepotinib effectively inhibited MET (≥ 99%) at 1 µM and 0.1 µM and various MET kinase domain mutants at 1 µM.<br>In vitro kinase activity of Axl, IRAK1, IRAK4, TrkA and TrkC was inhibited by more than 50% at 1 µM. No MET unrelated kinase was inhibited by more than 75% at 1 µM.<br>No Met unrelated kinase was inhibited by more than 50% at 0.1 µM, | SER1071 |
| In vitro kinase screen | MET wild-type, 13 kinase domain mutants of human MET, and 385 different MET unrelated kinases, mostly of human origin | In vitro | N.A. | N.A. | Tepotinib effectively inhibited MET (≥ 99%) and various MET kinase domain mutants at 1 µM. Tepotinib (1 µM) was inactive on MET variants with kinase domain mutations at positions D1228 and Y1230.<br>Tepotinib (1 µM) inhibited IRAK1 by more than 50%, IRAK4 and TrkC by more than 75%. | 20150521-EMD-RC-KP-38 |
| Cellular MET phosphorylation | A549 human NSCLC cells (normal expression levels of non-activated MET, HGF-stimulated) | In vitro | N.A. | N.A. | Inhibition of HGF-induced MET phosphorylation by tepotinib immediately after inhibitor incubation with an $IC_{50}$ of 5.4 nM<br>Inhibition of HGF-induced MET phosphorylation by tepotinib 14 h after inhibitor incubation with an $IC_{50}$ of 5.3 nM<br>Inhibition of HGF-induced MET phosphorylation by tepotinib in the presence of 10% mouse serum with an $IC_{50}$ of 21.0 nM<br>Inhibition of HGF-induced MET phosphorylation by tepotinib in the presence of 10% human serum with an $IC_{50}$ of 23.0 nM | PSR-ONC-EMD1214063-001 |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cellular MET phosphorylation by ELISA | EBC-1 NSCLC cells, Hs746T and GTL-16 gastric cancer cells (all with high level *MET* gene amplification and constitutive MET activation) | In vitro | N.A. | N.A. | Inhibition of constitutive, HGF-independent MET phosphorylation by tepotinib with $IC_{50}$ values of 1.1 nM (EBC-1), 2.5 nM (Hs746T) and 2.9 nM (GTL-16) | PSR-ONC-EMD1214063-001 |
| Cellular phosphorylation of MET (Y1234/1235), Gab-1 (Y627), Akt (S473), and ERK1/2 (T202/Y204) by Western blotting | EBC-1 NSCLC cells, Hs746T and GTL-16 gastric cancer cells (all with high level *MET* gene amplification and constitutive MET activation) | In vitro | N.A. | N.A. | Tepotinib inhibited<br>MET phosphorylation with $IC_{50}$ values of 9.2 nM (EBC-1), 1.0 nM (Hs746T), and 4.8 nM (GTL-16);<br>Gab-1 phosphorylation with $IC_{50}$ values of 3.4 nM (EBC-1), 0.4 nM (Hs746T), and 1.9 nM (GTL-16);<br>Akt and ERK1/2 phosphorylation in EBC-1 and Hs746T cells $IC_{50}$ values in the low or sub-nanomolar range (Akt and ERK1/2 phosphorylation phosphorylation could not be detected at sufficient amounts in GTL-16 cells) | PSR-ONC-EMD1214063-001 |
| Cell proliferation by WST-1 assay | MKN-45 (high level *MET* gene amplification), SNU-16 (low expression of non-activated MET) human gastric cancer cells | In vitro | N.A. | N.A. | Inhibition of MKN-45 cell proliferation by tepotinib (free base) with an $IC_{50}$ of 6.2 nM, inhibition of SNU-16 cell proliferation with an $IC_{50}$ of 2.8 µM | PSR-ONC-EMD1214063-002 |
| Three-dimensional, anchorage-independent growth | NIH3T3 murine fibroblasts co-transfected with human HGF and human MET | In vitro | N.A. | N.A. | Inhibition of three-dimensional, anchorage-independent growth of established colonies in soft agar by tepotinib with an $IC_{50}$ of 1.8 nM | PSR-ONC-EMD1214063-002 |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cell migration | H441 human NSCLC cells (MET overexpression) | In vitro | N.A. | N.A. | Inhibition of HGF-induced cell migration by tepotinib at concentrations as low as 0.1 nM. Almost complete inhibition of HGF-induced cell migration at concentrations of 100 nM to 10 µM. | PSR-ONC-EMD1214063-002 |
| Antitumor effects in humanized HGF SCID mice | H596 human NSCLC sc xenografts (*MET*ex14 skipping) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | Daily | Pronounced tumor growth inhibition resulting in a T/C values of 30% | ONC207-1-83MFH |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | Hs746T human gastric cancer sc xenografts (*MET*ex14 skipping, high level *MET* amplification) | In vivo, po | 3 and 6 mg/kg of tepotinib free base | Daily | Complete tumor regression at 6 mg/kg in 10/10 mice treated;<br>pronounced tumor growth inhibition at 3 mg/kg resulting in a T/C values of 3% | PSR-ONC-EMD1214063-004 |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | Hs746T human gastric cancer sc xenografts (*MET*ex14 skipping, high level *MET* amplification) | In vivo, po | 10 and 30 mg/kg of tepotinib free base | Daily (10 mg/kg), every other or every third day (10 and 30 mg/kg) | 10 mg/kg daily (qd), 30 mg/kg every second day (q2d), and 30 mg/kg every third day (q3d) resulted in complete tumor regression in 8/10, 9/9, and 9/9 mice, respectively | PSR-ONC-EMD1214063-004 |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | EBC-1 human NSCLC sc xenografts (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 6 and 15 mg/kg of tepotinib and tepotinib free base | Daily | Complete tumor regression at 15 mg/kg of tepotinib and its free base in 5/10 and 7/10 mice, respectively. Comparable tumor growth inhibition (T/C 48% and 43%) at 6 mg/kg of tepotinib and its free base. | PSR-ONC-EMD1214063-004 |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | EBC-1 human NSCLC sc xenografts (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 6 and 25 mg/kg of tepotinib free base | Daily | Complete tumor regression in 10/10 mice at 25 mg/kg/d and tumor growth inhibition (T/C of 68%) at 6 mg/kg | PSR-ONC-EMD1214063-004 |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | MKN-45 human gastric cancer sc xenografts (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 25 and 200 mg/kg of tepotinib | Daily | Pronounced tumor growth inhibition with T/C values of -46% and -52% at 25 and 200 mg/kg, respectively, partial tumor regression in 4/8 mice at both doses | DOV-325-1-42-MFH |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antitumor effects in Balb/c nude mice | MHCC97H human HCC sc xenografts (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | Pronounced tumor shrinkage in 10/10 mice including complete tumor regression in 9/10 mice. | CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW |
| Concentration of tumor-derived AFP in serum of Balb/c nude mice (by ELISA) | MHCC97H human HCC sc xenografts (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | Significant reduction of serum AFP concentration at Day 20 (end of treatment) in mice treated with tepotinib versus controls | CrownBioMKG-CP-S002-subcutanZW |
| Antitumor effects in Balb/c nude mice | MHCC97H human HCC orthotopic xenograft (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | Tepotinib induced tumor regression in orthotopically growing liver tumors and complete tumor regression in 2/9 mice. Tepotinib also significantly reduced metastatic foci in the lungs compared to controls. | CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW |
| Concentration of tumor-derived AFP in serum of Balb/c nude mice (by ELISA) | MHCC97H human HCC orthotopic xenograft (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | Significant reduction of serum AFP concentration at Day 35 (end of treatment) in mice treated with tepotinib versus controls | CrownBioMKG-CP-S002-orthotopZW |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | Tpr-Met transformed NIH3T3 murine fibroblasts (sc xenografts) | In vivo, po | 3, 6, 12.5, and 25 mg/kg of tepotinib | Daily | Dose-dependent antitumor activity. Strong inhibition of tumor growth at 12.5 mg/kg and complete tumor regression in 4/8 mice at 25 mg/kg. | PSR-ONC-EMD1214063-004 |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | Tpr-Met transformed NIH3T3 murine fibroblasts (sc xenografts) | In vivo, po | 25 mg/kg of tepotinib free base | Daily | Regression of large, established tumors (size of about 550 $mm^3$) to barely measurable size | PSR-ONC-EMD1214063-004 |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | NCI-H441 NSCLC sc xenografts (MET overexpression) | In vivo, po | 25 and 200 mg/kg of tepotinib | Daily | Tumor growth inhibition at 25 mg/kg (T/C 11%) and 200 mg/kg (T/C -17%). | DOV-190-1-66-MFH |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | U-87 MG human glioblastoma sc xenografts (HGF/MET expression) | In vivo, po | 50, 100 and 200 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | Tumor growth inhibition with T/C values of 13%, 1% and -30% at 50, 100, and 200 mg/kg, respectively. | DOV-190-1-51-MFH |
| Antitumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts (HGF/MET expression) | In vivo, po | 25, 50 and 200 mg/kg of tepotinib | Daily | Tumor growth inhibition with T/C values of 19% and 3% at 25 and 50 mg/kg, respectively. Partial tumor regression in 7/10 mice at 200 mg/kg. | DOV-315-1-9-MFH |
| Antitumor effects in CD-1 nude mice | H1975 human NSCLC sc xenografts (MET overexpression; *EGFR* kinase domain mutation) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | Daily | No tumor growth inhibition | DOV-347-1-12-MFH |
| Antitumor effects in humanized HGF SCID mice | HCC827 human NSCLC sc xenografts (MET overexpression; *EGFR* kinase domain mutation) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | No tumor growth inhibition | ONC373-1-39MFH |
| Antitumor effects in humanized HGF SCID mice | PC-9 human NSCLC sc xenografts (MET overexpression; *EGFR* kinase domain mutation) | In vivo, po | 100 mg/kg of tepotinib | 5 days on/2 days off | No tumor growth inhibition | ONC373-1-38MFH |
| Antitumor effects in NOD-SCID mice | 63 sc tumor explants derived from human brain metastasis | In vivo, po | 30 mg/kg of tepotinib | Daily | Tumor regression observed in two models derived from brain metastasis of primary lung tumors (LU5406 and LU5349) | ONC20190605LC |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Molecular profiles (cancer-specific mutations, gene copy number variations, expression of cancer-relevant genes (by Nanostring)) | 61 sc tumor explants derived from human brain metastasis | N.A. | N.A. | N.A. | High level MET gene amplification (gene copy number >10) was found in the two most sensitive tumors to tepotinib treatment, but not in any other of the 61 tumors analyzed. | ONC20190302CR |
| Antitumor effects in NOD-SCID mice | LU5406 and LU5349 sc tumor explants derived from brain metastasis of primary human lung tumors (high level *MET* amplification) | In vivo, po | 125 mg/kg of tepotinib | Daily | Complete tumor regression in 5/5 mice in both models | Crown Bioscience_E0177-U1708 |
| Single dose PK/PD study in CD-1 mice | Hs746T human gastric cancer sc xenografts | In vivo, po | 3, 10, 30 and 100 mg/kg of tepotinib | Single administration | Immediate (within 6 h) and pronounced (more than 90 %) inhibition of MET phosphorylation at all dose levels tested. At tepotinib doses ≥ 10 mg/kg, the drug concentrations in the tumor was within the active pharmacological range identified in vitro at all time points tested (3 - 96 h) and inhibition of MET phosphorylation (more than 90%) was long lasting (at least 72 h). Inhibition of IL-8 production showed a similar pattern as inhibition of MET phosphorylation. | PSR-ONC-EMD1214063-003 |
| Immunohistochemical PD study | Hs746T human gastric cancer sc xenografts | In vivo, po | 3, 10, 30 and 100 mg/kg of tepotinib | Single administration | Inhibition of phospho-MET and phospho-histone H3 levels, reduction of cyclin D1 expression and transient induction of p27 by tepotinib. | PSR-ONC-EMD1214063-005 |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Single dose PK/PD study in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vivo, po | 5, 15, 50 and 200 mg/kg of tepotinib | Single administration | MET phosphorylation was effectively (> 90%) inhibited at all tepotinib concentrations up to 6 hours. A persistent inhibition of MET phosphorylation of more than 90% for at least 24 hours was only observed at the highest dose level of 200 mg/kg | ONC367-1-65MFH |
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vivo, po | 5, 15, 25 and 200 mg/kg of tepotinib | Daily | Dose-dependent tumor growth inhibition at 5, 15, 25 and 200 mg/kg with T/C values of 49%, 24%, 15% and -22%, respectively. | ONC207-1-35MFH |
| Data from studies ONC367-1-65MFH and ONC207-1-35MFH | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | N.A. | N.A. | N.A. | Analysis of data and PK/PD modeling based on the data generated in studies ONC367-1-65MFH and ONC207-1-35MFH | RF6770 |
| **Tepotinib metabolite MSC2571109A** | | | | | | |
| Cellular MET phosphorylation | A549 human NSCLC cells | In vitro | N.A. | N.A. | The tepotinib metabolite MSC2571109A potently inhibited HGF-induced MET phosphorylation with $IC_{50}$ values of 13 nM (batch-1), and 26 nM (batch-2) | ONCIRA00346CK |
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vivo, po | 2, 10 and 50 mg/kg of MSC2571109A; 200 mg/kg of tepotinib | Daily | Tepotinib led to tumor growth inhibition (T/C value of -23%) while MSC2571109A had no effect at all doses tested (T/C values of 109%, 81%, and 81% for 2, 10, and 50 mg/kg, respectively). | ONC402-3-12MFH |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Single dose PK/PD study | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vivo, po | 5, 10 and 25 mg/kg of MSC2571109A;<br>200 mg/kg of tepotinib | Single administration | A single dose of 200 mg/kg tepotinib resulted in a maximal average tepotinib concentration in plasma of 1965 ng/mL at 2 hours and an average drug concentration of 375 ng/mL at 24 hours. Tepotinib was enriched in tumor tissue with a maximal average concentration of 11883 ng/mL at 8 hours and 3773 ng/ml at 24 hours.<br>The single dose of 200 mg/kg tepotinib produced lower concentrations of the metabolite MSC2571109A in plasma and tumor than the highest dose of MSC2571109A. MSC251109A at 25 mg/kg resulted in an average $C_{max}$ after 2 hours of 919 ng/mL in plasma and 270 ng/mL in tumor tissue. Maximal average MSC2571109A concentrations after tepotinib treatment were observed after 8 hours with 225 ng/ml and 111 ng/mL in plasma and tumor tissue, respectively. The average MSC2571109A concentrations in plasma and tumor dropped below 5 ng/mL at 24 hours after MSC2571109A and 48 h after tepotinib treatment. | ONC401-1-11MFH |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Repeat-dose PK/PD study | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vivo, po | 2, 10 and 50 mg/kg of MSC2571109A;<br>200 mg/kg of tepotinib | Daily | Treatment with the highest dose of MSC2571109A (50 mg/kg) led to a transient increase of average plasma concentrations of MSC2571109A 8 hours after dosing: 266 ng/mL (d2/8h) and 209 ng/mL (d4/8h), but 24 hours after the last dose (d4/24h) average MSC2571109A plasma concentrations dropped to <10 ng/mL.<br>Average MSC2571109A concentrations after tepotinib treatment (200 mg/kg) followed a similar pattern: 156 ng/mL (d2/8h), 175 ng/mL (d4/8h), and 14 ng/ml (d4/24h).<br>Average MSC2571109A concentrations in tumor tissue were lower than the plasma concentration and showed the same pattern: 113 ng/mL (d2/8h), 104 ng/mL (d4/8h), and <10 ng/mL (d4/24h) under treatment with MSC2571109A at 50 mg/kg; 66 ng/mL (d2/8h), 81 ng/mL (d4/8h), and 15 ng/mL (d4/24h) under tepotinib treatment (200 mg/kg). | ONC401-1-12MFH |
| Anti-tumor effects in Balb/c nude mice | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vivo, po | 2, 10 and 50 mg/kg of MSC2571109A;<br>200 mg/kg of tepotinib | Daily | Tepotinib led to tumor growth inhibition (T/C value of -23%) while MSC2571109A had no effect at all doses tested (T/C values of 109%, 81%, and 81% for 2, 10, and 50 mg/kg, respectively). | ONC402-3-12MFH |
| MET phosphorylation in tumors from study ONC401-1-11MFH | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vitro | N.A. | N.A. | All three doses of MSC2571109A induced transient inhibition of MET phosphorylation with maximal inhibition (>90%) observed at 2 hours. At 24 hours phospho-MET levels had returned back to normal levels.<br>>95% inhibition of MET phosphorylation by tepotinib which was persistent for 24 hours. | ONCKWI00221CK |

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MET phosphorylation in tumors from study ONC401-1-12MFH | KP-4 human pancreatic cancer sc xenografts | In vitro | N.A. | N.A. | All three doses of MSC2571109A led to transient inhibition of MET phosphorylation at 8 hours which was most pronounced (~90%) for the highest dose (50 mg/kg). At 24 hours after the last dose at Day 4 phospho-MET levels had returned back to normal levels.<br>Tepotinib at 200 mg/kg induced >95% inhibition of MET phosphorylation at all timepoints tested including 48 hours after the last dose at Day 4. | ONCKWI00219CK |

N.A.: Not applicable; PD: Pharmacodynamics; PK: Pharmacokinetics; HGF: Hepatocyte growth factor.

## 3. 副次的薬理試験

Test Article: tepotinib

| Test system | Species/strain | Method of admin. | Doses (mg/kg) | Schedule | Results | Study number |
|---|---|---|---|---|---|---|
| In vivo wound healing | Mice, C57BL6/J | In vivo, po | 0, 25 or 50 mg/kg tepotinib | Once daily administration over 3 or 10 days | Up to 50 mg/kg the compound had no negative effect on wound healing i.e. wound width, visual severity score, wound area, percentage re-epithelialization and granulation tissue maturity in comparison to vehicle. | Merck[redacted]/237b |

# 4. 安全性薬理試験

Test Article: tepotinib

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Admin. | Doses/ concentration | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tepotinib** | | | | | | | |
| In vitro off-target profiling | | In vitro | Binding and enzyme assays: 10 µM tepotinib (free base);<br>Function assays: in a range of 0.3 nM to 30 µM tepotinib (free base) | N.A.; n=2[a] | In binding and enzyme assays against 143 cell receptors, 33 off-targets were inhibited by ≥ 50%.<br>Function assays were done for 8 affected off-targets and given $IC_{50}$ values between 0.55 to 22 µM for dopamine transporter and muscarinic receptors M1-M3. | No | 8920141, 8920142, 8920150, 8920154, 8920158 （いずれも参考資料） |
| *Cardiovascular system* | | | | | | | |
| Kv11.1 (hERG) channel function | HEK293 cells | In vitro | 0, 0.3, 1, 3, 10, and 30 µM tepotinib (free base) | N.A.; n=2-3[a] | Inhibition of hERG channel current: $IC_{50}$ = 5.8 µM | No | 071025.TSP （参考資料） |
| Kv11.1 (hERG) channel function | HEK293 cells | In vitro | 0, 0.2, 1, 3 or 10 µM tepotinib | N.A. n=3[a] | Inhibition of hERG channel current: $IC_{25}$ = 0.4 µM, $IC_{50}$ = 1.2 µM and $IC_{75}$ = 3.4 µM | Yes | 080415. DCC |
| Kv11.1 (hERG) channel trafficking | HEK293 cells | In vitro | 1, 3 or 10 µM tepotinib | N.A. n=3[a] | No effect on the relative hERG channel trafficking was seen. | No | 081124.TSP |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Admin. | Doses/ concentration | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Function of various cardiac ion channels | Eight cell lines expressing the following cardiac ion channels: Kv11.1 (hERG) hKCNQ1/hminKhKv1.5 hNav1.5 hHCN4 hKv4.3/hKChIP2hCav1.2hKir2.1 | In vitro | 3 or 10 µM tepotinib (free base) | N.A. n=7-8[a] | At 10 µM, a slight inhibition of hNav1.5 by 14 % and 26 % above control at pulse 1 and 28, respectively, indicating a moderate frequency dependency. No effects on the other cardiac ion channels tested were seen. An inhibition of the hERG channel current by 47 % above control at 10 µM. | No | MSE-[redacted]-005B |
| Force of contraction and refractory period of isolated papillary muscles | Guinea pigs, Dunkin Hartley | In vitro | 0, 0.3, 1, 3, 10 and 30 µM (cumulative) tepotinib (free base) | N.A.; n=9/10[a] | Up to 30 µM, tepotinib free base had no effect on force of contraction. A slight increase of refractory period was seen at 10 (+ 6%) and 30 µM (+11.1%) in comparison to the solvent | No | GSP_IO_001_[redacted] |
| Telemetric measurement of arterial blood pressure, heart rate and motor activity | Rats, CD (conscious) | po, daily administration for 8 days + 5 days post-treatment | 0, 15 or 50 mg/kg/day tepotinib (free base) | 6M | Up to 50 mg/kg/day, tepotinib free base did not show any treatment related effects on heart rate, arterial blood pressure, motor activity, food and water consumption or body weight. | No | GSP0001CVP |
| Heart rate, arterial blood pressure, ECG, arterial blood gas[b] | Dogs, mongrel and beagle (conscious) | po, single administration | 0, 30 or 70 mg/kg tepotinib | 5 M/F | Up to 70 mg/kg, the compound did not induce any effects on heart rate, arterial blood pressure and on the duration of the heart rate corrected QT-interval. No effects on arterial blood gas and rectal temperature. Increased respiratory rate observed in animals at both tepotinib doses were considered related to gastrointestinal effects (i.e. diarrhea and vomiting). | Yes | GSP0002ECG |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Admin. | Doses/ concentration | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Systemic and regional hemodynamics | Dogs, mongrel (anesthetized) | Intra-duodenal, single administration | 0 or 70 mg/kg tepotinib (free base) | 0 (control):<br>7 M/F<br>70 mg/kg:<br>5 M/F | Up to 70 mg/kg, tepotinib had no pathophysiologically relevant effects on the measured regional and systemic hemodynamic parameters.<br>A slight positive inotropic effect was detected, as seen by slight increases in global left ventricular $dP/dt_{max}$ and load-independent anterior myocardial function. | No | PDA0018 |
| Heart rate, arterial blood pressure, ECG within repeat-dose studies | Dogs, beagle (conscious) | po, once daily, 4 weeks with 8weeks recovery period | 0, 2.5, 10 or 40 mg/kg tepotinib | 0, 2.5 and 10 mg/kg: 3M + 3F;<br>40 mg/kg: 5M + 5F | No effects on heart rate, arterial blood pressure and ECG, including heart rate-corrected QT-intervals | Yes | T 8421 |
| | | po, once daily, 13 weeks with 8 weeks recovery | 0, 3, 10 or 30 mg/kg tepotinib | 6M + 6F | No effects on heart rate, arterial blood pressure and ECG, including heart rate-corrected QT-intervals | Yes | T 8427 |
| | | po, once daily, 39 weeks with 12 weeks recovery | 40, 3, 10 or 30 mg/kg tepotinib | 5M + 5F | No effects on heart rate, arterial blood pressure and ECG, including heart rate-corrected QT-intervals | Yes | [redacted]-DA009-N0 |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Admin. | Doses/ concentration | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Respiratory system* | | | | | | | |
| Whole body plethysmography | Rats, Wistar (conscious) | po, single administration | 0, 25, 75 or 200 mg/kg tepotinib); | 8M | Up to 200 mg/kg, no effects on respiratory rate, tidal volume, inspiratory-, expiratory- and relaxation time, peak expiratory and inspiratory flow, pause and enhanced pause were seen. | Yes | [redacted].198/4 |
| Respiratory function within repeat dose study | Dogs, beagle (conscious) | po, once daily, 4 weeks with 8weeks recovery period | 0, 2.5, 10 or 40 mg/kg tepotinib | 0, 2.5 and 10 mg/kg: 3M + 3F;<br>40 mg/kg: 5M + 5F | No effects on respiratory rate were observed | Yes | T 8421 |
| | | po, once daily, 13 weeks with 8 weeks recovery | 0, 3, 10 or 30 mg/kg tepotinib | 6M + 6F | No effects on respiratory rate were observed | Yes | T 8427 |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Admin. | Doses/ concentration | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Central nervous system* | | | | | | | |
| Functional observational battery, motor activity and body temperature | Rats, Wistar (conscious) | po, single administration | 0, 25, 75 or 200 mg/kg tepotinib (batch 5); | 5M + 5F | Up to 200 mg/kg, tepotinib did not induce any effects on the parameters of the autonomous, neuromuscular, sensomotoric or central nervous domain of the nervous system. No effects on locomotor activity and body temperature were seen. | Yes | T16160 |
| Reflex tests (pupillary light, lid, patellar and anal) within repeat dose study | Dogs, Marshall: Beagle (conscious) | po, once daily, 4 weeks | 0, 2.5, 10 or 40 mg/kg | 0, 2.5 and 10 mg/kg: 3M + 3F;<br>40 mg/kg: 5M + 5F | No treatment related effects. | Yes | T 8421 |
| | | po, once daily, 13 weeks with 8 weeks recovery | 0, 3, 10 or 30 mg/kg | 6M + 6F | No treatment related effects. | Yes | T 8427 |

| Organ Systems Evaluated | Species/ Strain | Method of Admin. | Doses/ concentration | Gender and No. per Group | Noteworthy Findings | GLP Compliance | Study Number |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tepotinib metabolite MSC2571109A** | | | | | | | |
| Specificity profiling against 142 off- target cell receptors, enzymes, transporters or ion channels | Radio-ligand binding assays, cell- and enzyme assays | In vitro | 10 µM MSC2571109A (major human metabolite) | N.A.; n=2[a] | 4 off-targets were inhibited by ≥ 50%.<br>A3(h) (agonist radioligand) with 57.7%<br>M1(h) (antagonist radioligand) with 57.8%<br>M2 (h) (antagonist radioligand) with 56.2%<br>PDE6 (non-selective) with 74.6% | No | 100021444（参考資料） |
| *Cardiovascular system* | | | | | | | |
| Kv11.1 (hERG) channel function | HEK293 cells | In vitro | 0, 0.1, 1, 3 or 10 µM MSC2571109A (major human metabolite) | N.A.; n=3[a] | No inhibition of the hERG channel current up to 3 µM. An inhibition of the hERG channel current by 24.9 % was observed at 10 µM | Yes | RC10 |
| Function of various cardiac ion channels | Seven cell lines expressing the following cardiac ion channels:<br>hKCNQ1/hminK hKv1.5 hNav1.5 hHCN4 hKv4.3/hKChIP2hCav1.2 hKir2.1 | In vitro | 10 or 30 µM MSC2571109A<br>(major human metabolite) | N.A.; n=3[a] | MSC2571109A did not appear to inhibit any of the ion channels tested at either 10 µM or 30 µM. | No | MRS031115-1 |

A3(h): human A3-adenosine receptor; ;$dP/dt_{max}$: maximal rate of rise of (usually) left ventricular pressure; ECG: Electrocardiogram; F: female; Gab-1: Grb-2 associated binding protein 1; hERG: human ether-a-go-go-related gene; hKv1.5: Human cardiac ion channel voltage-gated potassium 1.5; hNav1.5: Human cardiac ion channel voltage-gated sodium 1.5; hHCN4: Human cardiac ion channel hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated potassium 4; hKv4.3/hKChIP2: Human cardiac ion channel voltage-gated potassium 4.3; hCav1.2: Human cardiac ion channel voltage-gated calcium 1.2; hKir2.1: Human cardiac ion channel inward-rectifying voltage-gated potassium 2.1; hKCNQ1: Human potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1; Kv11.1: (hERG) channel; HEK293 cells: Human embryonic kidney 293 cells; M: male; M1: Muscarinic 1; M3: Muscarinic 3; M1(h)/M2 (h): human muscarinic receptors; PDE6: phosphodiesterase 6..
a: Number of replicates.
b: Respiratory rate and rectal temperature were also measured in this study.

## 5. 薬力学的薬物相互作用試験

Test Article: tepotinib

テポチニブの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。