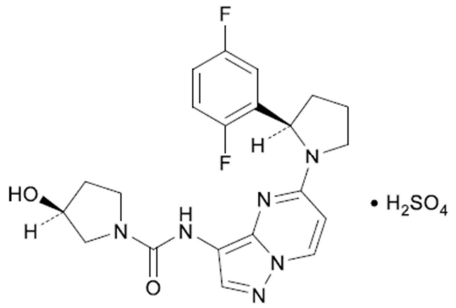
2.6.1 緒言

トロポミオシン受容体キナーゼ（TRK）A、TRKB 及び TRKC はニューロトロフィン（神経栄養因子）に結合するチロシンキナーゼのファミリーであり、神経系の形成及び機能に重要な成長因子のファミリーである。がんにおいて、TRKA、TRKB 及び TRKC タンパク質をそれぞれコードする *NTRK1*、*NTRK2* 及び *NTRK3* 遺伝子が他の遺伝子と融合することにより、キナーゼドメインが恒常的に活性化し、下流シグナル伝達経路の活性化が生じる。*NTRK* 融合遺伝子により、非臨床動物モデルにおいて発がん性を示すことが確認され、組織学的に多種多様な成人及び小児のがんに広範に分布していることが知られている。

ラロトレクチニブ（LOXO-101）は、TRKA、TRKB 及び TRKC に対して高度に選択的かつ強力な阻害薬であり、TRK 融合タンパク質を伴った進行固形がんを有する成人及び小児患者の経口治療薬として開発されている。

ラロトレクチニブは、経口投与に適した硫酸塩として開発されており、すべてのカプセル剤及び液剤の臨床用製剤には共に硫酸塩が含有されている。いずれの製剤も有効成分はラロトレクチニブ遊離塩基であることより、本 CTD の非臨床モジュールでは「ラロトレクチニブ」と表記し、特に必要な場合を除き硫酸塩と遊離塩基の区別は記載しない。なお、用量及び濃度については特に記載のない限り、遊離塩基（ラロトレクチニブ）換算で表示した。

理化学的性状に関する情報、申請効能・効果及び用法・用量を以下に記載する。

構造式	 キラル中心：2 つ
医薬品一般的名称（JAN）	ラロトレクチニブ硫酸塩
化学名	(3*S*)-*N*-{5-[(2*R*)-2-(2,5-Difluorophenyl)pyrrolidin-1-yl]pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-3-yl}-3-hydroxypyrrolidine-1-carboxamide monosulfate
分子式	$C_{21}H_{22}F_2N_6O_2 \cdot H_2SO_4$
国際一般名（INN）	Larotrectinib
分子量	526.51（硫酸塩）、428.44（遊離塩基）
申請効能・効果	*NTRK* 融合遺伝子陽性の局所進行又は遠隔転移を有する固形癌
申請用法・用量	通常、成人にはラロトレクチニブとして 1 回 100mg を 1 日 2 回経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。 通常、小児にはラロトレクチニブとして 1 回 100mg/m^2(体表面積)を 1 日 2 回経口投与する。ただし、投与量は 1 回 100mg を超えないこと。なお、患者の状態により適宜減量する。

NTRK 融合遺伝子陽性の進行・再発の固形がん治療薬としての開発及び承認申請を支持する一連の非臨床試験成績は 2.6.2 以降に詳細に示す。

ラロトレクチニブは、開発期間中は複数の化合物番号が使用された。化合物番号の一覧を表 2.6.1-1 に示す。また、非臨床のモジュールで使用した略語一覧を本項末に示す。

表 2.6.1-1　開発中に使用した化合物番号の一覧

Name used	Synonym	Meaning
Larotrectinib (INN, USAN)	LOXO-101, TKI, TK15, LX-01, ARRAY-470, and BAY 2731953	free base
Larotrectinib hydrogen sulfate	AR00457470 hydrogen sulfate and ARRY-470 hydrogen sulfate	hydrogen sulfate salt
Larotrectinib sulfate (USAN)	BAY 2757556	sulfate salt

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
AE	Adverse event	有害事象
ALK	Anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	Area under the (plasma) concentration-time curve	（血漿中）濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-12}	Area under the (plasma) concentration-time curve, from 0 to 12 hours	時間 0 から 12 時間までの（血漿中）濃度-時間曲線下面積
AUC_{12-24}	Area under the (plasma) concentration-time cure from 12 to 24 hours	12 時間から 24 時間までの（血漿中）濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the (plasma) concentration-time curve, from 0 to 24 hours	時間 0 から 24 時間までの（血漿中）濃度-時間曲線下面積
AUC_{inf} /AUC_{0-inf}	Area under the (plasma) concentration-time curve from 0 to infinity	時間 0 から無限時間までの（血漿中）濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor	脳由来神経栄養因子
BID	Twice daily (*bis in die*)	1 日 2 回
BSA	Body surface area	体表面積
BUN	Blood urea nitrogen	血中尿素窒素
CFA	Complete Freund's adjuvant	完全フロイントアジュバンド
CL	Clearance	クリアランス
CL/F	Apparent clearance	見かけのクリアランス
C_{max}	Maximum (plasma) concentration	最高（血漿中）濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CP	Cyclophosphamide monohydrate	シクロホスファミド一水和物
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液

略語	英語名称	日本語名称
%CV	% coefficient of variation	変動係数（%）
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
dL	Deciliter	デシリットル
DMBA	7,12-Dimethyl-benz(a)anthracene	7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	Dose range finding	用量設定
ECG	Electrocardiogram	心電図
EFD	Embryo fetal development	胚・胎児発生
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着検定法
F	Female	雌
FDA	Food and drug administration	米国食品医薬品局
FIB	Fibrinogen	フィブリノーゲン
FOB	Functional observational battery	機能観察総合評価
FRET	Fluorescence resonance energy transfer	蛍光共鳴エネルギー転移
GD	Gestation day	妊娠日齢
GIT	Gastrointestinal tract	消化管
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
GMP	Good manufacturing practice	医薬品の製造管理および品質管理に関する基準
hERG	Human ether-à-go-go related gene	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子）
HPBCD	Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin	ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IBAT	Interscapular brown adipose tissue	肩甲骨間褐色脂肪組織
IC_{50}	Concentration producing 50% inhibition effect	50%阻害濃度
ICH	The International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
Ig2	Second immunoglobulin domain	第2免疫グロブリンドメイン

略語	英語名称	日本語名称
INN	International nonproprietary name	国際一般名
IV	Intravenous	静脈内
K_D	Dissociation constant	解離定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析
LC/UV	Liquid chromatography/ultraviolet detection	液体クロマトグラフィー／紫外検出
LE	Long Evans	Long Evans
LLC-PK1	Epithelial cell line originally derived from porcine kidneys	ルイス肺癌ブタ腎尿細管上皮細胞株
LogD	Distribution coefficient between water and octanol	（任意の pH における）水-オクタノール分配係数
LTS	Long term stability	長期安定性
M	Male	雄
MAP	Mean arterial pressure	平均動脈血圧
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MCHC	Mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球血色素濃度
MCV	Mean corpuscular volume	平均赤血球容積
MDR1	Gene encoding the human p-glycoprotein transporter	ヒト P-糖タンパク（P-gp）発現遺伝子
mmHg	Millimeter of mercury	水銀柱ミリメートル
MMS	Methyl methanesulfonate	メチルメタンスルフォネート
MoE	Multiples of exposure	曝露量の倍数
MPCE	Micronucleated polychromatic erythrocytes	小核を持つ多染性赤血球
MPE	Mean photo effect	平均光作用
MRT	Mean residence time	平均滞留時間
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（還元型）
NGF	Nerve growth factor	神経成長因子
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect-level	無影響量
NT	Not tested	検査せず

略語	英語名称	日本語名称
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1, human (gene or mRNA)	神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体1型（遺伝子又はmRNA）
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2, human (gene or mRNA)	神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体2型（遺伝子又はmRNA）
NTRK3	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3, human (gene or mRNA)	神経栄養因子チロシンキナーゼ受容体3型（遺伝子又はmRNA）
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク
PCE	Polychromatic erythrocytes	多染性赤血球
PEG400	Polyethylene glycol, average molecular weight 400	ポリエチレングリコール400(平均分子量400)
PIC	Powder in capsule	カプセル充填粉末剤
PIF	Photoirritancy factor	光毒性係数
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
pKa	Acid dissociation constant	酸解離定数
PND	Post-natal day	生後日数
PO	Oral(*per os*)	経口
pro-ANP	pro-atrial natriuretic peptide	プロ心房性ナトリウム利尿ペプチド
pro-BNP	pro-brain natriuretic peptide	プロ脳性ナトリウム利尿ペプチド
PT	Prothrombin time	プロトロンビン時間
pTRK	Phosphorylated TRK	リン酸化トロポミオシン受容体キナーゼ
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失半減期
QC	Quality control	品質管理
QD	Once daily(*quaque die*)	1日1回
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RBC	Red blood cell	赤血球
SAP	Systemic arterial pressure	全身動脈圧
SAR	Structure activity relationship	構造活性相関
SD	Sprague-Dawley ; Standard deviation	Sprague-Dawley ; 標準偏差

略語	英語名称	日本語名称
SE/SEM	Standard error/Standard error of the mean	標準誤差
SOP	Standard operating procedures	標準操作手順書
STD_{10}	Severely toxic dose in 10% of animals	10%の動物で重篤な毒性が発現する投与量
TFT	Trifluorothymidine	トリフルオロチミジン
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T_{max}	Time to maximum (plasma) concentration	最高(血漿中)濃度到達時間
TNK2	Tyrosine kinase non receptor 2 (Tyrosine kinase also known as activated CDC42 kinase 1)	非受容体型チロシンキナーゼ 2(活性型 CDC42 キナーゼ 1 としても知られるチロシンキナーゼ)
TRKA	Tropomyosin receptor kinase A	トロポミオシン受容体キナーゼ A
TRKB	Tropomyosin receptor kinase B	トロポミオシン受容体キナーゼ B
TRKC	Tropomyosin receptor kinase C	トロポミオシン受容体キナーゼ C
USAN	United states adopted names	米国一般名
UVR	Ultraviolet radiation	紫外線放射
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
V_z/F	Apparent volume of distribution	見かけの分布容積
WBC	White blood cell	白血球

2.6.2　薬理試験の概要文の目次

2.6.2.1　まとめ..... 3
2.6.2.2　効力を裏付ける試験..... 6
2.6.2.2.1　*In vitro* 試験 6
2.6.2.2.1.1　TRKA、TRKB 及び TRKC に対する結合親和性..... 6
2.6.2.2.1.2　TRKA に対する結合親和性（表面プラズモン共鳴法）..... 6
2.6.2.2.1.3　細胞系アッセイ 7
2.6.2.2.1.3.1　TRKA、TRKB、TRKC 及び恒常的活性型 TRKA 導入細胞..... 7
2.6.2.2.1.3.2　TRKA 融合タンパク質を有する細胞..... 8
2.6.2.2.1.3.3　TRKB 又は TRKC 融合タンパク質を有する細胞..... 11
2.6.2.2.1.3.4　*NTRK* 融合遺伝子を有さない細胞..... 12
2.6.2.2.1.3.5　種々のがん細胞株 12
2.6.2.2.2　*In vivo* 試験 13
2.6.2.2.2.1　リン酸化阻害作用 13
2.6.2.2.2.2　腫瘍増殖抑制作用 14
2.6.2.2.2.2.1　ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデル（予備試験） 14
2.6.2.2.2.2.2　ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデル（用量反応性） 15
2.6.2.2.2.2.3　TRKA 又は TRKC 融合タンパク質発現細胞異種移植マウスモデル 17
2.6.2.2.2.3　生存延長作用 19
2.6.2.2.2.3.1　TRKB 過剰発現細胞株 Sh-SY5Y 異種移植マウスモデル..... 19
2.6.2.3　副次的薬理試験..... 20
2.6.2.3.1　*In vitro* 試験 20
2.6.2.3.1.1　種々のキナーゼに対する作用 20
2.6.2.3.1.2　その他の受容体及び酵素に対する作用 20
2.6.2.3.2　*In vivo* 試験 21
2.6.2.3.2.1　正常感覚機能に対する作用 21
2.6.2.3.2.2　炎症性疼痛モデルに対する作用 21
2.6.2.3.2.3　切開性疼痛モデルに対する作用 21
2.6.2.3.2.4　UV 誘発性疼痛モデルに対する作用..... 21
2.6.2.3.2.5　神経障害性疼痛モデルに対する作用 21
2.6.2.3.2.6　発症途中及び確立後のコラーゲン誘発関節炎モデルに対する作用 22
2.6.2.3.2.7　骨折痛モデルに対する作用 22
2.6.2.3.2.8　骨腫瘍痛モデルに対する作用 22
2.6.2.3.2.9　アトピー性皮膚炎モデルに対する作用 23

2.6.2.4　安全性薬理試験..... 24
2.6.2.4.1　中枢神経系..... 24
2.6.2.4.1.1　Irwin 試験 24
2.6.2.4.1.2　ロータロッド試験..... 25
2.6.2.4.1.3　神経行動学的活性に及ぼす影響..... 26
2.6.2.4.1.3.1　ラット..... 26
2.6.2.4.1.3.2　幼若ラット..... 26
2.6.2.4.1.3.3　サル..... 31
2.6.2.4.2　心血管系..... 32
2.6.2.4.2.1　*In vitro* 試験..... 32
2.6.2.4.2.1.1　hERG カリウムチャネル..... 32
2.6.2.4.2.2　*In vivo* 試験..... 33
2.6.2.4.2.2.1　ラット..... 33
2.6.2.4.2.2.2　イヌ..... 33
2.6.2.4.2.2.3　サル..... 34
2.6.2.4.3　呼吸器系..... 40
2.6.2.4.3.1　ラット..... 40
2.6.2.4.3.2　サル..... 40
2.6.2.4.4　胃腸管系..... 41
2.6.2.4.4.1　腸管輸送能に対する影響..... 41
2.6.2.4.4.2　胃に対する刺激作用..... 42
2.6.2.4.4.3　胃酸分泌に対する影響..... 42
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験..... 43
2.6.2.6　考察及び結論..... 44
2.6.2.7　図表..... 51
2.6.2.8　参考文献一覧..... 52

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

ラロトレクチニブ（LOXO-101）は、トロポミオシン受容体キナーゼ〔ヒトトロポミオシン受容体キナーゼ A（TRKA）、ヒトトロポミオシン受容体キナーゼ B（TRKB）及びヒトトロポミオシン受容体キナーゼ C（TRKC）〕に対して高い選択性を持つ強力な阻害薬である。

ラロトレクチニブは、経口投与に適した硫酸塩として開発されており、すべてのカプセル剤及び液剤の臨床用製剤には共に硫酸塩が含有されている。薬理試験では遊離塩基（ラロトレクチニブ）及び硫酸塩の両方が用いられ、用量及び濃度はそれぞれ遊離塩基の量及び濃度で表示した。

TRKA、TRKB 及び TRKC 膜貫通型受容体はそれぞれ *NTRK1*、*NTRK2* 及び *NTRK3* 遺伝子にコードされている[1)]。各受容体はニューロトロフィン（リガンド）により活性化される。すなわち、TRKA は神経成長因子（NGF）、TRKB は脳由来神経栄養因子（BDNF）及びニューロトロフィン-4/5（NT-4/5）、TRKC はニューロトロフィン-3（NT-3）によってそれぞれ活性化される。リガンド結合がトリガーになって受容体はオリゴマーを形成し、細胞内キナーゼドメイン内の特異的チロシン残基がリン酸化される。チロシンリン酸化によりシグナル伝達経路が活性化し、正常及び腫瘍細胞の増殖、分化及び生存が促進される。NGF の TRKA 受容体への結合によりラット肉腫（RAS）/マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）が活性化されると、細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）を介して細胞の増殖や成長を促進する。更に、ホスホリパーゼ C（PLC）-γ及びホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ（PI3K）経路などの他のシグナル伝達経路も活性化される。NT-3 の TRKC 受容体への結合により、PI3/v-akt マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ（AKT）経路が選択的に活性化されると、アポトーシスが抑制され、細胞の生存が促進される。一方、TRKB 受容体は RAS-ERK、PI3K 及び PLCγ経路を介して BDNF のシグナルを伝達し、神経の生存及び分化を誘導する。TRK は細胞の生存と同様に中枢神経系及び末梢神経系の発達において重要な役割を有する。TRK の発現レベル及び活性化の適切な調節は細胞の機能において重要であり、TRK 発現レベルの上昇が複数の中枢神経系関連疾患（例えば、てんかん、神経障害性疼痛及びうつにおける TRKB の発現）で報告されている[1)]。

NTRK に関わる遺伝子変異は融合であり、発がん性及び形質転換の可能性を持つことが知られている。*NTRK* 遺伝子融合は、染色体内又は染色体間の再構成によりキナーゼドメインの 3'末端領域と融合パートナー遺伝子の 5'末端配列が並列することで引き起こされる。その結果生じた融合タンパク質は異常に発現し、キナーゼドメインが恒常的に活性化することにより発がん性の下流シグナル伝達経路が活性化する[2)]。

本項で述べるラロトレクチニブ（図 2.6.2.1- 1）の薬理学的プロファイルについて、TRK 受容体及び臨床的に関連する既存の *NTRK1* 遺伝子融合タンパク質との相互作用、並びに動物モデルにおける効果を以下に要約した。ラロトレクチニブを用いた試験の多くは TRKA に関するものであるが、ラロトレクチニブは TRK ファミリー全体に対し活性を示すことから、*NTRK1* に加えて *NTRK2* 及び *NTRK3* の発がん性遺伝子変異を有するがん患者に対しても効果を発揮することが期待される。

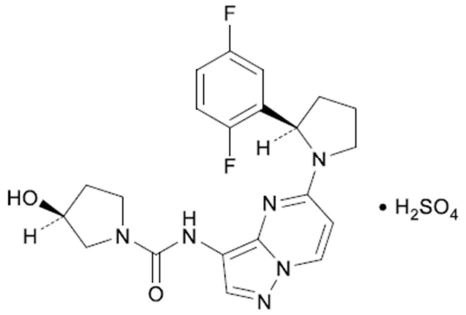


図 2.6.2.1- 1　ラロトレクチニブ硫酸塩の化学構造

ラロトレクチニブは *in vitro* において、ヒト TRKA 受容体に対し 11.5nM（IC_{50}値）の結合親和性を示した。細胞系アッセイにおいて、ラロトレクチニブは TRKA のリン酸化及び恒常的活性型 TRKA の自己リン酸化をそれぞれ 9.8 及び 6.4nM の IC_{50}値で阻害した。ラロトレクチニブは臨床的に関連性のある *NTRK1* 遺伝子融合タンパク質を導入した細胞株の TRKA リン酸化を減少させ、細胞増殖を抑制した。ラロトレクチニブは TRK ファミリーのキナーゼに対する特異的な阻害薬であることから、恒常的活性型 TRKA を発現していない腫瘍細胞株に対しては増殖抑制作用を示さなかった。*NTRK* 融合遺伝子を有する腫瘍細胞株（TRKA 又は TRKC 融合タンパク質の発現細胞）をマウスに異種移植したモデルにおいて、ラロトレクチニブは腫瘍増殖を顕著に抑制した。

ラロトレクチニブは tyrosine kinase non receptor 2（TNK2)に対し弱い阻害作用を示したが（IC_{50}＝1188nM）、そのほかの 226 種類のキナーゼに対しては 1000nM まで阻害作用を示さなかった。また、80 種類の受容体、酵素及び核内ターゲット分子などに対する広範なスクリーニングを実施した結果、ラロトレクチニブは臨床的及び毒性学的に関連する濃度でこれらのターゲット分子に対し相互作用を示さなかった。

マウス及びラットを用いた種々の疼痛モデルにおいて、ラロトレクチニブの作用を検討した結果、痛覚過敏及び侵害受容に対する抑制作用を示した。

安全性薬理試験は ICHS7A 及び S7B ガイドラインに従い、生命維持に重要な器官系（心電図を含む心血管系、中枢神経系、呼吸器系）及び胃腸管系に及ぼす影響を検討した。また、ラット及びサルの反復投与毒性試験に、心血管系、呼吸器系及び中枢神経系の安全性薬理エンドポイントを含めた。試験は *in vitro* 及び *in vivo*（マウス、ラット、イヌ及びサル）で実施した。

ラロトレクチニブはラット及びマウスの中枢神経系に対し重大な有害作用を示さなかった。ラロトレクチニブを成熟ラットに単回（最高 100mg/kg）及び反復経口投与（4 及び 13 週間、最高 100mg/kg を 1 日 2 回）した結果、神経行動学的に問題となる所見はみられなかった〔単回投与後の最高血漿中濃度（C_{max}）はヒトに臨床推奨用量（100mg を 1 日 2 回）投与後の C_{max}に比し最大 8 倍に相当〕。しかし、幼若ラットにおいて、ラロトレクチニブを最高用量 22.5mg/kg まで 1 日 2 回反復経口投与した結果、眼瞼下垂及び後肢の握力低下のような軽度な変化がみられた。ラロトレクチニブを 100mg/kg の用量で成熟ラットに 1 日 2 回 42 日間反復経口投与した結果、神経筋機能（ロータロッド試験）の低下傾向がみられたが、30mg/kg の用量で成熟マウスに 1 日 2 回 48 日間反復経口投与した試験では、ロータロッド試験の成績に影響はみられなかった。また、サルの 4 週間反復経口投与毒性試験において、最高 100mg/kg まで神経行動学的観察にラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった（ヒトに臨床推奨用量投与後の C_{max} に比し最大 7 倍に相当）。

ラロトレクチニブの血行動態及び心臓の電気生理学的パラメータに対する影響について、*in vitro* での hERG 試験、並びにテレメーター装着ラット、イヌ、サル及び反復投与後のテレメーター非装着サルを用いて評価した。ラットを用いた試験（最高用量 300mg/kg）、及びテレメーター装着サルを用いた試験（最高用量 100mg/kg：ヒトに臨床推奨用量投与後の C_{max} に比し最大 6 倍に相当）において、心血管系に対する問題となる影響はみられなかった。また、麻酔イヌにおいて、心血行動態パラメータに臨床的に問題となる変化はみられなかった。しかし、ラロトレクチニブを 200mg/kg の用量で、3 例のテレメーター装着サルに投与した試験において、全例に嘔吐がみられ、1 例に 45%を超える拡張期血圧の低下がみられた。このサルにおける C_{max} はヒトに臨床推奨用量投与後の C_{max} の 18 倍に相当した。ラロトレクチニブを 10、30 及び 100mg/kg の用量でサルに 4 週間反復経口投与した毒性試験において、いずれの用量でも 2 日目の投与後 2 時間で動脈血圧（拡張期及び収縮期血圧）の軽度の低下がみられた（ヒトに臨床推奨用量投与後の C_{max} に比し最大 31 倍に相当）。しかし、この血圧低下は投与期間の後期（14 及び 23 日目）には観察されなかった。

ヒトにおける QT 間隔延長リスクを検討した試験において、ラロトレクチニブは hERG カリウム電流を 147μM の IC_{50} 値で阻害したが、これはヒトに臨床推奨用量投与後の非結合型 C_{max}（$C_{max,u}$ ＝0.64μM）の 230 倍高濃度であった。心電図を検討したすべての心血管系試験及びサルの 4 週間反復経口投与毒性試験（10、30 及び 100mg/kg：ヒトに臨床推奨用量投与後の C_{max} に比し最大 31 倍に相当）において、心電図パラメータ（PR、QRS 及び QT/QT_C 間隔）に影響はみられなかった。

ラットの単回経口投与試験、及びサルの 13 週間反復経口投与試験において、ラロトレクチニブは最高用量 100mg/kg まで呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

ラロトレクチニブはラットの腸管輸送を促進させ、胃液分泌及び酸性度を高めた。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro*試験

2.6.2.2.1.1 TRKA、TRKB 及び TRKC に対する結合親和性

参照項目： 4.2.1.1.1 LOXO-101-PHARM-001

ラロトレクチニブのヒト TRKA、TRKB 及び TRKC タンパク質に対する結合親和性を LanthaScreen™ Eu Kinase Binding の手法（Invitrogen）を用いて測定した。すなわち、ヒスチジンのタグをつけた組換え型ヒト TRKA、TRKB 及び TRKC キナーゼドメイン（それぞれ 5、10 及び 5nM）を被験物質、蛍光発生トレーサー〔Alexa-Fluor® Tracer 236（PR9078A）〕、並びにビオチン化抗ヒスチジン抗体及びユーロピウム標識ストレプトアビジン（TRK キナーゼドメインと近接する位置にユーロピウム原子を配置する目的で使用）と共に 22℃で 60 分間インキュベーションした。TRK キナーゼドメインの ATP 結合部位に蛍光発生トレーサーが結合することにより、蛍光発生トレーサーとユーロピウムが近接して蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）シグナルが発生し、その FRET シグナルを PerkinElmer マルチモードプレートリーダーで測定した。ラロトレクチニブを添加すると、キナーゼドメインの ATP 結合部位においてラロトレクチニブが蛍光発生トレーサーと置き換わることにより FRET シグナルは低下した。本試験において、ラロトレクチニブは TRKA、TRKB 及び TRKC に対してそれぞれ 11.5、5.3 及び 6.4nM（IC_{50} 値）の結合親和性を示した（表 2.6.2.2- 1）。

表 2.6.2.2- 1 TRKA、TRKB 及び TRKC に対する *in vitro* での結合親和性

Kinase Enzyme	IC_{50} (nM)	n
TRKA	11.5 ± 7.0	71
TRKB	5.3 ± 2.6	72
TRKC	6.4 ± 3.6	67

Values are mean ± SD

2.6.2.2.1.2 TRKA に対する結合親和性（表面プラズモン共鳴法）

参照項目： 4.2.1.1.1 LOXO-101-PHARM-001

ラロトレクチニブの TRKA に対する結合親和性を、Biacore S51 表面プラズモン共鳴装置を用いた反応速度試験で検討した。まず、バキュロウイルス発現系を用いて、N 末端にヒスチジンのタグ及び C 末端にビオチン化タグ（Avidity Inc.）を有する TRKA キナーゼドメインタンパク質を作製した。当該タンパク質を精製し、一部は ATP 及びマグネシウムとインキュベーションして自己リン酸化させ、このリン酸化体及び非リン酸化体をストレプトアビジン親和性チップ上に吸着させた。次に、ラロトレクチニブを添加し両タンパク質上で 60 秒間反応させ（結合相）、その後 30 分間放置した（解離相）。得られたデータは 1：1 の結合モデルに適合し、解離定数（K_D）はリン酸化型 TRKA に対して 0.28nM、非リン酸化型 TRKA に対して 4.7nM であった（表 2.6.2.2-2）。したがって、ラロトレクチニブのリン酸化型 TRKA に対する解離速度は相対的に遅いことが示された。

表 2.6.2.2- 2 TRKA に対する結合及び解離速度定数

Form	k_a (M^{-1} s^{-1})	k_d (s^{-1})	Off-rate half-life (min)	K_D (nM)
Phosphorylated TRKA	260 x 10^3	0.072 x 10^{-3}	160.45	0.278
Non-phosphorylated TRKA	54 x 10^3	0.254 x 10^{-3}	45.48	4.70

2.6.2.2.1.3 細胞系アッセイ

2.6.2.2.1.3.1 TRKA、TRKB、TRKC 及び恒常的活性型 TRKA 導入細胞

参照項目： 4.2.1.1.2 LOXO-101-PHARM-002
4.2.1.1.12 PH-41270

チャイニーズハムスター卵巣（CHO-K1）細胞に、ヒト *NTRK1*（TRKA）、*NTRK2*（TRKB）又は *NTRK3*（TRKC）遺伝子を導入して 24 時間培養後、種々の濃度のラロトレクチニブを添加しそれぞれ NGF、BDNF 又は NT-3 により刺激した（それぞれ 7、7 又は 15 分間）。リン酸化タンパク質〔リン酸化（p）TRKA、pTRKB 及び pTRKC〕は酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）により定量化し、リン酸化の阻害作用はラロトレクチニブ非処置対照群に対する相対値で表した。ラロトレクチニブは、TRKA、TRKB 及び TRKC のリン酸化を阻害し、その IC_{50} 値はそれぞれ 9.8、25 及び 21.5nM であった（表 2.6.2.2- 3）。

また、第 2 免疫グロブリンドメイン（Ig2）を遺伝子欠損させたヒト *NTRK1* 遺伝子を安定的に NIH-3T3 細胞（マウス線維芽細胞株）に導入し、delta-Ig2-TRKA NIH-3T3 細胞株を樹立した。*NTRK1* の Ig2 細胞外ドメインの遺伝子欠損により生じた TRKA 受容体は、NGF 刺激に非依存的に恒常的に活性化し発癌性を持つ[3, 4, 5]。当該細胞株において、ラロトレクチニブは恒常的活性型 TRKA（ΔTRKA）の自己リン酸化を阻害し、その IC_{50} 値は 6.4nM であった（表 2.6.2.2- 3）。

表 2.6.2.2- 3 TRKA、TRKB 及び TRKC 並びに恒常的活性型 TRKA に対するリン酸化阻害作用

Kinase Enzyme	IC_{50} (nM)
TRKA	9.8
TRKB	25
TRKC	21.5
ΔTRKA (constitutively active)	6.4

Data source: LOXO-101-PHARM-002

アミノ酸配列データベース（UniProtKB）を用いた解析により、ヒト TRKA、TRKB 及び TRKC のキナーゼドメインのアミノ酸配列を 3 又は 4 動物種間で比較した結果、それぞれ 94.2～99.7%（マウス、ラット、ウサギ及びサル）、99.4～100.0%（マウス、ラット、ウサギ及びサル）及び 93.0～95.8%（マウス、ラット及びサル）の同一性を有することが確認された（PH-41270）。特に、これらのキナーゼドメインにおけるラロトレクチニブの結合部位のみで検討した場合、いずれの動物種の TRK タンパク質においてもアミノ酸配列は 100%保存されていることが確認された。したがって、ラロトレクチニブがヒト TRKA、TRKB 及び TRKC を阻害することが示されたように、マウス、ラット、ウサギ及びサルの TRKA、TRKB 及び TRKC に対しても同様な強度で阻害することが示唆される。

更に、X 線結晶構造解析により明らかとなった、ヒト TRKA とラロトレクチニブの複合体の結晶構造について、典型的なタンパク質キナーゼであるプロテインキナーゼ A と ATP との共結晶の

構造と比較した結果、ラロトレクチニブが TRKA の ATP 結合部位と結合することが確認された（PH-41270）。

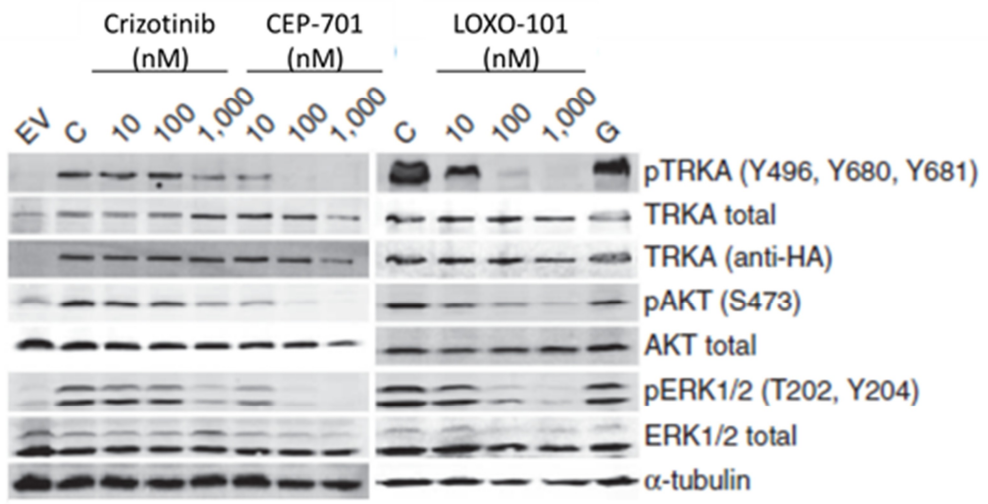
2.6.2.2.1.3.2　TRKA 融合タンパク質を有する細胞

2.6.2.2.1.3.2.1　*NTRK1* 融合遺伝子導入細胞における TRKA、AKT 及び ERK リン酸化阻害作用

参照項目：4.2.1.1.3 Nat Med 2013-19-1469

Myosin phosphatase-Rho-interacting protein gene（*MPRIP*）-*NTRK1* は肺腺癌患者から発見されたインフレーム融合遺伝子である。その融合タンパク質 RIP-TRKA に対するラロトレクチニブの作用を検討した。*MPRIP-NTRK1*（RIP-TRKA）を導入した Ba/F3 細胞（マウス pro-B 細胞株）に、媒体（DMSO）、ラロトレクチニブ並びに対照としてクリゾチニブ〔ALK 阻害薬（IC_{50}＝3.6nM）[6] で TRKA に低親和性〕及び CEP-701〔lestaurtinib、TRKA 阻害薬（IC_{50}＝4nM）[7]〕を添加しインキュベーションした。5 時間後に細胞を溶解し、TRKA（Y496、Y680 及び Y681）、並びにその下流のシグナル伝達分子 ERK（T202 及び Y204）及び AKT（S473）のリン酸化体について特異的抗体を用いたイムノブロット法で評価した。

ラロトレクチニブは検討したすべての濃度（10、100 及び 1000nM）で RIP-TRKA、AKT 及び ERK のリン酸化を阻害した（図 2.6.2.2- 1）。肺腺癌患者から発見された別のインフレーム融合遺伝子 *CD74-NTRK1* を導入した Ba/F3 細胞、及び *MPRIP-NTRK1* 遺伝子を導入した NIH-3T3 細胞を用いた同様の試験においても、ラロトレクチニブ処理により pTRKA は減少した。これらの試験成績から、ラロトレクチニブは TRKA 融合タンパク質の恒常的な活性を抑制することが示された。



LOXO-101: Larotrectinib, EV refers to empty vector, C refers to control, G refers to gefitinib (1000nM)

図 2.6.2.2- 1　*NTRK1* 融合遺伝子導入 Ba/F3 細胞における TRKA、AKT 及び ERK リン酸化阻害作用

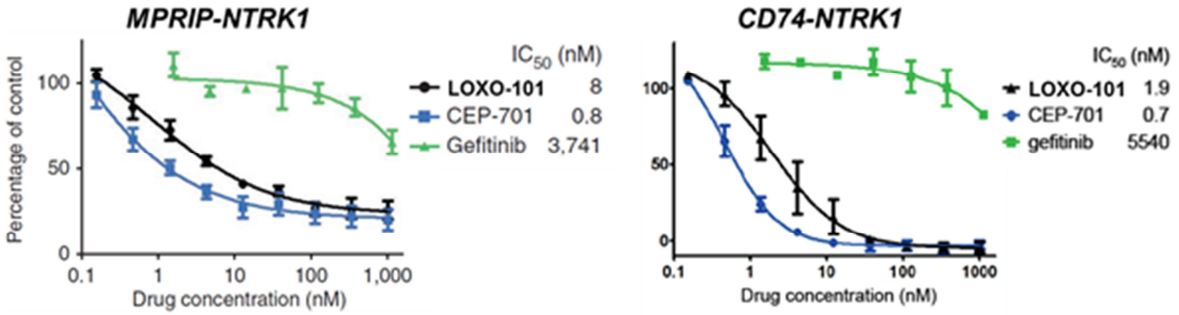
2.6.2.2.1.3.2.2　*NTRK1* 融合遺伝子導入細胞における増殖抑制作用

参照項目：4.2.1.1.3 Nat Med 2013-19-1469

MPRIP-NTRK1（RIP-TRKA）又は *CD74-NTRK1*（CD74-TRKA）融合遺伝子を導入した Ba/F3 細胞に、種々の濃度のラロトレクチニブ、並びに対照薬として CEP-701 及びゲフィチニブを添加しインキュベーションした。72 時間後、増殖の指標として細胞の代謝活性をフェナジンメトサル

フェート存在下で 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium（MTS）の還元により生じるホルマザン生成物を 490nm で比色定量することにより測定した。

ラロトレクチニブは 2 種の融合遺伝子 *MPRIP-NTRK1* 又は *CD74-NTRK1* を導入した Ba/F3 細胞の増殖をいずれも抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ 8 及び 1.9nM であった（図 2.6.2.2- 2）。



LOXO-101: Larotrectinib, Values are mean ± standard error, n = 5

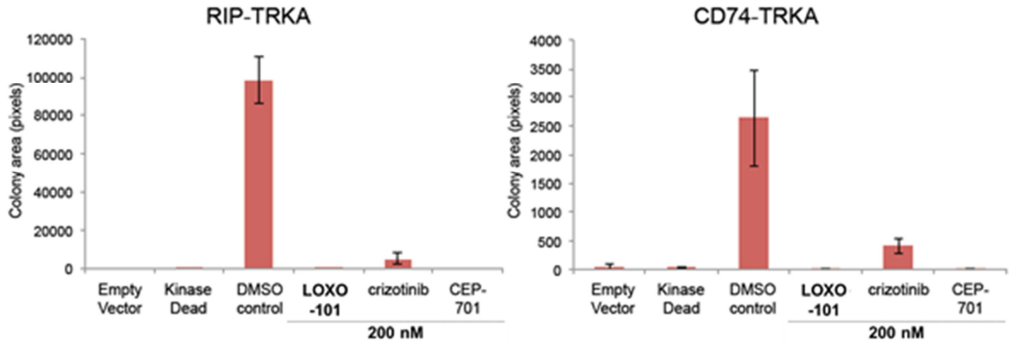
図 2.6.2.2- 2　*NTRK1* 融合遺伝子導入 Ba/F3 細胞における増殖抑制作用

2.6.2.2.1.3.2.3　*NTRK1* 融合遺伝子導入細胞における足場非依存性増殖に対する抑制作用

参照項目：4.2.1.1.3 Nat Med 2013-19-1469

MPRIP-NTRK1（RIP-TRKA）又は *CD74-NTRK1*（CD74-TRKA）融合遺伝子を導入した NIH-3T3 細胞を 6 ウェルプレート内の軟寒天培地で培養し、ラロトレクチニブの足場非依存性増殖に対する作用を検討した。培地は 4 日ごとに交換し 2 週間培養した後、MetaMorph ソフトウェアを用いてコロニーの総面積を測定した。

いずれの融合遺伝子導入 NIH-3T3 細胞においても、足場非依存性増殖がみられた。一方、空ベクター又は不活性キナーゼを導入した細胞では増殖はみられなかった。ラロトレクチニブは検討した 200nM で、コロニーの総面積を空ベクター又は不活性キナーゼ導入細胞のレベルにまで低下させ、コロニー形成を完全に抑制した（図 2.6.2.2- 3）。



LOXO-101: Larotrectinib, Values are mean ± standard error, n = 4 for RIP-TRKA and n = 2 for CD74-TRKA

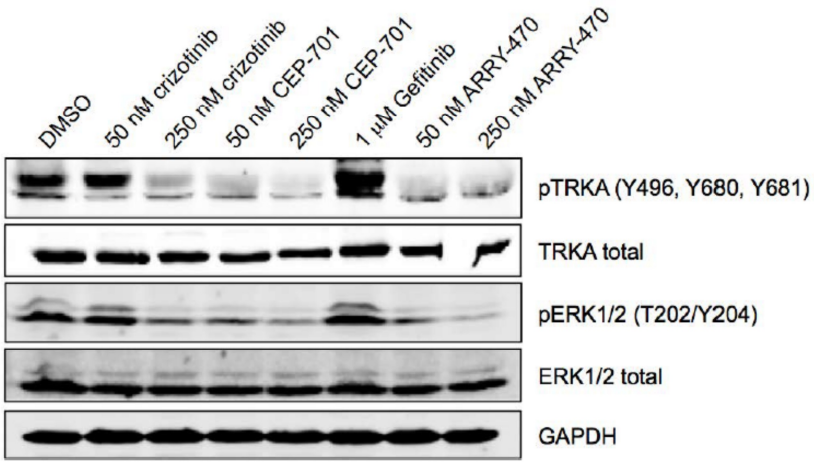
図 2.6.2.2- 3　*NTRK1* 融合遺伝子導入 NIH-3T3 細胞のコロニー形成に対する抑制作用

2.6.2.2.1.3.2.4　*NTRK1* 融合遺伝子発現細胞における TRKA 及び ERK リン酸化阻害作用及び増殖抑制作用

参照項目：4.2.1.1.3 Nat Med 2013-19-1469

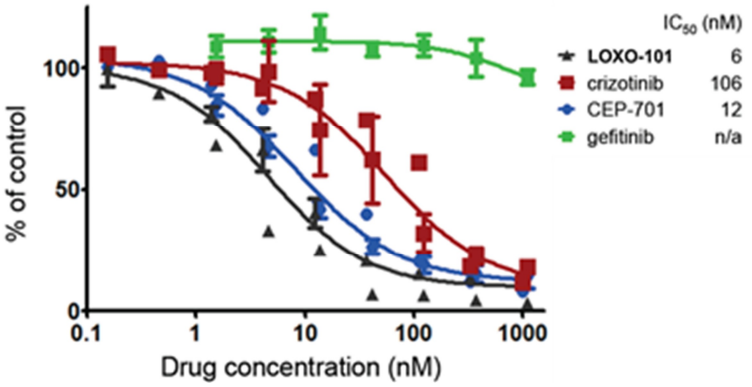
大腸癌細胞株 KM12 はトロポミオシン 3（*TPM3*）と *NTRK1* との融合遺伝子 *TPM3-NTRK1* を発現している[8)]。KM12 細胞の TRKA を介するシグナル伝達系に対するラロトレクチニブの作用を検討するため、KM12 細胞における TRKA 及び ERK のリン酸化体をイムノブロット法（2.6.2.2.1.3.2.1）により評価した。また、KM12 細胞の増殖を 2.6.2.2.1.3.2.2 に記載した方法（MTS 法）で測定した。

KM12 細胞を 50nM のラロトレクチニブで処理すると、pTRKA 及び pERK は減少し、TRKA の活性化及び pERK を介した下流のシグナル伝達が抑制されることが示された（図 2.6.2.2- 4）。また、ラロトレクチニブは KM12 細胞の増殖を抑制し、その IC_{50} 値は 6nM であった（図 2.6.2.2- 5）。これらの試験成績から、ラロトレクチニブは *TPM3-NTRK1* 融合遺伝子を発現する癌細胞株の増殖に対し、*MPRIP-NTRK1* 又は *CD74-NTRK1* 融合遺伝子導入細胞と同様に強力な抑制作用を示すことが確認された。



ARRY-470: Larotrectinib

図 2.6.2.2- 4　*NTRK1* 融合遺伝子発現細胞株 KM12 における TRKA 及び ERK リン酸化阻害作用



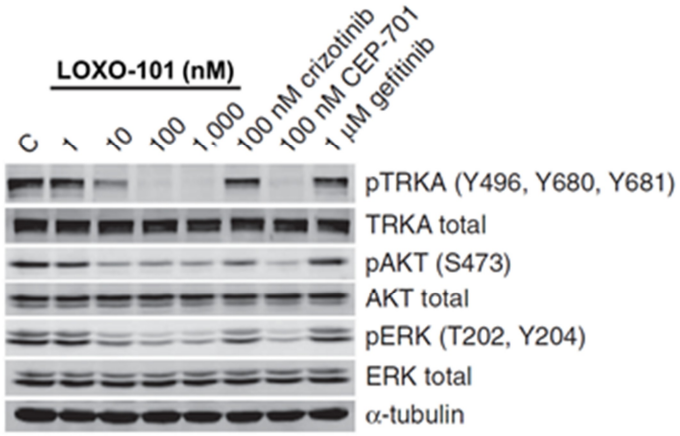
LOXO-101: Larotrectinib, Values are mean ± standard error, n = 5

図 2.6.2.2- 5　*NTRK1* 融合遺伝子発現細胞株 KM12 における増殖抑制作用

2.6.2.2.1.3.2.5 *NTRK1* 融合遺伝子発現細胞における TRKA、AKT 及び ERK リン酸化阻害作用

参照項目：4.2.1.1.3 Nat Med 2013-19-1469

肺腺癌患者の胸膜浸出液検体から RIP-TRKA（*MPRIP-NTRK1* 遺伝子がコードするタンパク質）が同定され、この検体から癌細胞株（CUTO-3）を樹立し、RIP-TRKA 及び *MPRIP-NTRK1* 融合遺伝子が当該細胞株から確認された。当該細胞株にラロトレクチニブ（1、10、100 及び 1000nM）を添加しインキュベーションし、特異的抗体を用いたイムノブロット法により（2.6.2.2.1.3.2.1）、pTRKA、pAKT 及び pERK レベルを検討した結果、ラロトレクチニブはいずれのリン酸化も減少させた（図 2.6.2.2- 6）。



LOXO-101: Larotrectinib, C = vehicle control

図 2.6.2.2- 6　*NTRK1* 融合遺伝子発現細胞株 CUTO-3 における TRKA、AKT 及び ERK のリン酸化阻害作用

2.6.2.2.1.3.3　TRKB 又は TRKC 融合タンパク質を有する細胞

2.6.2.2.1.3.3.1　*NTRK2* 融合遺伝子導入細胞における増殖抑制作用

参照項目： 4.2.1.1.4 LOXO-101-PHARM-029

公表されている再構成情報を基に合成した *TRIM24-NTRK2* 融合遺伝子（TRKB 融合タンパク質）の完全コード配列を、レンチウイルス形質導入法により導入した Ba/F3 細胞に、種々の濃度のラロトレクチニブを添加しインキュベーションした。72 時間後、MTS 法（2.6.2.2.1.3.2.2）により細胞増殖を測定した。ラロトレクチニブは *TRIM24-NTRK2* 融合遺伝子導入 Ba/F3 細胞の増殖を 35.6nM の IC_{50} 値で抑制した（n＝3）。しかし、同様に、*EGFR*、*ALK* 又は *ROS1* 癌遺伝子を有する Ba/F3 細胞の増殖を測定した結果（n＝3）、ラロトレクチニブは最高 1000nM までこれらの細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2.1.3.3.2　*NTRK1* 又は *NTRK3* 融合遺伝子発現細胞における増殖抑制作用

参照項目： 4.2.1.1.4 LOXO-101-PHARM-029

NTRK1 又は *NTRK3* 融合遺伝子（TRKA 又は TRKC 融合タンパク質）を発現する CUTO-3.29（肺腺癌細胞株）、KM12 及び MO-91〔急性骨髄性白血病（AML）細胞株〕細胞の増殖について、MTS 法

（2.6.2.2.1.3.2.2）により検討した結果、ラロトレクチニブはいずれの細胞に対しても増殖抑制作用を示した（表 2.6.2.2- 4）。

表 2.6.2.2- 4 *NTRK1* 及び *NTRK3* 融合遺伝子発現細胞株の増殖抑制作用

Cell Line	TRK Fusion	IC_{50} (nM)
CUTO-3.29	*MPRIP-NTRK1*	59.4
KM12	*TPM3-NTRK1*	3.5
MO-91	*ETV6-NTRK3*	1.0

2.6.2.2.1.3.4 *NTRK* 融合遺伝子を有さない細胞

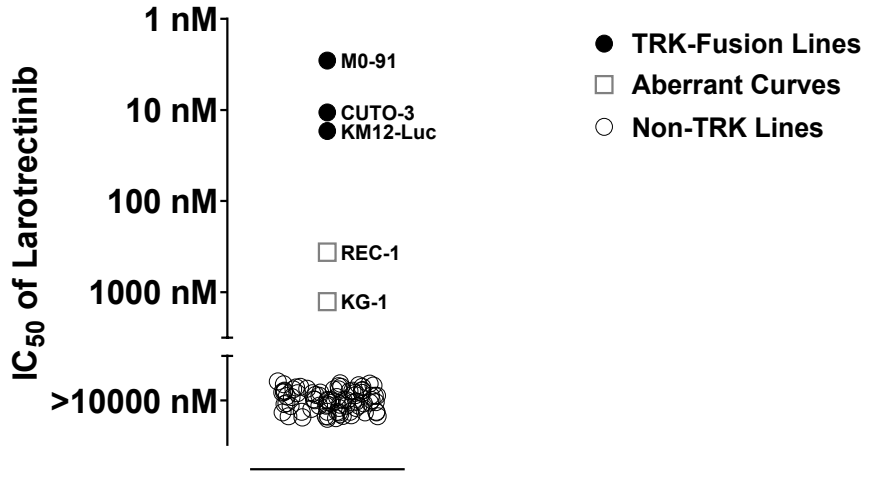
参照項目：4.2.1.1.3 Nat Med 2013-19-1469

ラロトレクチニブが TRK ファミリーキナーゼの特異的阻害薬であることを確認するため、*NTRK* 融合遺伝子を有さないと考えられる複数の細胞を用い、ラロトレクチニブの増殖に及ぼす影響を MTS 法（2.6.2.2.1.3.2.2）により検討した。*EGFR* エクソン 19 欠損、*EML4-ALK* 及び *SDC4-ROS1* の遺伝子変異を有し *NTRK* 融合遺伝子を有さない Ba/F3 細胞の増殖に対し、ラロトレクチニブは最高 1000nM まで影響を及ぼさなかった。同様に、*NTRK* 融合遺伝子を有さないことが知られている肺癌細胞株（H1299、A549、HCC78、H3122 及び H1650）、並びに大腸癌細胞株（HCT15、HCT116、HT29 及び SW837）の増殖に対しても影響を及ぼさなかった。これらの試験成績から、ラロトレクチニブの MAP キナーゼ経路阻害作用及び細胞増殖抑制作用は、TRK 関連の発癌性遺伝子変異を有する細胞に特異的であることが示唆される。

2.6.2.2.1.3.5 種々のがん細胞株

参照項目： 4.2.1.1.5 LOXO-101-PHARM-033

ラロトレクチニブを 87 種類のがん細胞株とインキュベーションし、蛍光色素を使用した核染色による方法を用いて、ラロトレクチニブの細胞増殖に及ぼす影響を検討した。ラロトレクチニブは TRK 融合タンパク質により誘導される細胞増殖に対してのみ強い阻害作用を示した（図 2.6.2.2- 7）。そのほかの TRK 融合タンパク質を発現していない細胞株の IC_{50} 値はいずれも 10000nM を超えた。



REC-1 and KG-1 IC_{50} values were considered artifactual due to lack of any concentration-response (relative cell count of 39% and 44% at 10000 nM, respectively)

図 2.6.2.2- 7 TRK 融合タンパク質を有する又は有さない種々のがん細胞株における増殖抑制作用

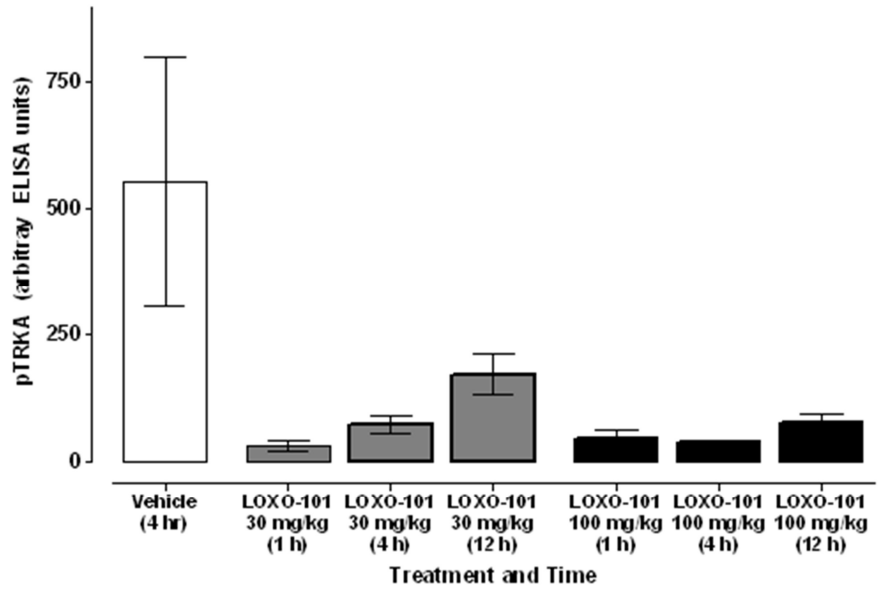
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験

2.6.2.2.2.1 リン酸化阻害作用

参照項目： 4.2.1.1.6 LOXO-101-PHARM-003

ΔTRKA 導入細胞（NIH-3T3）を 7～9 週齢の雌性ヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）の右側腹部皮下に移植し、平均腫瘍体積が各群で約 500mm^3 となるようにランダム化した。ラロトレクチニブを 30 及び 100mg/kg の用量で、あるいは媒体（Labrafac™ lipophile WL1349）を単回経口投与した。ラロトレクチニブ投与後 1、4 及び 12 時間において血液及び腫瘍検体を採取し、また媒体投与後 4 時間において腫瘍検体を採取した（各時点 3 例／投与群）。LC-MS を用いて血漿中のラロトレクチニブ濃度を、また ELISA 法を用いて腫瘍内の pTRKA をそれぞれ測定した。

ラロトレクチニブの 30 及び 100mg/kg 投与により、用量及び時間依存的なΔTRKA 腫瘍内の TRKA リン酸化の阻害作用がみられた（図 2.6.2.2- 8）。当該阻害作用は投与後 1 時間で最大となり、それ以後（4 及び 12 時間）は減少傾向がみられた。また、pTRKA 測定時の平均血漿中ラロトレクチニブ濃度は 31～6000ng/mL であり、リン酸化阻害作用と同様の用量及び時間依存性を示した。これらの試験成績から、ラロトレクチニブはΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおいて、TRKA 依存性腫瘍増殖の作用機序に関わる活性（TRKA のリン酸化）を阻害することが示された。



LOXO-1: Larotrectinib, Values are mean ± standard deviation, n = 2 or 3

図 2.6.2.2- 8 ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ経口投与後の腫瘍内 TRKA リン酸化の阻害作用

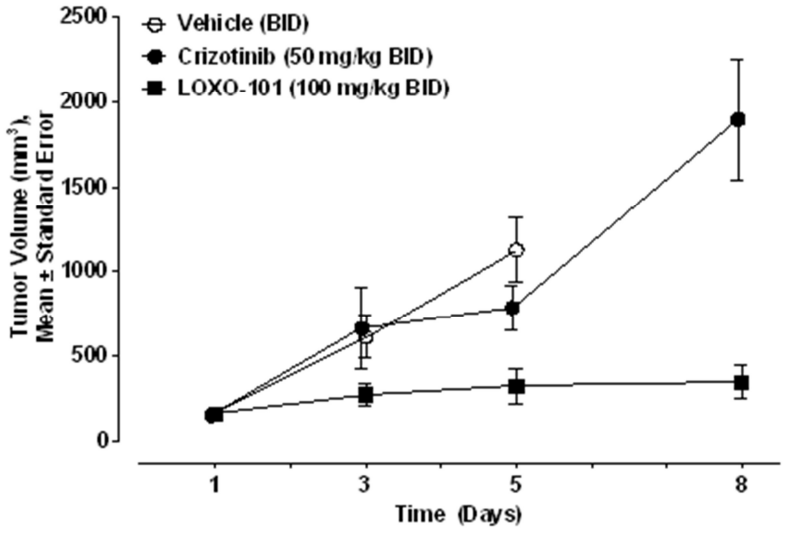
2.6.2.2.2.2 腫瘍増殖抑制作用

2.6.2.2.2.2.1 ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデル（予備試験）

参照項目： 4.2.1.1.7 LOXO-101-PHARM-022

ΔTRKA 導入細胞を雌性ヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）の右側腹部皮下に移植し、腫瘍の体積が約 150mm^3 となるまで増殖させた。腫瘍体積が各群で同程度となるように動物をランダム化し、ラロトレクチニブ〔100mg/kg、1 日 2 回：計 200mg/kg〕、クリゾチニブ（50mg/kg、1 日 2 回：計 100mg/kg）、又は媒体（Labrafac™ lipophile WL1349、1 日 2 回）を 8 日間反復経口投与した（各群 6 例）。被験薬投与後 1、3、5 及び 8 日に腫瘍体積を測定した。

ラロトレクチニブ投与群は媒体投与群に比べて腫瘍増殖を 83%抑制し、一方、クリゾチニブ投与群はわずかな抑制作用しか示さなかった（図 2.6.2.2- 9）。いずれの投与群においても平均体重減少は 5%未満であり、投薬に関連した死亡もみられなかった。これらの試験成績から、ラロトレクチニブはΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおける TRKA 依存性腫瘍の増殖を *in vivo* で抑制することが示された。



LOXO-101: Larotrectinib

図 2.6.2.2- 9 ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ又はクリゾチニブ経口投与後の腫瘍増殖抑制作用

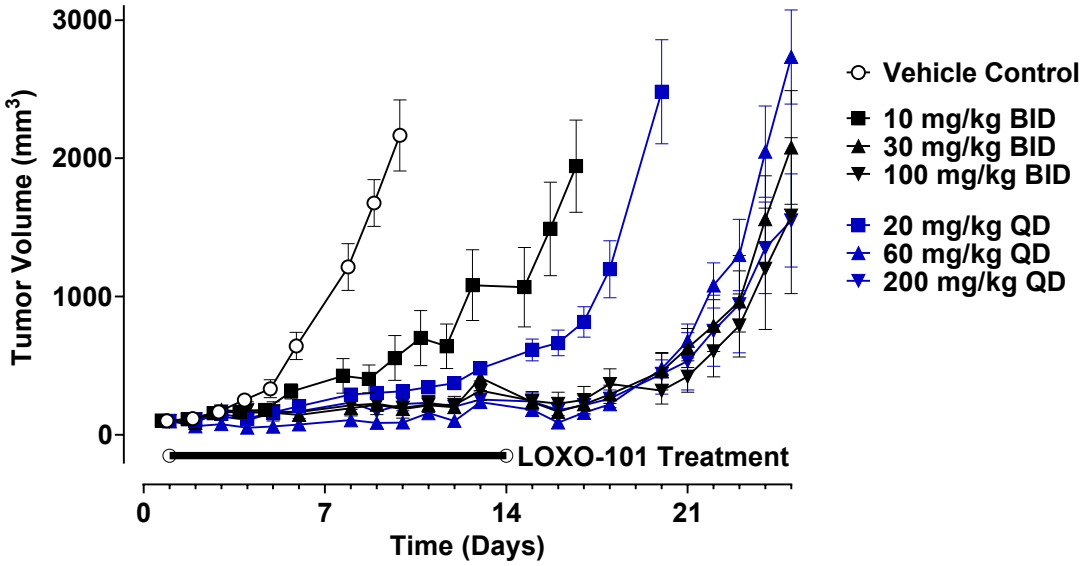
2.6.2.2.2.2.2 ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデル（用量反応性）

参照項目： 4.2.1.1.8 LOXO-101-PHARM-024
4.2.1.1.9 LOXO-101-PHARM-025

予備試験結果（2.6.2.2.2.2.1）を確認すると共に、更に検討を加えるため、複数の用量を用いて反復投与試験を実施した（LOXO-101-PHARM-024）。予備試験と同様に、ΔTRKA 導入細胞を雌性ヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）の右側腹部皮下に移植し、腫瘍の体積が約 100mm^3 となるまで増殖させた。その後、ラロトレクチニブ（10、30 及び 100mg/kg を 1 日 2 回、あるいは 20、60 及び 200mg/kg を 1 日 1 回）又は媒体（Labrafac™ lipophile WL1349、1 日 2 回）を 14 日間反復経口投与し、その後 11 日間の観察期間を通して腫瘍体積を測定した（各群 8 例）。

ラロトレクチニブ投与群では媒体投与群と比べて腫瘍増殖の用量依存的な抑制がみられた（図 2.6.2.2- 10）。いずれの投与群においても平均体重減少は 5%未満であり、投薬に関連した死亡もみられなかった。これらの試験成績から、前述の予備試験と同様に、ラロトレクチニブは ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルを用いた *in vivo* において、TRKA 依存性腫瘍の増殖を抑制することが確認された。

同様に、ΔTRKA 導入細胞を雌性ヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）に移植し、腫瘍の体積が平均 690mm^3 となるまで増殖させ、ラロトレクチニブ（10、20、60 及び 200mg/kg）又は媒体（Labrafac™ lipophile WL1349）を単回経口投与した（各群 3 又は 4 例）。2 時間後に採血及び腫瘍を摘出し、血漿中及び腫瘍内のラロトレクチニブ濃度を LC-MS/MS を用いて測定し、かつ腫瘍中の pTRKA 及び pERK をそれぞれ ELISA 法及びイムノブロット法により測定した（LOXO-101-PHARM-025）。ラロトレクチニブの血漿中及び腫瘍内濃度はそれぞれ 10～200mg/kg 及び 20～200mg/kg で用量依存的に上昇した（表 2.6.2.2- 5、図 2.6.2.2- 11）。ラロトレクチニブは 10～200mg/kg で用量依存的に pTRKA 及び pERK を減少させ（表 2.6.2.2- 5、図 2.6.2.2- 11）、これらの用量反応性は反復投与における腫瘍増殖抑制作用（図 2.6.2.2- 10）と一致していた。



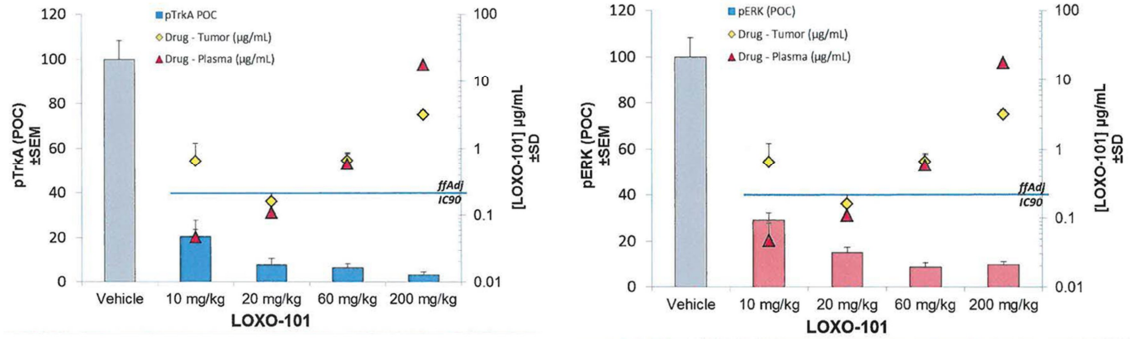
LOXO-101: Larotrectinib, Values are mean ± standard error
Data source: LOXO-101-PHARM-024

図 2.6.2.2- 10　ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用

表 2.6.2.2- 5　ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ単回経口投与後の腫瘍内 TRKA 及び ERK のリン酸化阻害作用、並びに血漿中及び腫瘍内ラロトレクチニブ濃度

		pTrkA (POC)	pERK (POC)	Drug-plasma (μg/mL)	Drug-Tumor (μg/mL)
Dose Group	**n**	**mean**	**mean**	**mean**	**mean**
Vehicle	4	100.0	100.0	-	-
10mg/kg	3	20.6	29.0	0.0476	0.647
20mg/kg	3	7.6	14.7	0.108	0.158
60mg/kg	3	6.2	8.5	0.576	0.653
200mg/kg	3	3.0	9.6	17.8	3.17

POC: Percent of control
Data source: LOXO-101-PHARM-025



LOXO-101: Larotrectinib, *ffadj* : free fraction adjusted IC90
Data source: LOXO-101-PHARM-025

図 2.6.2.2- 11　ΔTRKA 導入細胞移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ単回経口投与後の腫瘍内 TRKA 及び ERK のリン酸化阻害作用、並びに血漿中及び腫瘍内ラロトレクチニブ濃度

2.6.2.2.2.3　　TRKA 又は TRKC 融合タンパク質発現細胞異種移植マウスモデル

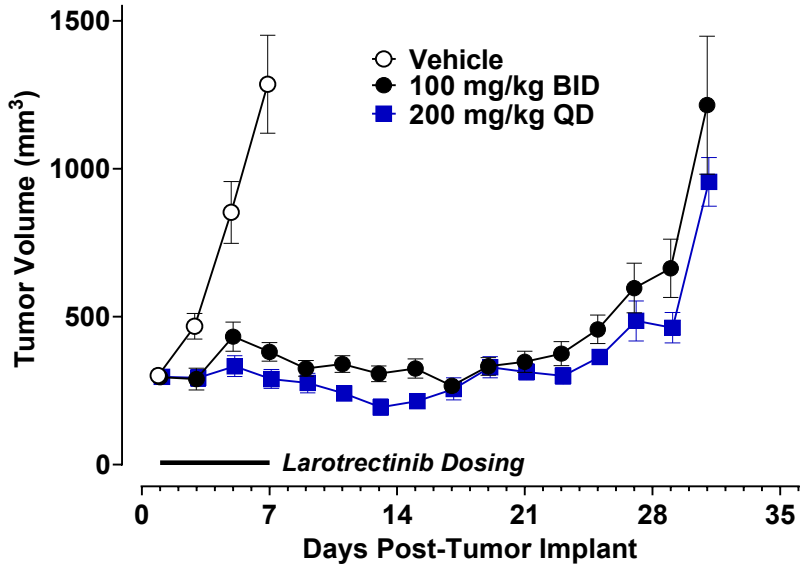
参照項目：　4.2.1.1.10 LOXO-101-PHARM-028
4.2.1.1.4　LOXO-101-PHARM-029

TRKA 融合タンパク質（*TPM3-NTRK1* 融合遺伝子）を発現する KM12 細胞におけるラロトレクチニブの効果を確認するため、当該細胞を雌性ヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）の右側腹部皮下に移植し、腫瘍の体積が約 300mm^3 となるまで増殖させた（LOXO-101-PHARM-028）。その後、ラロトレクチニブ（100mg/kg を 1 日 2 回、あるいは 200mg/kg を 1 日 1 回）又は媒体（Labrafac™ lipophile WL1349）を 7 日間反復経口投与した（各群 10 例）。腫瘍体積は投与期間中及び投与期間終了後から 24 日まで測定した。

ラロトレクチニブ投与群ではいずれも媒体投与群に比べて顕著な腫瘍増殖の抑制がみられた（図 2.6.2.2- 12）。ラロトレクチニブ投与群の平均体重減少は 5%未満であり、投薬に関連した死亡もみられなかった。これらの試験成績から、ラロトレクチニブは TRKA 依存性腫瘍の増殖を *in vivo* で抑制することが確認された。

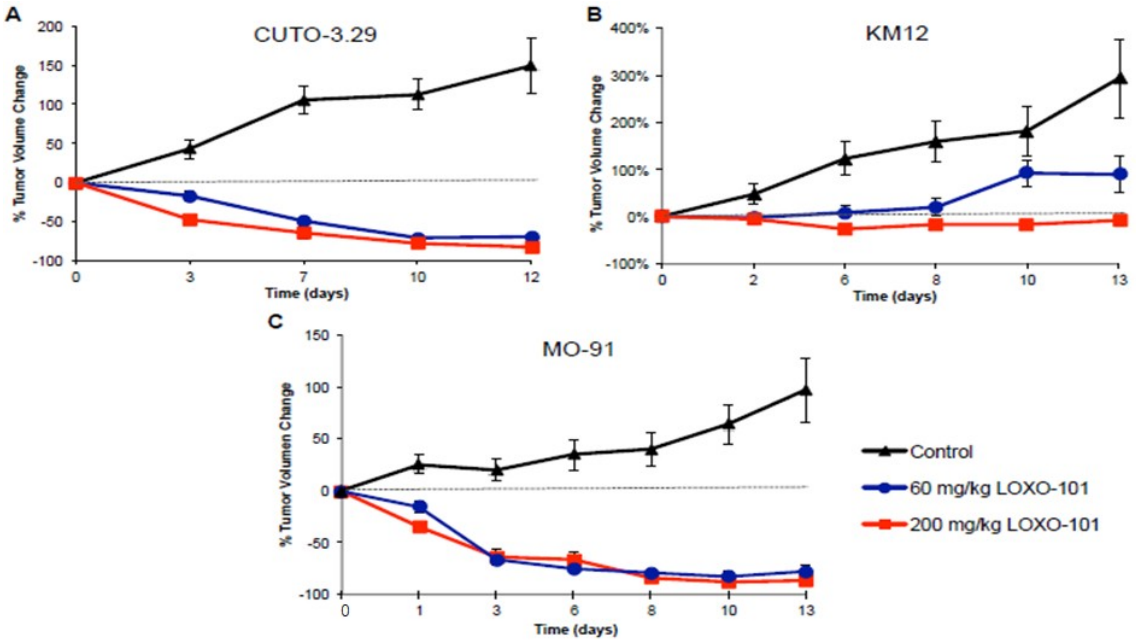
更に、ラロトレクチニブの効果を検討するため、TRKA 又は TRKC 融合タンパク質を発現する細胞株（KM12、CUTO-3.29 及び MO-91）を雌性ヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）の側腹部皮下に移植し、腫瘍の体積が 150～200mm^3 となるまで増殖させた（LOXO-101-PHARM-029）。その後、ラロトレクチニブ（60 及び 200mg/kg）又は媒体を 1 日 1 回 14 日間反復経口投与した（各群 10 例）。腫瘍体積は投与期間を通して測定した。

いずれの細胞移植モデルにおいても、ラロトレクチニブ投与群では共に媒体投与群に比し顕著な増殖抑制作用がみられた（図 2.6.2.2- 13）。したがって、ラロトレクチニブは様々な TRK 融合タンパク質依存性腫瘍の増殖を抑制することが確認された。なお、ラロトレクチニブを 60 及び 200mg/kg の用量で細胞移植モデルに投与後の平均 C_{max} はそれぞれ 1090 及び 4830ng/mL、平均 AUC(0-24)はそれぞれ 14100 及び 62700ng*h/mL であった。



Values are mean ± standard error
Data source: LOXO-101-PHARM-028

図 2.6.2.2- 12　KM12 細胞異種移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用



LOXO-101: Larotrectinib
A: CUTO-3.29 (*MPRIP-NTRK1*; lung cancer), B: KM12 (*TPM3-NTRK1*; colorectal cancer), C: MO-91 (*ETV6-NTRK3*; AML)
Data source: LOXO-101-PHARM-029

図 2.6.2.2- 13　CUTO-3.29、KM12 又は MO-91 細胞異種移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ反復経口投与後の腫瘍増殖抑制作用

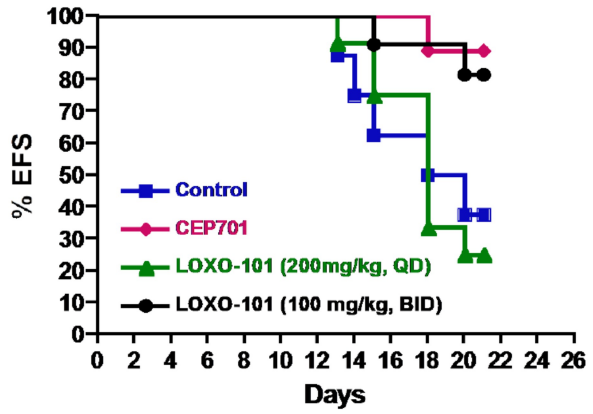
2.6.2.2.2.3　生存延長作用

2.6.2.2.2.3.1　　TRKB 過剰発現細胞株 Sh-SY5Y 異種移植マウスモデル

参照項目：4.2.1.1.11 LOXO-101-PHARM-026

ヒト神経芽腫細胞株 Sh-SY5Y に *NTRK2* 遺伝子（TRKB）を導入し過剰発現させ、これをヌードマウス（Ncr：Nu/Nu）の右側腹部皮下に移植し、腫瘍体積が平均 200mm^3 となるまで増殖させた異種移植モデルを用いて、ラロトレクチニブの腫瘍増殖抑制作用をマウスの生存期間を指標として検討した。ラロトレクチニブを 100mg/kg（1 日 2 回）及び 200mg/kg（1 日 1 回）の用量で、あるいは媒体（100%Labrafac）を 3 週間反復経口投与した（各群 12 例）。また、陽性対照には CEP-701 を 20mg/kg（1 日 2 回又は 1 回）の用量で 3 週間反復皮下投与した（12 例）。

各群の動物の生存を解析するために Kaplan-Meier 曲線をプロットして媒体投与群と比較した。ラロトレクチニブを 100mg/kg（1 日 2 回）の用量で投与後、マウスの生存期間は延長した（図 2.6.2.2- 14）。200mg/kg（1 日 1 回）では生存期間延長作用は弱かった。



LOXO-101: Larotrectinib
EFS: event free survival

図 2.6.2.2- 14　TRKB 過剰発現 Sh-SY5Y 細胞異種移植マウスモデルにおけるラロトレクチニブ反復経口投与後の生存期間延長作用

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 *In vitro*試験

2.6.2.3.1.1 種々のキナーゼに対する作用

参照項目： 4.2.1.1.1 LOXO-101-PHARM-001

キナーゼパネルアッセイ（Millipore、KinaseProfiler™）により、TRKA 及び TRKB を含む 229 種類のキナーゼに対するラロトレクチニブの阻害作用を検討した（n＝2）。

ラロトレクチニブは 1μM において、tyrosine kinase non receptor 2（TNK2）を除く TRK 以外のいずれのキナーゼに対しても 50%を超える阻害作用を示さなかった。ラロトレクチニブは 1μM で TNK2 を介する poly(Glu-Tyr)のリン酸化を約 62%阻害した。しかし、その IC_{50} 値は 1188nM であり、TRKA、TRKB 及び TRKC の IC_{50} 値に比し約 100 倍高値であった。

2.6.2.3.1.2 その他の受容体及び酵素に対する作用

参照項目： 4.2.1.2.1 LOXO-101-PHARM-019
4.2.1.2.2 LOXO-101-PHARM-020
4.2.1.2.3 LOXO-101-PHARM-021

合計 80 種類の受容体、酵素及び核内ターゲット分子などに対する広範なスクリーニングにより、ラロトレクチニブの作用の特異性を検討した。いずれの試験においても、50%以上の阻害が認められた場合、「有意」と判定した。

58 種類の哺乳類由来のオフターゲット分子（G タンパク質共役受容体、核内受容体、イオンチャネル及びトランスポーターを含む）について、放射性リガンド結合アッセイにより検討した（n＝2）。ラロトレクチニブは 10μM でいずれのオフターゲット分子に対しても有意な相互作用を示さなかった（LOXO-101-PHARM-019）。

また、多くはヒト由来の受容体（9 種類）、ドーパミントランスポーター（1 種類）及び酵素（1 種類）について、各受容体に特異的な放射性リガンドを用いた受容体結合アッセイ、細胞系アッセイ及び酵素分析アッセイにより検討した（n＝2）。細胞系アッセイでは、ヒトアデノシン（A_1）及びメラトニン（MT_1）受容体発現 CHO 細胞においてインピーダンスの変化を細胞誘電分光法で解析し、ラロトレクチニブのアゴニスト／アンタゴニスト作用を評価した。酵素分析アッセイでは、ヒトホスホジエステラーゼ（PDE）$4A_{1A}$ の基質である cAMP と共にインキュベーションし、残存する cAMP 濃度を指標に酵素活性を測定した。ラロトレクチニブは 10μM で、受容体〔ドーパミン（D_{2S} 及び D_{2L}）、ムスカリン（M_1、M_2 及び M_3）及びシグマ（σ_1 及び σ_2）〕、並びにドーパミントランスポーターに対してそれぞれの特異的リガンドの結合を阻害せず、30μM で A_1 及び MT_1 受容体の細胞機能に対してアゴニスト／アンタゴニスト活性のいずれも示さず、10μM でヒト $PDE4A_{1A}$ 活性を阻害しなかった（LOXO-101-PHARM-020）。

更に、11 種類の核内受容体〔ヒト（PPARα、PPARβ、PPARγ、RXRα、RXRβ、RXRγ、PXR 及び CAR）、マウス及びラット（PPARα及び PPARγ）〕を介する遺伝子活性化を、レポーター遺伝子アッセイによりルシフェラーゼ活性を指標に検討した。ラロトレクチニブは検討した最高濃度 100μM まで、いずれの核内受容体に対してもアゴニスト／アンタゴニスト活性を示さなかった（LOXO-101-PHARM-021）。

2.6.2.3.2　*In vivo*試験

悪性腫瘍以外の適応症に対するラロトレクチニブの有効性の潜在的可能性を探索する目的で、種々の疼痛モデル及びそう痒モデルを用いた試験が実施されている。以下にその試験成績を簡潔に記載した。

2.6.2.3.2.1　正常感覚機能に対する作用

参照項目：4.2.1.2.4 LOXO-101-PHARM-011

ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量でラットに 1 日 2 回 8 日間経口投与した試験において、2、5 及び 8 日目に、後肢足蹠に熱刺激を加えたときの後肢を引くまでの時間（潜時）を検討したところ、ラロトレクチニブは潜時に対し影響を及ぼさなかった。したがって、ラロトレクチニブは正常感覚機能及び熱に対する防御反応に対し影響を及ぼさないことが示された。

2.6.2.3.2.2　炎症性疼痛モデルに対する作用

参照項目：4.2.1.2.5 LOXO-101-PHARM-006
4.2.1.2.6 LOXO-101-PHARM-007
4.2.1.2.7 LOXO-101-PHARM-008
4.2.1.2.8 LOXO-101-PHARM-009
4.2.1.2.9 LOXO-101-PHARM-010
4.2.1.2.10 LOXO-101-PHARM-012
4.2.1.2.11 LOXO-101-PHARM-014
4.2.1.2.12 LOXO-101-PHARM-018

完全フロイントアジュバンドをラットの後肢足蹠内に投与することにより熱痛覚過敏を誘発したモデルにおいて、ラロトレクチニブを 3～100mg/kg の範囲の用量で 1 日 1 回又は 2 回予防的又は治療的に経口投与したところ、熱痛覚過敏反応に対する低下作用がみられた。

2.6.2.3.2.3　切開性疼痛モデルに対する作用

参照項目：4.2.1.2.13 LOXO-101-PHARM-023

切開性疼痛ラットモデルを用いた検討において、ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量で 1 日 2 回 4 日間経口投与後（4 日目は足底の切開前及び切開直後に投与）1、3、24 及び 26 時間に疼痛スコアを算出した結果、スコアの低下が認められた。

2.6.2.3.2.4　UV 誘発性疼痛モデルに対する作用

参照項目：4.2.1.2.14 LOXO-101-PHARM-005

ラットの肢に UV 照射することにより熱痛覚過敏を誘発したモデルにおいて、ラロトレクチニブを 3、10 及び 30mg/kg の用量で単回経口投与したところ、潜時の延長がみられ、熱痛覚過敏に対する抑制作用を示した。一方、UV 非照射側の肢では作用はみられなかった。

2.6.2.3.2.5　神経障害性疼痛モデルに対する作用

参照項目：4.2.1.2.15 LOXO-101-PHARM-004

ラットの脊髄神経を結紮することにより神経障害性疼痛を誘発したモデル（Chung モデル）において、ラロトレクチニブを 10、30 及び 100mg/kg の用量で 1 日 2 回 5 日間（最終日は 1 日 1 回）

反復経口投与したところ、神経障害性疼痛に対し影響を及ぼさなかった。一方、陽性対照薬ガバペンチン（30 及び 100mg/kg 単回腹腔内投与）は抑制作用を示した。

2.6.2.3.2.6　発症途中及び確立後のコラーゲン誘発関節炎モデルに対する作用

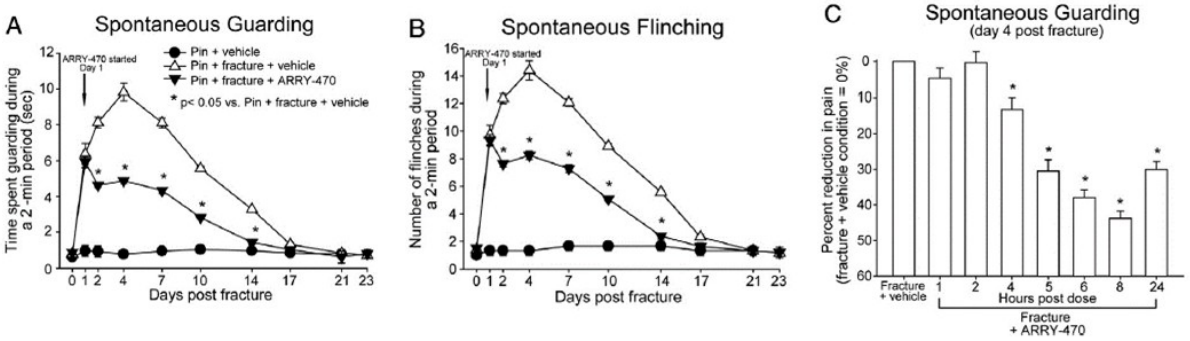
参照項目：　4.2.1.2.16 LOXO-101-PHARM-015
4.2.1.2.17 LOXO-101-PHARM-016

コラーゲン誘発関節炎の発症途中ラットモデルにおいて、ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量で 1 日 2 回 17 日間反復経口投与したところ、熱痛覚過敏反応、足首径及び炎症スコアの低下がみられ、軟骨損傷、パンヌス及び骨吸収が軽度になった（LOXO-101-PHARM-015）。また、コラーゲン誘発関節炎の確立したラットモデルにおいて、ラロトレクチニブを同用量で 1 日 2 回 7 日間反復経口投与したところ、軟骨損傷、パンヌス及び骨吸収に低下がみられた（LOXO-101-PHARM-016）。なお、ラロトレクチニブ投与群では媒体投与群でみられた体重減少が完全に抑制された。

2.6.2.3.2.7　骨折痛モデルに対する作用

参照項目：　4.2.1.2.18 LOXO-101-PHARM-013
4.2.1.3.3 Bone 2011-48-389

骨折痛マウスモデルにおいて、ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量で単回又は 1 日 2 回 48 日間経口投与した（LOXO-101-PHARM-013 及び Bone 2011-48-389）。骨折後 1 日から反復投与（図 2.6.2.3- 1、A 及び B）、及び骨折後 4 日の単回投与後 8 時間以内（図 2.6.2.3- 1、C）において、骨折痛関連行動は減少した。すなわち、後肢の防御（guarding）及びすくみ反応（flinching）は約 50%低下し、これには体重増加抑制及び骨折治癒の遅延を伴わなかった。また、無髄及び有髄感覚神経、並びに交感神経の線維密度、急性の熱痛覚及び機械的痛覚、神経筋機能（ロータロッド試験）に低下はみられなかった。



ARRY-470: Larotrectinib

図 2.6.2.3- 1　骨折痛マウスモデルにおけるラロトレクチニブ投与後の自発疼痛行動に及ぼす影響

2.6.2.3.2.8　骨腫瘍痛モデルに対する作用

参照項目：4.2.1.2.19 Mol Pain 2010-6-1

溶骨性マウス肉腫細胞株（NCTC2472）をマウスの大腿骨に移植した骨腫瘍痛モデルにおいて、腫瘍誘発性疼痛行動が明らかになったとき（移植後 6～20 日目）、又は骨腫瘍が顕著に進行した後（移植後 18～20 日目）、ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量で 1 日 2 回経口投与し、後肢の防御及びすくみ反応を含む骨腫瘍に関連する疼痛行動を評価した（移植後 8～20 日目）。

ラロトレクチニブを初期（移植後 6 日目）から反復投与したとき、感覚神経線維の異所性発芽及び神経腫様構造の形成に対する抑制作用はみられたが、腫瘍増殖及び骨リモデリングには影響を及ぼさなかった。一方、後期（移植後 18 日目）から短期間投与したときには作用はみられなかった。マウスモデルにおけるこれらのデータから、腫瘍自体を標的とする治療のように、TRK 受容体阻害を早期に実施するほど、腫瘍痛及び感覚神経線維の腫瘍誘発性リモデリングをより効果的に制御できることが示唆される。

2.6.2.3.2.9　アトピー性皮膚炎モデルに対する作用

参照項目：4.2.1.2.20 LOXO-101-PHARM-017

ヒトのアトピー性皮膚炎に類似した皮膚変化が自然発症する Nc/Nga マウス[9] において、ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量で 1 日 2 回 28 日間経口投与したところ、媒体投与群に比べ体重の増加、並びに紅斑、浮腫、耳腫脹及びひっかき行動のスコアの低下がみられた。

2.6.2.4　　安全性薬理試験

ICHS7A 及び S7B ガイドラインに従った、独立した安全性薬理試験を実施すると共に、ラット及びサルの反復投与毒性試験に安全性薬理エンドポイント（心血管系、呼吸器系及び中枢神経系）を組み込んで実施した。

ラロトレクチニブの中枢神経系に対する影響について、ラットの単回経口投与による Irwin 試験において評価した。また、マウスの 48 日間反復経口投与試験及びラットの 42 日間反復経口投与試験（2.6.6.3.1.3）においてロータロッド試験を実施した。更に、機能観察総合評価法（FOB）及び自発運動量などについて、ラットの 4 週間及び 13 週間反復経口投与毒性試験（それぞれ 2.6.6.3.1.4 及び 2.6.6.3.1.5）、サルの 14 日間及び 4 週間反復経口投与毒性試験（それぞれ 2.6.6.3.2.2 及び 2.6.6.3.2.4）並びに幼若ラットの反復経口投与毒性試験（2.6.6.7.3）の一部として評価した。

ラロトレクチニブの心血管系に対する影響を評価するため、*in vitro* での hERG 試験、テレメーター装着ラット、サル及び麻酔イヌを用いた *in vivo* 試験を実施した。また、サル（テレメーター非装着）の 4 週間及び 13 週間反復経口投与毒性試験（それぞれ 2.6.6.3.2.4 及び 2.6.6.3.2.5）の期間中に心電図及び血圧を評価した。

ラロトレクチニブの呼吸器系に対する影響について、ラットに単回経口投与後の全身プレスチモグラフィーにより評価した。また、サルの 13 週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.2.5）において測定したバイタルサインにより呼吸数を評価した。

ラロトレクチニブをラットに単回経口投与後の胃腸管に対する影響を評価した。

2.6.2.4.1　　中枢神経系

2.6.2.4.1.1　Irwin 試験

参照項目：4.2.1.3.4 LOXO-101-SPPHARM-012

ラットの中枢及び末梢神経系機能に関連する一連の行動及び生理学的パラメータに対するラロトレクチニブの影響を Irwin 試験により検討した。

ラロトレクチニブ（10、30 及び 100mg/kg）又は（Labrafac™ Lipophile WL 1349）を絶食下で雄性ラット（SD 系、242～288g）に単回経口投与した（各群 6 例）。なお、無投与群を設定して対照群とし、ラロトレクチニブ投与群と並行して観察した。動物の行動は投与前、並びに投与後 0.5、1、2、5 及び 24 時間に観察し、各時点で体温測定及び死亡の確認を実施した。また、投与前及び投与後 24 時間に体重を測定した。

ラロトレクチニブ投与群における感覚－運動神経性機能、神経行動学的機能及び自律神経性機能について、予備的検討を含め、媒体投与群及び無投与群との比較検討を行った結果、いずれもラロトレクチニブに関連した変化はみられなかった。体重及び体温についても、ラロトレクチニブに関連した変化はみられなかった。当該試験におけるラロトレクチニブの無毒性量（NOAEL）は 100mg/kg であった。

2.6.2.4.1.2 ロータロッド試験

参照項目： 4.2.3.2.3 LOXO-101-TOX-012
4.2.1.3.3 Bone 2011-48-389

ラットにおける 42 日間反復投与毒性試験（トキシコキネティックス評価を含む）において、ラロトレクチニブ及び媒体対照群での神経筋機能を評価したロータロッド試験成績についてまとめた（非 GLP 試験）（LOXO-101-TOX-012）。当該毒性試験の詳細は 2.6.6.3.1.3 を参照のこと。

ラロトレクチニブを 100mg/kg の用量で雌性ラット（SD 系、186～191g）3 例に 1 日 2 回（計 200mg/kg）42 日間反復経口投与した。対照群の 3 例には媒体（Labrafac™ Lipophile WL 1349）を 1mL/kg の容量で投与した。神経筋機能の評価は 1、7、9、16、23、30 及び 37 日目にロータロッドを用いて実施した。なお、被験薬投与前にロータロッドでの訓練期間は設けなかった。

16 日目において、ラロトレクチニブ投与群のロータロッドでの持続時間が媒体投与群に比し低下し、この作用は投与期間終了時点まで持続した（表 2.6.2.4- 1）。ラロトレクチニブを 100mg/kg の用量で 1 日 2 回 42 日間反復投与期間中、神経筋機能に影響を及ぼす可能性が示された。この用量での AUC(0-24)及び C_{max} はそれぞれ 49600ng*h/mL 及び 8030ng/mL であった。しかしながら、ロータロッド試験実施前の訓練を実施しなかったこと、1 群当たりの例数が少なかったこと、並びに群内での動物間のバラツキが大きかったことから、ラロトレクチニブの神経筋機能に対する影響を明確に結論づけることはできなかった。

表 2.6.2.4- 1 ラットの 42 日間反復経口投与試験におけるロータロッドでの持続時間

	Time (sec)						
Group mean	**Day 1**	**Day 7**	**Day 9**	**Day 16**	**Day 23**	**Day 30**	**Day 37**
Vehicle control	0.0 ± 0.0	11.0 ± 5.7	18.7 ± 9.0	39.3 ± 20.3	49.3 ± 27.8	58.7 ± 33.7	48.3 ± 36.1
Larotrectinib (100 mg/kg/ dose BID)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	47.3 ± 23.2	19.3 ± 10.6	7.3 ± 2.3	6.3 ± 2.3	4.0 ± 0.6

Values are mean ± standard error
Data source: LOXO-101-TOX-012

また、ラロトレクチニブのマウス神経筋機能に及ぼす影響について、同様にロータロッドを用いて非 GLP 下で検討した（Bone 2011-48-389）。

ラロトレクチニブを 30mg/kg の用量で成熟雄性マウス（C3H/HeJ、20～25g）に、1 日 2 回（計 60mg/kg）48 日間反復経口投与した（各群最低 3 例）。対照群には媒体を同様に投与した。最終投与後 1 時間においてロータロッド試験を実施し、一般的な神経筋機能を評価した。その結果、媒体投与群との間で一般的な神経筋機能に対する影響に差異はみられなかった。

2.6.2.4.1.3 神経行動学的活性に及ぼす影響

2.6.2.4.1.3.1 ラット

参照項目： 4.2.3.2.4 LOXO-101-TOX-003
4.2.3.2.5 LOXO-101-TOX-018

ラットの 4 週間（LOXO-101-TOX-003、2.6.7.7.1）及び 13 週間反復経口投与毒性試験（LOXO-101-TOX-018、2.6.7.7.2）において、ラロトレクチニブの神経行動学的活性に及ぼす影響を検討した。当該毒性試験の詳細は 2.6.6.3.1.4 及び 2.6.6.3.1.5 を参照のこと。

4 週間反復投与毒性試験において、ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で雌雄ラット（SD 系、150～300g）に 1 日 2 回経口投与した（雌雄それぞれ各群 15 例）。自発運動を含む神経行動学的評価を投与前日、投与期間中の 15 日目及び 22 日目並びに回復期間中に実施した。測定した評価項目には聴覚反射試験、握力試験、瞳孔反射及びオープンフィールド観察が含まれた。雌雄共にラロトレクチニブの全用量で投与期間及び回復期間において握力の増加がみられたことを除き、ラロトレクチニブ投与に関連した所見はみられなかった。握力の増加は動物の体重増加と相関していた。したがって、ラロトレクチニブは最高用量 100mg/kg の 1 日 2 回投与まで、中枢神経系関連の評価項目に影響を及ぼさないと考えられた。100mg/kg を 1 日 2 回投与後における C_{max} は雄及び雌でそれぞれ 11300 及び 19100ng/mL、AUC(0-24)はそれぞれ 1182000 及び 198400ng*h/mL であった。

13 週間反復投与毒性試験において、ラロトレクチニブを 0（媒体：コーン油）、7.5、25/17.5（25 又は 17.5mg/kg）及び 75/50/37.5mg/kg（75、50 又は 37.5mg/kg）の用量で雄性ラット（SD 系、318～391g）に、0、7.5/5（7.5 又は 5mg/kg）、25/10（25 又は 10mg/kg）及び 75/50/20mg/kg（75mg/kg、23 日目の 2 回目投与から 26 日目まで休薬し 50 又は 20mg/kg）の用量で雌性ラット（SD 系、186～275g）にそれぞれ 1 日 2 回経口投与した。雌雄それぞれ各群 3～10 例において、体温測定を含む FOB 評価（ハンドリング時の観察及びオープンフィールドでの観察、並びに刺激に対する感覚反応性）を、投与前、投与期間の 13 週目及び回復期間の 4 週目にそれぞれ 1 回ずつ実施した。すべての評価は同じ時間帯（±2 時間）に実施した。また、自発運動量の評価も同時期に実施した。

投与期間 13 週目（87 日目）の FOB 評価において特に問題となる所見はみられなかった。なお、オープンフィールドでの評価において、ラロトレクチニブ投与群の各群雌 1 例に、「その他のまれな行動」として中等度の挙尾がみられたものの、この所見の意義は不明である。しかし、いずれの運動パラメータにもラロトレクチニブに関連した所見は観察されなかった。ラロトレクチニブは検討した最高用量（雄：75/50/37.5mg/kg、雌：75/50/20mg/kg、1 日 2 回）まで、中枢神経系に影響を及ぼさないと考えられた。最高用量投与後 91 日目における雄と雌の C_{max} はそれぞれ 5510 及び 2230ng/mL、AUC(0-24)はそれぞれ 36700 及び 14400ng*h/mL であった。

2.6.2.4.1.3.2 幼若ラット

参照項目： 4.2.3.5.4.3 LOXO-101-TOX-021

幼若ラットの反復投与毒性試験（2.6.7.17.1）に組み込んだ神経行動学的評価により、神経行動学的活性に対するラロトレクチニブの影響を検討した。当該毒性試験の詳細は 2.6.6.7.3 を参照のこと。

時期を合わせて交尾させた非処置雌性ラットから得られた幼若ラット（SD 系、8.2～20.6g）の 4 群（雌雄それぞれ各群 45 例）に、媒体（コーン油）又はラロトレクチニブを出生日の 7～70 日後（生後 7～70 日）の期間に 1 日 2 回経口投与した。投与量は、以前の用量設定幼若ラット毒性試験においてみられた生後 7 日と比較したときの生後 21～28 日における曝露量減少（2.6.6.7.2）を考慮し、生後 7～27 日の期間には 0、0.2、2 及び 7.5mg/kg の用量を 1 日 2 回、生後 28～70 日の期間には 0、0.6、6 及び 22.5mg/kg の用量を 1 日 2 回とした。神経行動学的活性に対するラロトレクチニブの影響について、FOB、自発運動量、聴覚驚愕反応、Biel 迷路遊泳試験により検討した。

2.6.2.4.1.3.2.1　FOB

FOB 評価は、投与期間の生後 61 日に最大 15 例の幼若ラット/性/群、及び回復期間の生後 86 日に最大 20 例の幼若ラット/性/群をそれぞれ用いて実施した。各動物に対してホームケージでの観察、ハンドリング時の観察及びオープンフィールドでの観察、刺激に対する感覚反応性の観察及び神経筋所見の観察を実施した。また、体重、カタレプシー、体温などの生理的観察も含めた。

ホームケージでの観察：

ラロトレクチニブに関連する影響は、投与期間（生後 61 日）での 7.5/22.5mg/kg 投与群の雌に限定された、14 例中 4 例の眼瞼下垂（半分閉鎖）であり、これは媒体投与群ではみられなかった。また、同じ群の雌 14 例中 2 例に眼瞼下垂（軽度）がみられたが、これも媒体投与群ではみられなかった。この所見は日々の観察や投与後 1～2 時間でみられた。7.5/22.5mg/kg 投与群の雌で媒体投与群と比べて瞼を大きく開けた動物はほとんどみられなかった。生後 61 日におけるホームケージでの観察において、これ以外に雌でみられたラロトレクチニブ投与に関連する影響はみられず、雄においてはラロトレクチニブに関連する影響は全くみられなかった。生後 61 及び 86 日において、0.2/0.6 及び 2/6mg/kg 投与群の雌雄いずれもホームケージでの観察でラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった。

ハンドリング時の観察：

ハンドリング時の観察における評価項目について、ラロトレクチニブに関連する影響が、雌雄 7.5/22.5mg/kg 群の投与期間（生後 61 日）及び回復期間（生後 86 日）の両時点で認められた。生後 61 日では、7.5/22.5mg/kg 投与群の大半の動物において、媒体投与群ではみられない瞼における変化〔眼瞼下垂（軽度又は半分閉鎖）、又は完全な眼瞼閉鎖（雄 15 例中 12 例、雌 14 例中 13 例）〕がみられた。そのため、瞼を大きく開けていた動物は、7.5/22.5mg/kg 投与群の雄 15 例中 3 例、雌 14 例中 1 例であり、媒体投与群（15 例全例）と比較して少なかった（$p<0.05$ vs 媒体投与群、Fisher's Exact Test）。この変化は 7.5/22.5mg/kg 投与群の回復期間を通して持続的に観察された。0.2/0.6 及び 2/6mg/kg 投与群では、雌雄共に生後 61 及び 86 日においてラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった。

オープンフィールドでの観察及び刺激に対する感覚反応性の観察：

投与期間（生後 61 日）及び回復期間（生後 86 日）の両時点で、いずれの観察の評価項目についてもラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった。

神経筋所見の観察：

ラロトレクチニブに関連する神経筋所見が 2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群の雄でみられた。投与期間（生後 61 日）において、7.5/22.5mg/kg 投与群の雄で後肢の握力及び着地開足幅の平均値が低下した（p＜0.01 vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparison test）。また、2/6mg/kg 投与群の雄においても後肢の着地開足幅の平均値が低下した（p＜0.01 vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparison test）。このような後肢の握力及び着地開足幅の変化は、平均体重の低下による可能性が考えられた。雌においても、7.5/22.5mg/kg 投与群で後肢の握力及び着地開足幅の平均値がいずれも媒体投与群と比較して軽度低下した。しかし、後肢の握力に関しては用量反応性がなく、かつ両パラメータの低下の程度は小さく、いずれも対照群と比べて有意差は認められなかった。したがって、雌におけるこれらの変化はラロトレクチニブに関連しないものと考えられた。

回復期間（生後 86 日）において、2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群の雄では、後肢の着地開足幅の平均値が低下し（p＜0.01 vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparison test）、これについても平均体重の低下と一致していた。雌においては、2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群で生後 86 日に後肢の着地開足幅の平均値が低下したが（p＜0.01 vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparison test）、生後 61 日には有意な作用はみられず、生後 86 日の体重変化にも影響がみられなかったことから、ラロトレクチニブに関連する変化ではないと考えられた。0.2/0.6mg/kg 投与群では、ラロトレクチニブに関連する神経筋所見は観察されなかった。

2.6.2.4.1.3.2.2　　自発運動量

自発運動量（平均総運動数及び平均歩行運動数）の評価は、投与期間の生後 61 日に 15 例の幼若ラット/性/群、及び回復期間の生後 86 日に 20 例の幼若ラット/性/群をそれぞれ用いて実施した。

投与期間（生後 61 日）の 2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群の雄において、初期（0-40 分：10 分ごと）の自発運動量は媒体投与群と比較し高値であった。特に、平均総運動数には用量相関性の増加がみられ、0-10 分（2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群）、並びに 11-20 及び 21-30 分（7.5/22.5mg/kg 投与群）において有意であった（p≦0.033 vs 媒体投与群）。その後の自発運動量は媒体投与群と同程度であった。2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群において、初期の平均総運動数及び平均歩行運動数それぞれの媒体投与群に対する増加率は、0-60 分後（累積）の増加率（30.1～46.0%）に比し十分高かった。しかし、いずれの投与群においても正常な馴化（時間に伴う自発運動量の低下）がみられたことから、当該所見は生理学的に意義のあるものではなく、ラロトレクチニブに関連しないものと考えられた。なお、回復期間（生後 86 日）の 7.5/22.5mg/kg 投与群の雄において、0-10 分の平均総運動数の増加（p＝0.002 vs 媒体投与群）がみられたが、影響は一過性であり、累積の平均総運動数には影響がみられなかったことから、ラロトレクチニブに関連する影響ではないと考えられた。

雌については、投与期間（生後 61 日）に自発運動量に対する影響はみられなかった。回復期間（生後 86 日）の 2/6 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群において、平均総運動数は媒体投与群に比し高かったものの〔累積の平均総運動数（p≦0.034 vs 媒体投与群）〕、平均歩行運動数は媒体投与群と類似し、かつ馴化がみられたことから、当該所見はラロトレクチニブに関連しないものと考えられた。

そのほかに、投与期間（生後 61 日）及び回復期間（生後 86 日）を通して、ラロトレクチニブに関連する影響はみられなかった。すなわち、ラロトレクチニブ投与群と媒体投与群との自発運動量の差異はわずかであり、統計学的にも有意差はみられなかった。

2.6.2.4.1.3.2.3　聴覚驚愕反応

聴覚驚愕反応の評価は、投与期間の生後 60 日に 15 例の幼若ラット/性/群、及び回復期間の生後 85 日に 20 例の幼若ラット/性/群をそれぞれ用いて実施した。その結果、ラロトレクチニブ投与による影響は認められなかった。

2.6.2.4.1.3.2.4　Biel 迷路遊泳試験

Biel 迷路遊泳試験[10] による学習及び記憶の評価は、投与期間の生後 62 日に 15 例の幼若ラット/性/群、及び回復期間の生後 87 日に 20 例の幼若ラット/性/群をそれぞれ用いて実施した。すなわち、最初のテスト期間（7 日間）は生後 62 日に開始し、2 回目のテスト期間は生後 87 日に開始した。なお、生後 62 日にテストを開始した動物は 2 回目のテストには使用しなかった。

生後 62 及び 87 日における Biel 迷路遊泳試験による評価の 1 日目において、遊泳能力は媒体投与群とラロトレクチニブ投与群の間で類似し影響はみられなかった。

幼若動物で示されたトキシコキネティックスデータを表 2.6.2.4- 2 及び表 2.6.2.4- 3 に示した。当該幼若試験におけるデータに基づいて、雌雄の神経行動学的毒性の NOAEL は最高用量 7.5/22.5mg/kg（1 日 2 回）と推定された。この用量での雄と雌の C_{max} はそれぞれ 1710 及び 3310ng/mL、AUC(0-24)はそれぞれ 12900 及び 22300ng*h/mL に相当した。

表 2.6.2.4- 2 幼若雌雄ラットにおけるラロトレクチニブ経口投与後の
トキシコキネティックスパラメータ

Sex	PND	Group	Dose Level (mg/kg BID)[a]	AUC_{0-24} (ng*h/mL)	AUC_{0-12} (ng*h/mL)	AUC_{12-24} (ng*h/mL)	C_{max1} (ng/mL)	C_{max2} (ng/mL)
Male	7	2	0.2	169	58.0	111	8.77	21.1
		3	2	3060	1880	1180	248	162
		4	7.5	13900	5790	8130	704	1020
	28	2	0.6	146	45.8	100	12.6	38.3
		3	6	1280	715	560	186	196
		4	22.5	9900	4100	5810	1040	1910
	70	2	0.6	81.4	28.0	53.4	4.92	12.3
		3	6	1530	832	694	217	221
		4	22.5	12900	6880	6050	1710	1580
Female	7	2	0.2	85.0	23.9	61.1	3.47	18.5
		3	2	2360	1570	790	247	109
		4	7.5	18500	6600	11900	839	1820
	28	2	0.6	112	76.7	35.4	15.6	12.2
		3	6	1630	876	751	180	250
		4	22.5	9300	4350	4950	998	1680
	70	2	0.6	186	60.1	126	17.9	25.7
		3	6	3590	1600	1990	239	444
		4	22.5	22300	11200	11100	3310	2690

[a]: Animals were dosed twice daily (BID) 12 hours ± 30 minutes apart.

Note: C_{max1} is following the first daily dose, C_{max2} is following the second daily dose.

表 2.6.2.4- 3　幼若雌雄ラットにおけるラロトレクチニブ経口投与後の
トキシコキネティックスパラメータ（雌雄統合）

Sex	PND	Group	Dose Level (mg/kg BID)[a]	AUC_{0-24} (ng*h/mL)	AUC_{0-12} (ng*h/mL)	AUC_{12-24} (ng*h/mL)	C_{max1} (ng/mL)	C_{max2} (ng/mL)
Gender Combined	7	2	0.2	127	41.0	86.2	6.12	19.8
		3	2	2710	1720	987	248	136
		4	7.5	16200	6200	10000	772	1420
	28	2	0.6	129	61.2	67.9	14.1	25.3
		3	6	1450	795	656	183	223
		4	22.5	9600	4230	5380	1020	1800
	70	2	0.6	134	44.1	89.6	11.4	19.0
		3	6	2560	1220	1340	228	333
		4	22.5	17600	9060	8570	2510	2140

[a]: Animals were dosed twice daily (BID) 12 hours ± 30 minutes apart.
Note: C_{max1} is following the first daily dose, C_{max2} is following the second daily dose.

2.6.2.4.1.3.3　　サル

参照項目：　4.2.3.2.7 LOXO-101-TOX-004
4.2.3.2.9 LOXO-101-TOX-006

サルの 14 日間（LOXO-101-TOX-004、2.6.7.6.5）及び 4 週間反復経口投与毒性試験（LOXO-101-TOX-006、2.6.7.7.3）に組み込んだ神経学的評価により、神経行動学的活性に対するラロトレクチニブの影響を検討した。当該毒性試験の詳細は 2.6.6.3.2.2 及び 2.6.6.3.2.4 を参照のこと。

14 日間反復投与毒性試験（非 GLP）において、ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、30、100 及び 300mg/kg の用量で各群 3 例の雄性カニクイザル（2.29～3.93kg）に 1 日 1 回経口投与した。詳細な FOB 評価を投与前、投与期間の 1 及び 14 日目に実施した。

300mg/kg 投与群では、一般状態として、摂餌低下、削痩の外観及び体重減少がみられ、忍容性は低かった。投与期間の 1 日目ではラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった。投与期間の 14 日目では、同時期の媒体投与群と比較して 300mg/kg 投与群で体温が低下した。また、振戦（2 例）、円背位（2 例）及び麻痺（1 例）がみられ、当該所見はラロトレクチニブに関連するものと考えられたが、中枢神経系機能に関連するものではなく、体温低下が関連する可能性が考えられた。300mg/kg 投与群における 14 日目の C_{max} 及び AUC(0-24)はそれぞれ 19800ng/mL 及び 144000ng*h/mL であった。

4 週間反復投与毒性試験において、ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で雌雄カニクイザル（2.3～4.2kg）に 1 日 1 回経口投与した（各群 3 例）。毒性試験の一部として、神経行動学的評価を、投与前、投与期間の 1 及び 27 日目の投与後約 2 時間、並びに回復期間中に実施した。

ラロトレクチニブ投与後、いずれの用量においても一般状態に変化はみられず、忍容性は良好であった。一連の神経行動学的観察において、100mg/kg の用量までラロトレクチニブに関連した所見はみられなかった。100mg/kg の投与後 27 日目の雌雄合わせた C_{max} 及び AUC(0-24)はそれぞれ 6560ng/mL 及び 32200ng*h/mL であった。

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 *In vitro* 試験

2.6.2.4.2.1.1 hERG カリウムチャネル

参照項目： 4.2.1.3.1 LOXO-101-SPHARM-002
4.2.1.3.2 LOXO-101-SPHARM-001

ラロトレクチニブの hERG カリウム電流に対する阻害作用について、hERG カリウムチャネル発現ヒト胎児腎臓細胞（HEK293）を用いて非 GLP 下で検討した（LOXO-101-SPHARM-002）。

ラロトレクチニブを 1～10μM（3 細胞/濃度）で検討した結果、hERG カリウム電流に対する阻害作用は 10μM で平均 0.6%であり、陽性対照薬 E-4031 が 0.5μM で hERG カリウム電流に対し 99.9%阻害したことから、ラロトレクチニブは hERG カリウム電流に対し阻害作用を示さないと考えられた。

更に、hERG カリウムチャネル発現 HEK293 細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法により生理学的温度下でラロトレクチニブの hERG カリウム電流に対する作用を検討した（LOXO-101-SPHARM-001）。

種々の濃度のラロトレクチニブの hERG カリウム電流に対する阻害作用を表 2.6.2.4- 4 に示した。ラロトレクチニブの hERG カリウム電流阻害の IC_{50} 値は 147μM であった。なお、同一条件下で、陽性対照テルフェナジンは 60nM で hERG カリウム電流を 74.0±5.8%（平均値±標準偏差、2 細胞）阻害したことから、当該試験系の感度が確認された。

表 2.6.2.4- 4 ラロトレクチニブの hERG カリウム電流に対する阻害作用

Test Article	Concentration (μM)	Number of Cells Evaluated	Inhibition of hERG Channel Current (mean ± SEM)
Vehicle control	0	3	1.8 ± 0.3%
Larotrectinib	10	3	5.4 ± 0.7%
	30	3	19.1 ± 1.9 %*
	100	3	39.2 ± 1.6%*
	300	3	67.5 ± 1.0%*

Significance: * = p < 0.05 compared to vehicle control (Dunnett's multiple comparison test); SEM= standard error of the mean
Data source: LOXO-101-SPHARM-001

2.6.2.4.2.2 *In vivo*試験

参照項目：4.2.1.3.5 LOXO-101-TOX-013

以下にまとめた心血管系試験の結果〔サルの 13 週間反復経口投与毒性試験（2.6.6.3.2.5）の心電図を除く〕は、学会認定の獣医学心臓病専門家によって分析された。結論として、ラロトレクチニブは評価したすべての試験において、心臓の電気生理学的パラメータに対して問題となる影響を及ぼさなかった。

2.6.2.4.2.2.1 ラット

参照項目：4.2.1.3.6 LOXO-101-SPHARM-004

覚醒下のテレメーター装着ラット（雄 5 例）において、ラロトレクチニブを 0（媒体）、10、30、100 及び 300mg/kg の用量でクロスオーバー法により経口投与した（2mL/kg）（非 GLP 試験）。投与間隔は 7 日間とした。

血圧、心拍数及び心電図は投与前 1 時間から投与後 24 時間まで、心血管系パラメータ（収縮期血圧、拡張期血圧及び平均血圧、心拍数、並びに QA、PR 及び QRS 間隔）について 10 分間隔で平均値を記録した。

ラロトレクチニブを 10、30 及び 100mg/kg の用量で投与後、血圧、心拍数及び心電図パラメータにラロトレクチニブに関連する変化はみられなかった。なお、300mg/kg 投与後 1～6 時間に血圧の軽度の上昇がみられ、拡張期血圧よりも収縮期血圧及び平均血圧において顕著であったものの、影響は軽度であったことから生理学的に問題とはならないと考えられた。心拍数、QA 間隔、PR 間隔及び QRS 間隔にみられた変化はいずれの用量においても媒体投与群と同程度であったことから、ラロトレクチニブはラットの心拍数及び心電図パラメータに影響を及ぼさないと考えられる。

単回投与毒性試験（2.6.6.2.1）における 300mg/kg 投与後の雄性ラットの曝露データを表 2.6.2.4- 5 に示した。

表 2.6.2.4- 5 ラットにおけるラロトレクチニブ 300mg/kg 単回経口投与後の薬物動態パラメータ

Dose	Sex	C_{max} (ng/mL)	AUC_{inf} (ng*h/mL)
300 mg/kg	Male	15100	97800

Exposure data from LOXO-101-TOX-001

2.6.2.4.2.2.2 イヌ

参照項目：4.2.1.3.7 LOXO-101-SPHARM-006

麻酔下のテレメーター装着イヌを用いて、ラロトレクチニブを静脈内持続投与後の心血管系に対する影響を非 GLP 下で探索的に検討した。

ラロトレクチニブを 0.043、0.217 及び 0.433mg/kg/分（それぞれ 1.3、6.5 及び 13.0mg/kg に相当）の用量で、麻酔下のイヌにそれぞれ 30 分間隔で連続して静脈内持続投与した（3 例）。また、対照群には媒体を同様に静脈内持続投与した（6 例）。持続投与前 30 分から投与終了後 60 分まで平均動脈血圧、全身血管抵抗、心拍出量、肺動脈圧及び心収縮性をモニターした。なお、収縮性は dP/dt_{max}（心室圧変化の最大速度）として測定した。

ラロトレクチニブの静脈内持続投与により、生理学的に問題となる変化はみられなかった。なお、肺動脈圧の軽度の上昇がみられたが、これは一回拍出量の変化あるいは動脈又は静脈の平滑筋の活性の変化と関連している可能性が考えられた。以上より、ラロトレクチニブはイヌの心血行動態パラメータに問題となる影響を及ぼさないと考えられる。

2.6.2.4.2.2.3　サル

2.6.2.4.2.2.3.1　テレメーター装着

参照項目： 4.2.1.3.8 LOXO-101-SPHARM-005
4.2.1.3.9 LOXO-101-SPHARM-003

覚醒下のテレメーター装着カニクイザル（雄 3 例）において、媒体（Labrafac™ Lipophile WL 1349）又はラロトレクチニブの 200mg/kg を 48 時間間隔でそれぞれ 1 回ずつ経口投与した（LOXO-101-SPHARM-005、非 GLP 試験）。血圧及び心電図を投与前 1 時間から投与後 48 時間まで記録した。また、投与後 2、24 及び 48 時間に全動物から採血し、血漿中ラロトレクチニブ濃度を測定した（LOXO-101-SPHARM-005）。

媒体投与後において、収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈血圧、脈圧、心拍数及び心電図パラメータ〔PR、QRS、QT/補正 QT 間隔〕や一般状態に対し影響はみられなかった。

各動物におけるラロトレクチニブの血漿中濃度を表 2.6.2.4- 6 に示した。

ラロトレクチニブを 200mg/kg で投与後、3 例すべてに嘔吐がみられた。2 例は投与後のそれぞれ 1 時間及び 1 分に嘔吐したが、これらのサルの C_{max} は低値であったことから（投与後 2 時間でそれぞれ 1080 及び 360ng/mL）、嘔吐は低曝露で発現することが示唆された。残りの 1 例は投与後 2 時間に嘔吐がみられ、C_{max} はより高値であった（投与後 2 時間で 16000ng/mL）。

C_{max} が最も高濃度であった 1 例において、投与後 90～180 分に平均動脈血圧の中等度～高度の低下（拡張期血圧の最大 48%の低下）がみられた。この変化は有害作用とみなされ、平均動脈血圧の低下に伴って心拍数が軽度に増加した。動脈の脈圧（左心室一回拍出量の間接的指標）及び動脈コンプライアンス（伸縮性の指標）は同時期に約 45%低下した。平均動脈血圧は投与後約 180 分において、ベースライン方向に回復した。3 例すべてにおいてラロトレクチニブの心電図パラメータに対する影響はみられなかった。

結論として、ラロトレクチニブは 200mg/kg の経口投与により嘔吐を誘発し、更に 1 例では C_{max} 16000ng/mL の時点において平均動脈血圧の低下、心拍数の増加及び脈圧の低下がみられた。心電図パラメータには変化はみられなかった。

表 2.6.2.4- 6 サルにおけるラロトレクチニブ 200mg/kg 経口投与後の血漿中濃度

Larotrectinib Plasma Concentrations (ng/mL)			
Time point post-dose	**Animal No. 7803**	**Animal No. 7805**	**Animal No. 7806**
2 hours	16000	1080	360
24 hours	849	171	33
48 hours	24	10	9

Data source: LOXO-101-SPHARM-005

前述したように、ラロトレクチニブを 200mg/kg の用量でサルに経口投与した試験において忍容性が低かったことから、更にサルの心血管系に対する影響を詳細に検討するため、ラロトレクチニブを用量漸増投与法により評価した（LOXO-101-SPHARM-003）。

ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、3、10、30 及び 100mg/kg の用量でテレメーター装着カニクイザル（雄 6 例、2.9～5.0kg）に漸増的に経鼻胃内投与した（表 2.6.2.4- 7）。

表 2.6.2.4- 7 サルにおける漸増的投与試験デザイン

Number of Animals	**Dosing Days**	**Dose Level (mg/kg)**	**Dose Volume (mL/kg)**	**Dose Concentration (mg/mL)**
6	1	0	1	0
	3	3	1	3
	8	10	1	10
	15	30	1	30
	22	100	1	100

The animals used for dosing on Day 1 were also used for dosing on Days 3, 8, 15, and 22.

ラロトレクチニブの各用量を投与後、一般状態、摂餌量及び体重を記録した。血圧（拡張期血圧、収縮期血圧及び平均動脈血圧）、心拍数及び体温については各用量の投与前から投与後までテレメーターにより記録した。心電図及び動脈血圧波形についても各用量の投与前から投与後 24 時間まで収集した。また、試験 1、3、8、15 及び 22 日目における投与後 2 及び 24 時間に血液を採取し、ラロトレクチニブの血漿中濃度を測定した。

ラロトレクチニブの血漿中濃度は、投与後 24 時間においては用量比例的に増加したが、投与後 2 時間後においては用量比例性を超えて増加した（表 2.6.2.4- 8）。

表 2.6.2.4- 8 サルにおけるラロトレクチニブの単回経鼻胃内投与後の平均血漿中濃度

Dose:	**3mg/kg (Day 3)**		**10mg/kg (Day 8)**		**30mg/kg (Day 15)**		**100mg/kg (Day 22)**	
Time:	2 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h
Mean Concentration (ng/mL)	59	4	119	11	1795	38	5682	171

Data source: LOXO-101-SPHARM-003

ラロトレクチニブを 3、10、30 及び 100mg/kg の用量で単回経鼻胃内投与後において、忍容性は良好であった。ラロトレクチニブに関連した所見と考えられたのは、100mg/kg 投与後の 6 例中それぞれ 2 例及び 1 例でみられた嘔吐及び水様便のみであった。摂餌量、体重、平均動脈血圧及び体温について、ラロトレクチニブに関連する変化はみられなかった。また、いずれの用量においても明らかな心電図の異常はみられず、心電図パラメータ（QT 及び RR 間隔など）、更に補正 QT 間隔（QTcF：Fridericia 補正式）に対し影響はみられなかった。100mg/kg 投与後に心拍数の中等度の低下がみられ、これは夜間（消灯時）に顕著であった。しかし、100mg/kg（22 日目）の投与前においても、心拍数が媒体（1 日目）と比較し低値を示し、この心拍数の低下は通常、試験手順への馴化中にみられる現象である可能性が考えられたことから、ラロトレクチニブ投与と心拍数の低下（消灯時間中）との間に関連性はないと判断された。

当該試験において、100mg/kg 投与後にみられた一般状態及び心拍数の変化は程度が小さく、生理学的に問題とはならないと考えられた。以上より NOAEL は 100mg/kg であり、投与後 2 時間におけるラロトレクチニブの血漿中濃度は 5682ng/mL であった。無影響量（NOEL）は 30mg/kg であり、投与後 2 時間におけるラロトレクチニブの血漿中濃度は 1795ng/mL であった。

2.6.2.4.2.2.3.2　テレメーター非装着（反復投与毒性試験）

参照項目：　4.2.3.2.9 LOXO-101-TOX-006
4.2.3.2.10 LOXO-101-TOX-019

ラロトレクチニブの心血管系に対する影響について、心電図評価を組み込んだサルの 4 週間（2.6.6.3.2.4、LOXO-101-TOX-006、2.6.7.7.3）及び 13 週間（2.6.6.3.2.5、LOXO-101-TOX-019、2.6.7.7.4）反復経口投与毒性試験により検討した。

4 週間反復投与毒性試験において、ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量でカイニクイザル（雌雄各 5 例／群、2.3～4.2kg）に 1 日 1 回経口投与した。心電図評価は覚醒下の動物を用い、投与前（試験開始 12 日前）、2、14 及び 23 日目の各投与後の約 2 時間、並びに回復期間中にそれぞれ 1 回ずつ測定した。測定項目には、拡張期及び収縮期血圧（大腿部血圧測定用カフを用いた間接法により測定）、心電図検査（第Ⅰ、Ⅱ及びⅢ誘導）、心拍数、リズム解析、QRS、PR 及び QT 間隔を含めた。心電図パラメータにラロトレクチニブに関連する変化はみられなかった。

投与期間 2 日目の投与後 2 時間において、全用量群の雄で拡張期及び収縮期血圧の低下がみられた（10mg/kg 投与群の拡張期血圧を除く）（表 2.6.2.4- 9）。2 日目でみられた拡張期及び収縮期血圧の低下率は、投与前に比較しそれぞれ 3～19%及び 5～16%であり（表 2.6.2.4- 9）、程度が小さく生理学的意義は小さいと考えられたことから、これらの血圧低下は有害作用とは判断されなかった。同じ時点で媒体投与群の 5 例中 4 例には拡張期及び収縮期血圧の上昇がみられた。ラロトレクチニブ投与群のいずれにおいても、14 及び 23 日目、並びに回復期間での血圧低下は観察されなかったことから、当該血圧低下作用は投与初期の雄においてのみ発現する、ラロトレクチニブに関連する一過性の変化であると考えられた。雌では拡張期及び収縮期血圧共にラロトレクチニブに関連する影響はみられなかった。なお、2 日目の 100mg/kg 投与後 2 時間において、雌雄各 1 例に心拍数の低下がみられたが（雄で 230 回/分から 160 回/分、雌で 230 回/分から 150 回/分にそれぞれ低下）、これらの所見は他の時点では再現されなかったことから、有害作用とは判断されなかった。10～100mg/kg の用量レベルで、投与開始日の雌雄統合の C_{max} は 817～27900ng/mL（T_{max}：1～2 時間）であった。

表 2.6.2.4- 9 4 週間反復投与毒性試験における雄性サルの動脈血圧

Dose (mg/kg/day)	Arterial Blood Pressure Mean Values (mmHg)			
	Pretest (Day -12)		Day 2	
	Systolic	Diastolic	Systolic	Diastolic
0	163.0	97.8	180.0	104.0
10	159.4	91.8	152.0* (-5%)	88.6 (-3%)
30	167.2	91.6	140.6* (-16%)	85.8* (-6%)
100	158.4	91.6	142.8* (-10%)	74.2** (-19%)

*p ≤ 0.05, **p≤ 0.01: the original mean values were significantly different from their respective control means by ANOVA and Dunnett's test; parenthetical values indicate % differences from pretest value.
Data source：LOXO-101-TOX-006

13 週間反復投与毒性試験において、ラロトレクチニブを 0（媒体：コーン油）、10、30 及び 100mg/kg の用量でカニクイザル（雌雄各 5 例／群、2.1～3.1kg）に 1 日 1 回経口投与した。血圧（収縮期血圧、拡張期血圧、平均動脈血圧）は血圧測定用カフを用いて、投与前に 3 回、投与期間の 1 週目及び 13 週目に各 1 回（投与後約 2 時間）並びに回復期間中の 4 週目に 1 回測定した。心拍数及び心電図も血圧測定と同時期に記録した。QTc 間隔は Bazett 補正式を用いて算出した。心拍数及び心電図パラメータに関して、ラロトレクチニブに関連する変化はみられなかった。

ラロトレクチニブを 30 及び 100mg/kg を投与後 7 日目において、雄の拡張期血圧及び平均動脈血圧に一過性の低下がみられた（表 2.6.2.4- 10 及び表 2.6.2.4- 11）。これらの変化は、前述の試験（LOXO-101-TOX-006）でもみられたように、投与初期にみられるラロトレクチニブに関連した変化とみなされ、85 日目及び回復期間の時点では血圧に変化がみられなかったことから、一過性の変化と考えられた。

ラロトレクチニブを 30 及び 100mg/kg の用量で投与後 1 日目における C_{max} はそれぞれ、30mg/kg では 10400（雄）及び 5150ng/mL（雌）、100mg/kg では 29600（雄）及び 35300ng/mL（雌）であった（表 2.6.2.4- 12）。雄性サルのみでみられた所見を説明し得る雌雄間での曝露に差はみられなかった。

表 2.6.2.4- 10 13 週間反復投与毒性試験における雌雄サルの拡張期血圧

Dose (mg/kg/day)	Diastolic Blood Pressure (mmHg)					
	Predose (Day -20)		Day 7		Day 85	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females
0	91	76	74	68	91	91
10	68	78	54	71	89	60
30	68	75	52* (-23.5%)	59	62 (-8.8%)	86
100	89	72	52* (-41.6%)	56 (-22.2%)	91 (+2.2 %)	56 (-22.2%)

*p ≤ 0.05: the original mean values were significantly different from their respective control means by ANOVA and Dunnett's test; parenthetical values indicate % differences from pretest value.
Data source: LOXO-101-TOX-019

表 2.6.2.4- 11　13 週間反復投与毒性試験における雌雄サルの平均動脈血圧

Dose (mg/kg/day)	Mean Arterial Blood Pressure (mmHg)					
	Predose (Day -20)		Day 7		Day 85	
	Males	Females	Males	Females	Males	Females
0	111	97	93	90	102	109
10	89	92	74	88	102	81
30	89	93	71* (-20.2%)	79 (-15.1%)	76 (-14.6%)	99 (+6.5%)
100	105	90	73* (-30.5%)	72 (-20.0%)	105 (0 %)	77 (-14.4%)

*p ≤ 0.05: the origina mean values were significantly different from their respective control means by ANOVA and Dunnett's test; parenthetical values indicate % differences from pretest value.
Data source: LOXO-101-TOX-019

表 2.6.2.4- 12　サルにおけるラロトレクチニブ投与後の C_{max} 及び AUC(0-24)

Interval (Day)	Dose Level (mg/kg/day)	Sex	C_{max} (ng/mL)	AUC(0-24) (ng·hr/mL)
1	10	M	1110	3390
		F	896	2480
		MF	1000	2940
	30	M	10400	26900
		F	5150	16900
		MF	7760	21900
	100	M	29600	149000
		F	35300	167000
		MF	32500	158000
46	10	M	1140	3270
		F	657	2200
		MF	898	2730
	30	M	3240	12600
		F	3110	11800
		MF	3180	12200
	100	M	17900	73400
		F	14200	67800
		MF	16000	70600
91	10	M	701	2930
		F	779	2310
		MF	740	2620
	30	M	6800	19600
		F	6010	16600
		MF	6400	18100
	100	M	13500	53600
		F	19300	93800
		MF	16400	73700

Data source: LOXO-101-TOX-019

2.6.2.4.3 呼吸器系

2.6.2.4.3.1 ラット

参照項目：4.2.1.3.10 LOXO-101-SPHARM-011

覚醒かつ非拘束ラットにおいて、ラロトレクチニブ単回経口投与後の呼吸機能に対する影響をプレスチモグラフィーにより検討した。

ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で絶食下の雄性ラット（SD 系、234～310g）に単回経口投与した（各群 8 例）。陽性対照薬として、ペントバルビタールナトリウムを 35mg/kg の用量で腹腔内投与した（8 例）。

被験薬投与前 30 分から投与後 4 時間まで、呼吸数、吸気時間、呼気時間（Te）、弛緩時間（RT）、一回換気量、分時換気量、最大呼気流量（PEF）、最大吸気流量（PIF）及び Penh〔気管支収縮状態の指標、＝（Te/RT-1）×（PEF/PIF）〕を測定した。

ラロトレクチニブは最高用量 100mg/kg まで、媒体投与群と比較し、いずれの呼吸機能パラメータに対しても影響を及ぼさなかった。ラットの呼吸機能における NOEL は 100mg/kg であると判断された。

なお、ペントバルビタールナトリウムは、投与後 30～180 分において呼気時間の顕著な延長を伴う有意な呼吸数低下を示し、投与後 120～195 分において一回換気量の有意な軽度の上昇を示した。分時換気量の時間依存的な変化は、同時にみられた呼吸数及び一回換気量の変化を完全に反映していた。また、投与後 30～60 分において、媒体投与群と比較して Penh を軽度であるものの、上昇させた。

ラットの単回投与毒性試験におけるラロトレクチニブ 100mg/kg 投与後の曝露データ（2.6.6.2.1）を表 2.6.2.4- 13 に示した。

表 2.6.2.4- 13 ラットの単回投与毒性試験におけるラロトレクチニブ投与後のトキシコキネティックスデータ（平均値）

Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/mL)		AUC_{inf} (ng*h/mL)	
	Male	Female	Male	Female
100	7440	10700	32900	72900

Exposures from LOXO-101-TOX-001

2.6.2.4.3.2 サル

参照項目：4.2.3.2.10 LOXO-101-TOX-019

ラロトレクチニブの呼吸機能に対する影響について、サルの 13 週間反復経口投与毒性試験（LOXO-101-TOX-019、2.6.7.7.4）に組み込まれたバイタルサインにより評価した。当該毒性試験の詳細は 2.6.6.3.2.5 を参照のこと。

ラロトレクチニブを 0（媒体：コーン油）、10、30 及び 100mg/kg の用量で雌雄カニクイザル（各群 5 例、2.1～3.1kg）に 1 日 1 回反復経口投与した。被験薬投与前に 2 回、投与期間の 1 及

び 13 週目に各 1 回（投与後約 2 時間）並びに回復期間中の 4 週目に 1 回、覚醒下で呼吸数を記録した。なお、呼吸数は目視による観察又は触診で判定した。

ラロトレクチニブは最高用量 100mg/kg まで呼吸数に影響を及ぼさなかった。試験 91 日目における 100mg/kg 投与後の C_{max} 及び AUC(0-24)の雌雄平均値はそれぞれ 16400ng/mL 及び 73700ng*h/mL であった（表 2.6.2.4- 12）。

2.6.2.4.4　胃腸管系

2.6.2.4.4.1　腸管輸送能に対する影響

参照項目： 4.2.1.3.11 LOXO-101-SPHARM-007
4.2.1.3.12 LOXO-101-SPHARM-008

ラットを用いて、ラロトレクチニブの炭末輸送能に対する影響を検討した。

ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で絶食下の雄性ラット（SD 系、230-265g）に単回経口投与した（各群 10 例）（LOXO-101-SPHARM-007、非 GLP 試験）。陽性対照薬としてアトロピンを 2mg/kg で別群に単回経口投与した（8 例）。各被験薬投与後 30 分において、2.5%アラビアゴム及び 10%炭末で調整した懸濁液を各動物に経口投与（2mL）した。その 20 分後、動物を屠殺し、腸管（幽門部から回盲部まで）を摘出し、小腸の全長及び炭末移動距離を測定した。

ラロトレクチニブは媒体投与群と比較し用量依存的に腸管輸送を促進し（10、30 及び 100mg/kg でそれぞれ＋11、＋23 及び＋31%）、100mg/kg においては有意であった（$p<0.05$ vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparisons test）。なお、アトロピンは 2mg/kg の用量で、腸管輸送を阻害しなかったため、更に別群を設けてアトロピン 10mg/kg を投与した結果、媒体投与群と比較し腸管輸送を抑制した（－26%）。

ラロトレクチニブの腸管輸送能に対する影響がみられたことから、追試験を実施した。

ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で絶食下の雄性ラット（SD 系、241～306g）に単回経口投与した（各群 10 例）（LOXO-101-SPHARM-008）。陽性対照薬としてモルヒネを 20mg/kg で皮下投与した（10 例）。

ラロトレクチニブ又は媒体投与後 1 時間、あるいはモルヒネ投与後 45 分において、5%アラビアゴム及び 10%炭末で調節した懸濁液を各動物に経口投与（2.5mL）した。その 20 分後、動物を屠殺し、腸管を摘出し、小腸全長及び炭末移動距離を測定した。

媒体投与群及びラロトレクチニブ投与群のいずれにおいても、死亡又は一般状態の変化は観察されなかった。媒体投与群では背景値との比較において、腸管輸送距離は 38%低値であったが、ラロトレクチニブは全用量で媒体投与群に比較し腸管輸送を促進し（10、30 及び 100mg/kg でそれぞれ＋27、＋27 及び＋66%）、100mg/kg においては有意であった（$p=0.0001$ vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparisons test）。なお、モルヒネ（20mg/kg）は媒体投与群と比較し有意に腸管輸送を遅延させた。

雄性ラットの腸管輸送に対するラロトレクチニブの NOAEL は 30mg/kg であると判断された。

2.6.2.4.4.2　胃に対する刺激作用

参照項目：4.2.1.3.13 LOXO-101-SPHARM-009

ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で絶食下の雄性ラット（SD 系）に単回経口投与し、胃に対する刺激作用を検討した（各群 10 例）。陽性対照薬としてアスピリンを 250mg/kg で経口投与した（10 例）。被験薬投与後約 4 時間において、全例を屠殺し全胃を摘出した。胃組織上の損傷数をカウントし、点数化スケールにより評価した。なお、媒体及びラロトレクチニブ投与群のいずれにおいても死亡又は一般状態の変化は観察されなかった。

媒体投与群の全例において、胃の表面上に軽度の粘膜損傷が数ヵ所観察された。そのうち 1 例では出血性潰瘍も 1 ヵ所確認された。ラロトレクチニブを 10、30 及び 100mg/kg の用量で投与したいずれの動物においても、胃刺激症状は媒体投与群と同程度であった。予想されたように、アスピリン（250mg/kg）の経口投与により媒体投与群に比し胃刺激症状は有意に増加した。

雄性ラットの胃に対する刺激作用の NOAEL は 100mg/kg であると判断された。

2.6.2.4.4.3　胃酸分泌に対する影響

参照項目：4.2.1.3.14 LOXO-101-SPHARM-010

ラロトレクチニブを 0（媒体：Labrafac™ Lipophile WL 1349）、10、30 及び 100mg/kg の用量で絶食下の雄性ラット（SD 系、162～252g）に単回経口投与し、胃酸分泌に対する影響を検討した（各群 10 例）。陽性対照としてペンタガストリンを 32μg/kg で皮下投与し、ペンタガストリンの対照群（陰性対照）として注射用水を皮下投与した（それぞれ 10 例）。被験薬投与後約 1 時間、又は対照群では投与後 15 分において幽門を結紮した。幽門の結紮後約 4 時間において、動物を屠殺して胃を摘出後、胃液量及び pH を測定した。なお、胃の摘出後に剖検は実施しなかった。媒体及びラロトレクチニブ投与群のいずれにおいても、死亡又は一般状態の変化は観察されなかった。

媒体投与群では陰性対照群と比較し、4 時間で得られた総胃液分泌量、分泌胃液の pH 又は酸性度に有意な影響はみられなかった。

ラロトレクチニブを 10 及び 30mg/kg で経口投与後、総胃液分泌量及び分泌胃液の酸性度は媒体投与群と比較し影響はみられなかった。しかし、ラロトレクチニブを 100mg/kg で経口投与後、総胃液分泌量及び分泌胃液の酸性度は媒体投与群と比較し増加した（いずれも $p<0.001$ vs 媒体投与群、Dunnett's multiple comparison test）。なお、ペンタガストリンは 4 時間の分泌後に得られた総胃液分泌量及び分泌胃液の酸性度を増加させた。

結論として、ラロトレクチニブは 100mg/kg の経口投与で胃液の分泌及び酸性度を増加させることが確認された。雄性ラットの胃酸分泌におけるラロトレクチニブの NOAEL は 30mg/kg であると判断された。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

ラロトレクチニブはヒト TRK 受容体（TRKA、TRKB 及び TRKC）に対する特異的阻害薬であり、薬理学的、薬物動態学的及び安全性プロファイルから新規の抗がん剤として期待される。

ラロトレクチニブは *in vitro* において、ヒト TRKA 受容体に対し 11.5nM（IC_{50}値）の結合親和性を示した。細胞系アッセイにおいて、ラロトレクチニブは TRKA のリン酸化及び恒常的活性型 TRKA の自己リン酸化をそれぞれ 9.8 及び 6.4nM の IC_{50}値で阻害した。ラロトレクチニブは、TRKA とほぼ同程度に TRKB 及び TRKC のキナーゼ活性を阻害した。

癌患者由来の TRKA 又は TRKC 融合タンパク質を発現する KM12 細胞、CUTO-3.29 細胞及び MO-91 細胞をマウスに移植した異種移植モデルにおいて、ラロトレクチニブは 60 及び 200mg/kg の 14 日間反復経口投与により、いずれの動物モデルにおいても顕著な腫瘍増殖抑制作用を示した。なお、当該異種移植モデルでの抗腫瘍効果は 60mg/kg でほぼ最大に達しており（図 2.6.2.2- 13）、この投与量におけるラロトレクチニブの C_{max} 及び AUC(0-24)は、それぞれ 1090ng/mL 及び 14100ng*h/mL であった。これは、成人に臨床推奨用量（100mg を 1 日 2 回）投与後の C_{max}〔1042（1 日目）及び 914（8 日目）ng/mL（それぞれ n＝39 及び 37）〕、並びに AUC(0-24)〔5033（1 日目）及び 5410（8 日目）ng*h/mL（それぞれ n＝39 及び 37）〕（2.7.2.3.9）と大きな開きはみられず、当該マウスモデルにおける試験成績から臨床でのラロトレクチニブの有効性が期待される。

ラロトレクチニブは TNK2 に対し弱い阻害作用を示したものの（IC_{50}：1188nM）、そのほかの 226 種類のキナーゼに対しては阻害作用を示さなかった。受容体、酵素及び核内ターゲットに対する 80 種類の広範なスクリーニングを実施した結果、ラロトレクチニブはこれらのターゲット分子に対し相互作用を示さなかった。

マウス及びラットを用いた種々の疼痛モデルを用いて、ラロトレクチニブの作用を検討した結果、痛覚過敏及び侵害受容に対する抑制作用を示した。

安全性薬理試験は独立した試験のほかに、心血管系、呼吸器系及び中枢神経系の安全性薬理エンドポイントを組み込んだ反復投与毒性試験により検討した。

ラロトレクチニブの心血管系に対する評価は、 *in vitro* での hERG 試験、単回又は反復経口投与後のテレーター装着覚醒ラット及びサル、静脈内持続投与後のテレメーター装着麻酔イヌを用いた安全性薬理試験、並びに心電図評価を組み込んだサルの 4 及び 13 週間反復投与毒性試験により実施した。心電図（13 週間反復投与毒性試験は除く）については、学会認定の獣医学心臓病専門家が評価した。当該専門家による評価報告書（4.2.1.3.5）では、レビューを実施したいずれの試験においても、ラロトレクチニブが心臓の電気生理学的パラメータに問題となる影響を及ぼさなかったと結論された。

ラットにおいて、ラロトレクチニブを 300mg/kg で単回経口投与後 6 時間まで、軽度の血圧上昇がみられた。これとは逆に、ラロトレクチニブをサルに経口投与後、血圧の低下がみられ、テレメーター装着サルの 1 例において、200mg/kg を単回投与後、動脈血圧の低下、心拍数の増加及び脈圧の低下が観察された。当該用量は 3 例すべてに嘔吐を誘発し、そのうち 2 例は低曝露での発現であった。しかし、テレメーター装着サルを用いた別の試験では、100mg/kg を投与後 2 時間での血漿中濃度が最高 5682ng/mL に達する条件で血圧に変化はみられなかった。一方、テレメーター非装着サルを用いた 4 及び 13 週間反復投与毒性試験のいずれにおいても、軽度ではあるが血圧低下が認められた（2.6.2.4.2.2.3.2、2.6.6.3.2.4 及び 2.6.6.3.2.5）。4 週間反復投与毒性試験において、試験 2 日目に 10mg/kg 以上の用量で血圧低下がみられたが、投与期間後期

の 14 及び 23 日目の時点ではみられなかった。また、13 週間反復投与毒性試験では、30 及び 100mg/kg 投与後 7 日目において、拡張期血圧及び平均動脈血圧に一過性の低下がみられたが、4 週間反復投与毒性試験と同様に、投与期間後期の 85 日目及び回復期間では血圧に変化はみられなかった。以上より、テレメーター装着サルの 1 例を除き、いずれの試験においても血圧低下及び心拍数増加は一貫した血行動態に対する影響ではなかったことから、有害作用ではないと考えられた。同様に、サルとは対照的にラットでは血圧の上昇がみられたものの、有害作用ではないと考えられた。臨床における安全性データベース（全 279 例）では、高血圧がラロトレクチニブ投与下で 26 例（9%）に発現した。そのうち 4 例（1%）が CTCAE グレード 3 であったが（表 2.7.4.2- 3）、治験責任（分担）医師によりラロトレクチニブと関連ありと判断されたのはわずか 1 例であった（5.3.5.3.3 ISS/Table 14.4.4.1）。また、低血圧が 18 例（6%）に発現し、そのうち 3 例（1%）がグレード 3 であったが、いずれもラロトレクチニブと関連性なしと判断された（5.3.5.3.3 ISS/Table 14.4.4.1）。ラット中脳の TRKB 受容体における研究では、TRKB 受容体が血圧調整に何らかの役割を担っている可能性が示唆されている[11] ものの、安全性薬理試験及び反復投与毒性試験で観察された一過性の血圧変化の機序は不明である。

ラロトレクチニブの心臓の電気生理学的パラメータに対する影響を、*in vitro* での hERG 試験、前述したラット及びサルを用いた安全性薬理試験、並びにサルの反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.4 及び 2.6.6.3.2.5）において検討した。ラロトレクチニブは極めて高濃度で hERG カリウム電流を抑制した（IC_{50}：147μM）。サルのいずれの試験においても、QTc 間隔を含む心電図パラメータにラロトレクチニブによる影響はみられなかった。臨床薬理 QT 試験（2.7.2.2.2.2）において、健康成人にラロトレクチニブ 100～900mg の用量（臨床推奨用量又はそれを超える用量範囲）を単回経口投与後、QTcF 間隔を含む電気生理学的パラメータに影響はみられなかった。なお、900mg 投与後の C_{max} は 7437ng/mL であった。以上の非臨床試験成績及び臨床試験成績から、ラロトレクチニブがヒトへの催不整脈性リスクを有する可能性は極めて低いと考えられる。

ラロトレクチニブの胃腸管系に対する影響を検討した試験において、ラロトレクチニブは全用量でラットの腸管輸送を促進し、100mg/kg で胃液の分泌及び酸性度（総胃液分泌量及び分泌胃液の酸性度）を増加させ、NOAEL は 30mg/kg であった。最高用量 100mg/kg まで、ラロトレクチニブはラットの胃に対する刺激作用を示さなかった。また、2.6.6.3.2.1 に記載されているように、サルにおいて、75mg/kg 以上で観察された嘔吐及び下痢は、当該安全性薬理試験成績から主に腸管輸送の促進作用による可能性が考えられ、200mg/kg が制限用量であった。臨床における安全性データベース（全 279 例）では、下痢がラロトレクチニブ投与下で 73 例（26%）に発現したが、その大半はグレード 1 であった（表 2.7.4.2- 3）。

TRK 受容体が発達過程にある脳において役割を担っている可能性があることから、脳における TRK 受容体阻害が影響を及ぼす可能性について考察する。3 種類のすべての TRK 受容体が脳の発達に役割を担うと考えられている。これらの TRK 受容体によるシグナルを阻害することにより、*in vitro* で培養神経細胞に直接アポトーシスが引き起こされ、逆に、それぞれの受容体に対応するニューロトロフィンを神経細胞に添加すると、神経細胞の生存が促進されることが報告されている[12]。また、ノックアウトマウスを用いた研究で、TRK 受容体が神経発達に重要な役割を果たしていることが報告されている[13, 14, 15, 16]。より関連性が高いものとして、TRK 阻害薬を投与された患者では、休薬により中枢神経系機能の回復する兆候がみられることが挙げられる。例えば、PHA-848125AC〔TRKA 及びサイクリン依存性キナーゼ（CDK）の二重阻害剤、Nerviano Medical Science、イタリア〕の第Ⅰ相臨床試験において、3 例の患者が運動失調及び 2 例の患者が振戦を発現した。最高用量を投与した 1 例の患者でグレード 4 の運動失調を発現している[17]。更に、エヌトレクチニブ（TRK、ROS1 及び ALK に対するマルチキナーゼ阻害剤）の第Ⅰ相臨床試験の最新データにおいて、2 種類の用量制限毒性（DLT）のうちの一つにグレード 3 の認知障害がみられ、また 29%の患者に投与に関連性のある知覚異常（グレード 1）、及び第Ⅱ相臨床

試験の推奨用量を投与された患者の 13%及び 16%に、それぞれめまい及び末梢感覚神経障害が観察された[18, 19]。

ラロトレクチニブはラットのマイクロダイアリシス試験において、中枢神経系への軽度の透過性を示した。非結合型ラロトレクチニブの脳内濃度は非結合型血漿中濃度よりも低かった（2.6.4.4.1.2）。また、LE ラットを用いた全身オートラジオグラフィーにおいて、[^{14}C]-ラロトレクチニブ由来の放射活性は血液脳関門を介して脳室周辺以外の中枢神経系組織に分布しなかった（2.6.4.4.1.3）。

安全性薬理試験において、ラットの Irwin 試験ではラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった（2.6.2.4.1.1）。ラロトレクチニブを 60mg/kg でマウスに 48 日間反復経口投与後、神経筋機能（ロータロッド試験）に影響はみられなかった。逆に、100mg/kg でラットに 1 日 2 回 42 日間反復経口投与した毒性試験において、ロータロッド試験成績が低下した。しかし、この所見は毒性学的に関連性があるとは判断されなかった。最高 100mg/kg まで成熟ラットに 1 日 2 回反復経口投与した毒性試験において、ラロトレクチニブは神経行動学的活性及び運動性に対し問題となる所見を示さなかった。加えて、最高 300 及び 100mg/kg までそれぞれサルに 14 日間及び 4 週間反復経口投与した毒性試験において、最高 100mg/kg までサルの FOB 及び運動性の評価（14 日間試験）並びに神経行動学的評価（4 週間試験）に問題となる所見はみられなかった。しかし、2.6.6.11 で記載したように、複数の反復投与毒性試験において、中枢神経系関連の兆候が一般状態観察の一部としてみられた。すなわち、一過性かつ低頻度の中枢神経系関連の兆候が妊娠したラット及びウサギ（2.6.6.11）でみられた。臨床における安全性データベース（全 279 例）では、ラロトレクチニブ投与下で 5%以上の患者で発現した神経学的事象は大部分がグレード 1 又は 2 であった。5%以上の患者で報告された事象には、浮動性めまい（73 例、26%）、頭痛（42 例、15%）、不眠症（20 例、7%）、錯感覚（18 例、6%）及び味覚異常（16 例、6%）がみられたが、いずれもグレード 3 を超えた患者はみられなかった（表 2.7.4.2- 3）。

幼若ラットの反復投与毒性試験において、FOB 評価で明らかになったラロトレクチニブに関連する所見として、生後 61 日及び生後 86 日に 7.5/22.5mg/kg を 1 日 2 回投与後、瞼における変化〔眼瞼下垂（軽度又は半目）又は完全な閉眼〕がみられた。当該毒性試験（2.6.6.7.3）において中枢神経系に関連した所見は高用量でのみみられ、一過性で発現頻度は低かった。当該所見には、生後 21～23 日の期間において、3 例の雄及び 2 例の雌にみられた首振り及び旋回が含まれ、その発現頻度は 1 又は 2 回と限定的であった。生後 61 日でみられた神経筋に対する影響には、雄における回復期間中まで持続する後肢の握力の低下（7.5/22.5mg/kg 投与群）、及び後肢の着地開足幅の低下（2/6mg/kg 及び 7.5/22.5mg/kg 投与群）が含まれた。しかし、これらの雄でみられた所見は体重変化に伴う二次的なものであると考えられた。雌においてはラロトレクチニブ投与に関連する影響はみられなかった。FOB 評価において、そのほかにラロトレクチニブに関連する所見はみられなかった。また、神経組織の顕微鏡所見で異常は認められなかった。聴覚驚愕反応及び学習記憶の評価（Biel 迷路遊泳試験）において、ラロトレクチニブに関連する影響はみられなかった。したがって、神経行動学的毒性における NOAEL は高用量の 7.5/22.5mg/kg（1 日 2 回）であると考えられた。小児患者において、神経症状は TRK 阻害によるオンターゲット毒性の可能性がある。しかし、前述した神経学的 TEAE のうち、浮動性めまい、不眠症、錯感覚及び味覚異常は、小児（18 歳未満）で成人（18 歳以上）よりも発現割合は低く（2.7.4.2.1.5.2）、全 92 例中それぞれ、7 例（8%）、4 例（4%）、2 例（2%）及び 2 例（2%）であった（5.3.5.3.3 ISS/Table 14.4.26.1.1）。

ラットのプレスチモグラフィーを用いた試験において、ラロトレクチニブは最高用量 100mg/kg まで呼吸機能に影響を及ぼさなかった。また、サルの 13 週間反復経口投与毒性試験において、最高用量 100mg/kg まで呼吸数に影響を及ぼさなかった。臨床における安全性データベース（全 279 例）では、呼吸困難がラロトレクチニブ投与下で 47 例（17%）にみられた（表

2.7.4.2- 3）。そのうち 7 例（3%）がグレード 3 であったが、治験責任（分担）医師により、いずれもラロトレクチニブと関連なしと判断された（5.3.5.3.3 ISS/Table 14.4.4.1）。

GLP 下で実施した安全性薬理試験及び安全性薬理エンドポイントを組み込んだ毒性試験において観察されたラット及びサルの NOAEL におけるラロトレクチニブの C_{max} 及び AUC(0-24)、及びこれらの曝露比を表 2.6.2.6- 1 にまとめた。曝露比の算出には、患者に 100mg を 1 日 2 回投与後の血漿中濃度の平均値を用いた。

以上、効力を裏付ける試験の成績から、ラロトレクチニブは TRK ファミリー依存性腫瘍の増殖を抑制するのに適した薬理学的プロファイルを有することが示された。安全性薬理試験及びオフターゲット分子に対するスクリーニング試験から、QT 間隔延長による催不整脈リスク及びオフターゲット分子を介する薬理作用を誘発するリスクを有する可能性は極めて低いと考えられる。なお、全身血圧及び心拍数に対し影響を及ぼす可能性が示唆されたため、臨床においてモニターすることが推奨される。また、中枢神経系に関連する所見が幼若ラット、妊娠ラット及び妊娠ウサギで認められたため、これらについてもモニターすることが推奨される。

表 2.6.2.6- 1 GLP 下の安全性薬理試験及び安全性薬理エンドポイントを組み込んだ毒性試験における特記すべき所見、NOAEL における曝露データ及びヒト曝露に対する安全域

Key Response (s)	Dose (mg/kg/day)	AUC_{0-24}[a] (ng^*h/mL)	Cmax[a] (ng/mL)	Exposure Margin, PO[a,b,c]
Central Nervous System				
Safety pharmacology study (Irwin test) – Rat				
No effect	100 ($600mg/m^2$) (NOAEL)	32900[j]	7440[j]	8 (C_{max}) 6 (AUC)
4-week repeat-dose study – Rat (adult)				
Functional operational behavior and motor activity – no effect	200 ($1200mg/m^2$) (high dose)	118200 (M) 198400 (F)	11300 (M) 19100 (F)	12-21 (C_{max}) 22-37 (AUC)
13-week repeat-dose study – Rat (adult)				
FOB and motor activity – no effect	75/100/150 ($450/600/900mg/m^2$) (M) 40/100/150 ($240/600/900mg/m^2$) (high dose) (F)	36700 (M) 14400 (F)	5510(M) 2230 (F)	2-6 (C_{max}) 3-7 (AUC)
Juvenile repeat-dose study – Rat				
Neuromuscular: Lower mean hindlimb grip-strength value, and hindlimb footsplay at 7.5/22.5mg/kg/dose BID; lower mean footsplay at 2/6mg/kg/dose BID Motor activity: Higher mean total and ambulatory counts in males at 2/6 and 7.5/22.5mg/kg/dose BID Audible Startle response: No effect Biel Maze Swimming Trials: No effect	15/45 ($90/270mg/m^2$) (NOAEL)	12900 (M) 22300 (F)	1710 (M) 3310 (F)	2 (M)/ 4 (F) (C_{max}) 2 (M)/ 4 (F) (AUC)
4-week repeat-dose study – Monkey				
Neurobehavioral battery – no effect	100 ($1200mg/m^2$) (high dose)	32200 (high dose)	6560 (high dose)	7 (C_{max}) 6 (AUC)

[a]: AUC and C_{max} values indicate mean total plasma concentrations unless specified otherwise. Reported values were obtained at the end of the dosing phase in repeat-dose studies.
[b]: The AUC margin following PO administration was calculated as $AUC_{0\ 24,\ animal}/AUC_{0-24,\ human}$, where $AUC_{0-24,\ human}$ is $5410ng^*h/mL$.
[c]: The C_{max} margin following PO administration was calculated as $C_{max,\ animal}/C_{max,\ human}$, where $C_{max,\ human}$ is 914ng/mL.
[j]: AUC_{0-24} for male rats on Day 1 of single dose study (Module 2.6.6.2.1). M: Male, F: Female

表 2.6.2.6- 1 GLP 下の安全性薬理試験及び安全性薬理エンドポイントを組み込んだ毒性試験における特記すべき所見、NOAEL における曝露データ及びヒト曝露に対する安全域（続き）

Key Response (s)	Dose (mg/kg/day)	AUC_{0-24}[a] (ng^*h/mL)	Cmax[a] (ng/mL)	Exposure Margin PO[a,b,c]
Cardiovascular Studies				
hERG				
IC_{50} of larotrectinib	147μM[e]	N/A	274[d] (640nM)	230[d]
Cardiovascular – Telemetry-Instrumented Conscious Monkey				
No hemodynamic or ECG effects	100 ($1200mg/m^2$) (NOAEL)	N/A	5682[f]	6 (C_{max})
4-week Repeat-dose - Monkey				
Decrease in diastolic and systolic blood pressure No changes in ECGs	10 – 100 (120 -$1200mg/m^2$)	N/A	817-27900[g]	0.9-31 (C_{max})
13-week Repeat-dose - Monkey				
Decrease in MAP and diastolic blood pressure	30 & 100 (360 & $1200mg/m^2$)	N/A	7760 & 32500[h]	8-36 (C_{max})
13-week Repeat-dose - Monkey				
No change in ECGs or vital signs or respiratory function	100 ($1200mg/m^2$) (NOAEL)	53600 (M) 93800 (F)	13500 (M) 19300 (F)	10-17 (AUC) 15-21 (C_{max})

[a]: AUC and C_{max} values indicate mean total plasma concentrations unless specified otherwise. Reported values were obtained at the end of the dosing phase in repeat-dose studies.
[b]: The AUC margin following PO administration was calculated as $AUC_{0-24, animal}/AUC_{0-24, human}$, where $AUC_{0-24, human}$ is 5410ng^*h/mL.
[c]: The C_{max} margin following PO administration was calculated as $C_{max, animal}/C_{max, human}$, where $C_{max, human}$ is 914ng/mL.
[d]: Unbound C_{max} dose level/unbound $C_{max, human}$, where the mean unbound $C_{max, human}$ is 274ng/mL or 640nM, based on f_u of 0.3 for larotrectinib in humans. Geometric mean values were used for $C_{max, human}$.
[e]: IC_{50} value for hERG assay
[f]: C_{max} at 2 hours post-dose
[g]: C_{max} on Day 0 of 28-day study (Module 2.6.6.3.2.4)
[h]: C_{max} on Day 1 of 91-day study (Module 2.6.6.3.2.5)
N/A: not applicable, M: Male, F: Female

表 2.6.2.6- 1 GLP 下の安全性薬理試験及び安全性薬理エンドポイントを組み込んだ毒性試験における特記すべき所見、NOAEL における曝露データ及びヒト曝露に対する安全域（続き）

Key Response (s)	Dose (mg/kg/day)	AUC_{0-24}[a] (ng*h/mL)	Cmax[a] (ng/mL)	Exposure Margin PO[a,b,c]
Respiratory System				
Respiratory Function - Rat				
No effect	100 (600mg/m^2) (NOEL)	32900[j]	N/A	6 (AUC)
13-week Repeat-dose - Monkey				
No effect	100 (1200mg/m^2) (NOAEL)	53600 (M) 93800 (F)	N/A	10-17 (AUC)
Gastrointestinal (GIT)				
Gastrointestinal Motility (rat)				
Increase in motility at all doses	30 (180mg/m^2) (NOAEL)	2420[i]	N/A	0.4 (AUC)
Gastric Irritation (rat)				
No effect	100 (600mg/m^2) (NOAEL)	32900[j]	N/A	6 (AUC)
Gastric Secretion (rat)				
Increase in secretion at 100mg/kg	30 (180mg/m^2) (NOAEL)	2420[i]	N/A	0.4 (AUC)

[a]: AUC and C_{max} values indicate mean total plasma concentrations unless specified otherwise. Reported values were obtained at the end of the dosing phase in repeat-dose studies.
[b]: The AUC margin following PO administration was calculated as $AUC_{0-24, animal}/AUC_{0-24, human}$, where $AUC_{0-24, human}$ is 5410ng*h/mL.
[c]: The C_{max} margin following PO administration was calculated as $C_{max, animal}/C_{max, human}$, where $C_{max, human}$ is 914ng/mL.
[i]: AUC_{0-24} for male rats on Day 1 of 7-day repeat-dose study (Module 2.6.6.3.1)
[j]: AUC_{0-inf} for male rats on Day 1 of single dose study (Module 2.6.6.2.1)
N/A: not applicable, M: Male, F: Female

2.6.2.7　　図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献一覧

1) Amatu A et al., ESMO Open 2016:1:e000023 (4.3.1)

2) Vaishnavi A et al., Cancer Discov 2015:5:25-34 (4.3.18)

3) Arevalo JC et al., Mol Cell Biol 2000:20:5908-5916 (4.3.2)

4) Arevalo JC et al., Oncogene 2001:20:1229-1234 (4.3.3)

5) Reuther GW et al., Mol Cell Biol 2000:20:8655-8666 (4.3.13)

6) Puig de la Bellacasa R, et al., Transl Lung Cancer Res 2013:2:72-86 (4.3.11)

7) Raeppel SL et al., International Journal of Medicinal Chemistry 2012:Article ID 412614 (4.3.12)

8) Somaschini A et al., XIV National Congress of Medical Oncology 2012:B61 (4.3.17)

9) Jin H et al., J Invest Dermatol 2009:129:31-40 (4.3.38)

10) Biel WC J Genet Psychol 1940:56:439-453 (4.3.4)

11) Clark CG et al., J Neurosci 2011:31:12318-12329 (4.3.5)

12) Kalb R, Trends Neurosci 2005:28:5-11 (4.3.10)

13) Skaper SD, CNS Neurol Disord Drug Targets 2008:7:46-62 (4.3.14)

14) Smeyne RJ, Nature 1994:368:246-249 (4.3.15)

15) Snider WD, Cell 1994:77:627-638 (4.3.16)

16) Crowley C et al., Cell 1994:76:1001-1011 (4.3.6)

17) Weiss GJ et al., Invest New Drugs 2012:30:2334-2343 (4.3.19)

18) Drilon A et al., Cancer Discov 2017:7:400-409 (4.3.7)

19) Liu D et al., Ther Clin Risk Manag 2018:14:1247-1252 (4.3.8)

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

試験一覧表は、2.6.3.2、2.6.3.3、2.6.3.4 及び 2.6.3.5 を参照。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: **Larotrectinib**

Primary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID or literature)
In vitro					
Binding affinity to TRK receptors	No	*In vitro*	Addition to media	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-001 4.2.1.1.1 (R-12432)
Inhibition of activity of TRKA, TRKB, and TRKC receptors in cell lines	No	*In vitro*	Addition to media	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-002 4.2.1.1.2 (R-12433)
Inhibition of activity of clinically-relevant *NTRK1* gene-fusion TRKA receptors in cell lines	No	*In vitro*	Addition to media	School of Medicine, University of Colorado, Aurora, CO USA	4.2.1.1.3 (Nat Med 2013-19-1469)
Effect of larotrectinib on cells expressing a TRKB gene fusion	No	*In vitro*	Addition to media	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-029 4.2.1.1.4 (R-12450)
Effect of larotrectinib on 87 diverse cell lines	No	*In vitro*	Addition to media	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-033 4.2.1.1.5 (R-12451)
Sequence homology and ATP binding site in TRK family kinases from different species	No	*In silico*	-	Bayer AG, Germany	4.2.1.1.12 (PH-41270)

Test Article: **Larotrectinib**

Primary Pharmacodynamics – Overview (continued)

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
In vivo					
Effects on TRKA activity in ΔTRKA tumor-bearing xenograft model	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-003 4.2.1.1.6 (R-12434)
Effects on growth of a TRKA dependent tumor cell line in xenograft model	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-022 4.2.1.1.7 (R-12443)
Inhibition of TRKA-mediated tumor growth in mice - dose response	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-024 4.2.1.1.8 (R-12435)
Inhibition of pTRKA and pERK in tumor allografts	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-025 4.2.1.1.9 (R-12436)
Inhibition of TRKA-mediated tumor growth in KM12 xenograft model	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-028 4.2.1.1.10 (R-12449)
Inhibition of tumor growth in KM12 (*TPM3-NTRK1*), CUTO3.29 (*MPRIP-NTRK1*) and MO-91 (*ETV6-NTRK3*) xenograft models	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-029 4.2.1.1.4 (R-12450)
Inhibition of tumor growth in Sh-SY5Y (*NTRK2*, TRKB) xenograft model	No	Mouse/ Ncr:Nu/Nu	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-026 4.2.1.1.11 (R-12448)

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: **Larotrectinib**

Secondary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
In vitro					
Inhibition of enzymatic activity of non-TRK kinases	No	*In vitro*	Addition to media	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-001 4.2.1.1.1 (R-12432)
Effects on non-target receptors *in vitro*	No	Radioligand binding	*In vitro*	[redacted] Taiwan	LOXO-101-PHARM-019 4.2.1.2.1 (R-12468)
Effects on non-target receptors, transporter and enzyme *in vitro*	No	Radioligand binding Cellular functional assay Enzyme assay	*In vitro*	[redacted] France	LOXO-101-PHARM-020 4.2.1.2.2 (R-12469)
Effects on non-target nuclear receptors *in vitro*	No	Reporter gene assay	*In vitro*	[redacted] Germany	LOXO-101-PHARM-021 4.2.1.2.3 (R-12470)
In vivo					
Effect on neuropathic pain	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-004 4.2.1.2.15 (R-12499)
Effect on UV Induced Thermal Hyperalgesia	No	Rat	Oral	[redacted]	LOXO-101-PHARM-005 4.2.1.2.14 (R-12498)
Effect on CFA-induced pain in the rat hind foot pad	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-006 4.2.1.2.5 (R-12497)
Dose response on CFA-induced hyperalgesia	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-007 4.2.1.2.6 (R-12500)
Onset of action on CFA-induced hyperalgesia	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-008 4.2.1.2.7 (R-12501)

Test Article: **Larotrectinib**

Secondary Pharmacodynamics – Overview (continued)

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
In vivo					
Dose response on CFA-induced hyperalgesia model	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-009 4.2.1.2.8 (R-12506)
Comparison to Nerve Growth Factor antibody in CFA-induced hyperalgesia model	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-010 4.2.1.2.9 (R-12507)
Effect on normal thermal sensory perception	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-011 4.2.1.2.4 (R-12505)
Effect in CFA-induced thermal hyperalgesia model	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-012 4.2.1.2.10 (R-12510)
Effect on pain-associated behaviors in fracture pain model	No	Mouse/ C3H/HeJ	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-013 4.2.1.2.18 (R-12515) 4.2.1.3.3 (Bone 2011-48-389)
Effect on thermal hyperalgesia in the rat CFA model.	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-014 4.2.1.2.11 (R-12514)
Effect on Developing Type II Collagen Arthritis	No	Rat/ Lewis	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-015 4.2.1.2.16 (R-12509)
Effect on Established Type II Collagen Arthritis	No	Rat/ Lewis	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-016 4.2.1.2.17 (R-12512)
Effect in NC/NG Atopic Dermatitis Model	No	Mouse/ NC/Nga transgenic	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-017 4.2.1.2.20 (R-12511)

Test Article: **Larotrectinib**

Secondary Pharmacodynamics – Overview (continued)

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
In vivo					
Effect in CFA-induced thermal hyperalgesia model	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-018 4.2.1.2.12 (R-12508)
Effect in a rat model of post-operative pain	No	Rat	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-PHARM-023 4.2.1.2.13 (R-12513)
Effect in bone cancer pain model	No	Mouse/ C3H/HeJ	Oral	Research Service VA Medical Center, Minneapolis, MN USA	4.2.1.2.19 (Mol Pain 2010-6-1)

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: **Larotrectinib**

Safety Pharmacology – Overview

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID or literature)
Central Nervous System					
Neuromuscular function (rotorod)	No	Mouse/ C3H/HeJ	Oral	Research Service VA Medical Center, Minneapolis, MN USA	4.2.1.3.3 (Bone 2011-48-389)
Irwin test	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] France	LOXO-101-SPHARM-012 4.2.1.3.4 (R-12441)
Neuromuscular function (rotorod)	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-012 4.2.3.2.3 (R-12446)
Neurobehavioral effects in rats	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] France	LOXO-101-TOX-003 4.2.3.2.4 (R-12422)
Neurobehavioral effects in rats	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-018 4.2.3.2.5 (R-12400)
Neurobehavioral effects in juvenile rats	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-021 4.2.3.5.4.3 (R-12417)
Neurobehavioral effects in monkeys	Yes	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-004 4.2.3.2.7 (R-12423)
Neurobehavioral effects in monkeys	Yes	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] France	LOXO-101-TOX-006 4.2.3.2.9 (R-12414)

Test Article: **Larotrectinib**

Safety Pharmacology – Overview (continued)

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
Cardiovascular System					
Inhibition of hERG potassium channel	No	Transgenic HEK293 cells	*In vitro*	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-002 4.2.1.3.1 (R-12461)
Inhibition of hERG potassium channel	Yes	Transgenic HEK293 cells	*In vitro*	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-001 4.2.1.3.2 (R-12459)
Cardiovascular safety in telemetered conscious rats	No	Rat	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-004 4.2.1.3.6 (R-12462)
Cardiovascular safety in telemetered unconscious dogs	No	Dog	IV infusion (30 min)	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-006 4.2.1.3.7 (R-12464)
Cardiovascular safety in telemetered conscious monkeys	No	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-005 4.2.1.3.8 (R-12463)
Cardiovascular safety in telemetered conscious monkeys	Yes	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-003 4.2.1.3.9 (R-12439)
Cardiovascular safety in monkeys	Yes	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] France	LOXO-101-TOX-006 4.2.3.2.9 (R-12414)
Cardiovascular safety in monkeys	Yes	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-019 4.2.3.2.10 (R-12410)
Evaluation of cardiovascular safety pharmacology studies	-	-	-	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-013 4.2.1.3.5 (R-12467)

Test Article: **Larotrectinib**

Safety Pharmacology – Overview (continued)

Type of Study/Description	GLP	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number Location in CTD (Report ID)
Respiratory System					
Respiratory function in rats	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] France	LOXO-101-SPHARM-011 4.2.1.3.10 (R-12466)
Respiratory function in monkeys	Yes	Monkey/ cynomolgus	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-TOX-019 4.2.3.2.10 (R-12410)
Gastrointestinal Tract					
Charcoal propulsion	No	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] USA	LOXO-101-SPHARM-007 4.2.1.3.11 (R-12465)
Charcoal propulsion	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] France	LOXO-101-SPHARM-008 4.2.1.3.12 (R-12440)
Gastric irritation	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] France	LOXO-101-SPHARM-009 4.2.1.3.13 (R-12456)
Gastric secretion	Yes	Rat/ Sprague Dawley	Oral	[redacted] France	LOXO-101-SPHARM-010 4.2.1.3.14 (R-12460)

Safety Pharmacology – *In-vitro* studies

Test system: hERG in Stably Transfected HEK293 cells **Positive control**: E-4031[a] **Temperature**: room temperature	**Date of Initiation:** Aug 6th 2008 FASTPatch® hERG Screen assay		**Test Article:** Larotrectinib **Study No.:** LOXO-101-SPHARM-002 **Report ID:** R-12461 **GLP compliance:** No
Test Article	**Concentration (µM)**	**Number of Cells Evaluated**	**% Inhibition of hERG Channel Current (± SEM)**
Larotrectinib	1	3	-0.6 ± 1.6
	10	3	0.6 ± 2.3

[a] = Results with E-4031 were consistent with ChanTest historical data, validating the performance of the assay system.

Safety Pharmacology – *In-vitro* studies (continued)

Test system: hERG in Stably Transfected HEK293 cells **Positive control**: Terfenadine[a] **Temperature**: near-physiological temperature (33 to 35 ºC)	**Date of Initiation:** Feb 16th 2010 **Vehicle/Formulation:** HEPES-Buffered Physiological Saline 0.3% DMSO **Pulse Protocol**: Holding potential -80mV, 1 second prepulse to +20 mV followed by a repolarizing test ramp to -80mV (-0.5V/s) repeated at 5-second intervals	**Test Article:** Larotrectinib **Study No.:** LOXO-101-SPHARM-001 **Report ID:** R-12459 **GLP compliance:** Yes **Facility:** ChanTest Corporation Cleveland, OH USA

Test Article	**Concentration (µM)**	**Number of Cells Evaluated**	**% Inhibition of hERG Channel Current (± SEM)**	**IC_{50} (µM)**
Larotrectinib	10	3	5.4 ± 0.7	147
	30	3	19.1 ± 1.9	
	100	3	39.2 ± 1.6	
	300	3	67.5 ± 1.0	

[a] = Results with terfenadine were consistent with ChanTest historical data, validating the performance of the assay system.

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies

Test Article: **Larotrectinib**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration/ Design	Doses[a] [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No., Location in CTD (Report ID or literature)
Central nervous system							
Neuromuscular function	Mice/ C3H/HeJ	Oral[b] Neuromuscular function measured by rotorod analysis and scored using a scale	0 (vehicle), 60mg/kg/day (30mg/kg/dose BID) for 48 days	≧3 males	None	No	4.2.1.3.3 (Bone 2011-48-389)
Irwin test[c]	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b]	0 (vehicle), 10, 30, 100	6 males	None NOAEL 100mg/kg	Yes	LOXO-101-SPHARM-012 4.2.1.3.4 (R-12441)
Neuromuscular function	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b] Neuromuscular function measured by rotorod analysis	0 (vehicle), 200mg/kg/day (100mg/kg/dose BID) for 42 days	3 females	200mg/kg/day: Possible effect on neuromuscular function as measured by rotorod analysis, confounded by lack of training the animals on the rotorod, high variability in data and small number of animals.	No	LOXO-101-TOX-012 4.2.3.2.3 (R-12446)
Neurobehavioral effects in rats (refer to 2.6.7.7.1)							LOXO-101-TOX-003 4.2.3.2.4 (R-12422)
Neurobehavioral effects in rats (refer to 2.6.7.7.2)							LOXO-101-TOX-018 4.2.3.2.5 (R-12400)

[a]: Single dose unless specific otherwise, [b]: Vehicle: Labrafac™ Lipophile WL 1349, [c]: Rats were followed for behavioral tests and rectal temperature before dosing (test time-point 0), and at 0.5, 1, 2, 5 and 24 hours post-dose. Body weight was measured before dosing and 24 hours post dose. An additional group of naive animals (n = 6) was not treated but was followed at the same observation time-points than vehicle- and test article-treated animals.

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies (continued)

Test Article: **Larotrectinib**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration/ Design	Doses[a] [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No., Location in CTD (Report ID)
Central nervous system							
Neurobehavioral effects in juvenile rats (refer to 2.6.7.17.1)							LOXO-101-TOX-021 4.2.3.5.4.3 (R-12417)
Neurobehavioral effects in monkeys (refer to 2.6.7.6.5)							LOXO-101-TOX-004 4.2.3.2.7 (R-12423)
Neurobehavioral effects in monkeys (refer to 2.6.7.7.3)							LOXO-101-TOX-006 4.2.3.2.9 (R-12414)
Cardiovascular system							
Blood pressure (BP) - Systolic - Diastolic - Mean - Heart rate (HR) Electro-cardiogram (ECG)	Rat (telemetry-instrumented)	Oral/ QD dosing (4X4 Latin square design)	0 (vehicle), 10, 30, 100, 300	5 males	300mg/kg: Slight increase in systemic blood pressure noted at 1-6 hours post-dose. Systolic and mean BP more affected than diastolic.	No	LOXO-101-SPHARM-004 4.2.1.3.6 (R-12462)
Mean arterial pressure (MAP), Systemic vascular resistance, Cardiac output, Pulmonary arterial pressure, Heart contractility	Anesthetized dog (telemetry-instrumented)	IV infusion/ 3 consecutive 30-minute intervals	0 (vehicle), 1.3, 6.5, 13.0	Gender not specified; 6 (vehicle group), 3 (dose group)	No changes in systemic hemodynamic and cardiac electrophysiological parameters.	No	LOXO-101-SPHARM-006 4.2.1.3.7 (R-12464)

[a]: Single dose unless specific otherwise

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies (continued)

Test Article: **Larotrectinib**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration/ Design	Doses[a] [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No., Location in CTD (Report ID)
Cardiovascular system							
Blood pressure (BP) - Systolic - Diastolic - Mean - Pulse pressure - Heart rate (HR) Electro-cardiogram (ECG)	Monkey/ cynomolgus	Oral[b]	0 (vehicle), 200	3 males	Larotrectinib treated monkeys: Emesis (3/3) Decreased diastolic arterial pressure up to 48% in 1/3 monkey (plasma exposure of 16000ng/mL), heart rate slightly increased and pulse pressure decreased.	No	LOXO-101-SPHARM-005 4.2.1.3.8 (R-12463)
Blood pressure (BP) - Systolic - Diastolic - Mean - Heart rate (HR) Electrocardiogram (ECG)	Monkey/ cynomolgus	Oral[b] Rising dose design with 5 days to a week washout period between doses	0 (vehicle), 3, 10, 30, 100 (1mL/kg)	6 males	100mg/kg: Moderate emesis in 2/6 monkeys & watery feces in 1/6 Slight to moderate decrease in HR with uncertain relationship to drug treatment due to decrease in HR at baseline & during lights off period.	Yes	LOXO-101-SPHARM-003 4.2.1.3.9 (R-12439)

[a]: Single dose unless specific otherwise, [b]: Vehicle: Labrafac™ Lipophile WL 1349

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies (continued)

Test Article: **Larotrectinib**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration/ Design	Doses[a] [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No., Location in CTD (Report ID)
Cardiovascular system							
Cardiovascular safety in monkeys (refer to 2.6.7.7.3)							LOXO-101-TOX-006 4.2.3.2.9 (R-12414)
Cardiovascular safety in monkeys (refer to 2.6.7.7.4)							LOXO-101-TOX-019 4.2.3.2.10 (R-12410)
Respiratory system							
Respiratory function	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b] Whole body plethysmography in the conscious animal[c]	0 (vehicle), 10, 30, 100	8 males	None NOEL: 100mg/kg	Yes	LOXO-101-SPHARM-011 4.2.1.3.10 (R-12466)
Respiratory function in monkeys (refer to 2.6.7.7.4)							LOXO-101-TOX-019 4.2.3.2.10 (R-12410)

[a]: Single dose unless specific otherwise, [b]: Vehicle: Labrafac™ Lipophile WL 1349

[c]: Plethysmography recordings were analyzed from 0.5 hour pre-dose to 4 hours post-dose. The investigated ventilatory parameters were: respiration rate, inspiratory, expiratory and relaxation times, tidal and minute volumes, peak inspiratory and expiratory flows, and enhanced pause index (Penh).

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies (continued)

Test Article: **Larotrectinib**

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Administration/ Design	Doses[a] [mg/kg]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study No., Location in CTD (Report ID)
Gastrointestinal tract							
Charcoal propulsion	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b] Intestinal transit expressed as percent of total intestinal tract with charcoal test meal	0 (vehicle), 10, 30, 100	10 males	Dose dependent increased transit rate, statistically significant at 100mg/kg (+31%)	No	LOXO-101-SPHARM-007 4.2.1.3.11 (R-12465)
Charcoal propulsion	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b] Intestinal transit expressed as percent of total intestinal tract with charcoal test meal	0 (vehicle), 10, 30, 100	10 males	Increase in intestinal transit rate at all doses but significant at 100mg/kg NOAEL: 30mg/kg	Yes	LOXO-101-SPHARM-008 4.2.1.3.12 (R-12440)
Gastric irritation	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b] Stomach lesions counted and individual severity score evaluated using a magnifying lens and scored using a scale	0 (vehicle), 10, 30, 100	10 males	None NOAEL: 100mg/kg	Yes	LOXO-101-SPHARM-009 4.2.1.3.13 (R-12456)
Gastric secretion	Rat/ Sprague Dawley	Oral[b] Gastric juice volume and pH measured. Gastric juice acidity determined by titration to pH 7.0 with 0.01 N sodium hydroxide (NaOH) solution.	0 (vehicle), 10, 30, 100	10 males	100 mg/kg: Increased total volume of gastric secretion Increased acidity of gastric secretion NOAEL: 30 mg/kg	Yes	LOXO-101-SPHARM-010 4.2.1.3.14 (R-12460)

[a]: Single dose unless specific otherwise, [b]: Vehicle: Labrafac™ Lipophile WL 1349

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。