レットヴィモカプセル 40mg
レットヴィモカプセル 80mg

2.6.1　緒言

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.1　緒言 1

2.6.1　緒言

第 2.2 項参照

レットヴィモカプセル 40mg
レットヴィモカプセル 80mg

2.6.2　薬理試験の概要文

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 1
2.6.2.1 まとめ 1
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 4
2.6.2.2.1 In vitro 試験 4
2.6.2.2.1.1 野生型及び変異型 RET に対する阻害活性 4
2.6.2.2.1.2 RET への結合親和性の表面プラズモン共鳴法による測定 6
2.6.2.2.1.3 細胞における RET 融合及び変異タンパク質の阻害作用 6
2.6.2.2.1.4 RET 遺伝子異常を有する又は有しないヒトがん細胞に対する作用の比較 8
2.6.2.2.2 In vivo 試験 9
2.6.2.2.2.1 RET 融合遺伝子陽性の腫瘍担癌マウスにおける RET の機能活性に対する阻害作用 9
2.6.2.2.2.2 マウスにおける RET 融合遺伝子陽性 NIH-3T3 同種移植腫瘍の増殖抑制作用 10
2.6.2.2.2.3 RET 遺伝子異常陽性ヒトがん細胞株異種移植腫瘍の増殖抑制作用 12
2.6.2.2.2.4 RET 遺伝子異常陽性 PDX 腫瘍の増殖抑制作用 13
2.6.2.2.2.5 脳に移植した RET 融合遺伝子陽性 PDX 腫瘍の増殖抑制作用 16
2.6.2.3 副次的薬理試験 17
2.6.2.3.1 In vitro 試験 17
2.6.2.3.1.1 RET 以外のキナーゼに対する作用 17
2.6.2.3.1.2 その他の受容体及び酵素に対する作用 22
2.6.2.4 安全性薬理試験 22
2.6.2.4.1 心血管系に関する試験 23
2.6.2.4.1.1 イオンチャネルに対する作用（GLP 非適用） 23
2.6.2.4.1.2 hERG アッセイ（GLP 適用） 23
2.6.2.4.1.3 ミニブタにセルペルカチニブを単回経口投与したときの心血管系への影響（GLP 適用試験） 23
2.6.2.4.1.4 ミニブタを用いた 28 日間投与毒性試験における心電図の評価（GLP 適用試験） 24
2.6.2.4.1.5 ミニブタを用いた 91 日間投与毒性試験における心電図の評価（GLP 適用試験） 25
2.6.2.4.2 中枢神経系に関する試験（GLP 適用試験） 26
2.6.2.4.3 呼吸系に関する試験（GLP 適用試験） 27
2.6.2.5 考察及び結論 27
2.6.2.6 参考文献 30

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

RET（rearranged during transfection）は腎臓及び腸管神経系の正常な発達、並びに成人の神経組織、神経内分泌組織、造血組織及び雄性生殖組織などの組織の維持に重要な役割を果たす受容体チロシンキナーゼ（receptor tyrosine kinase：RTK）である（Mulligan 2014）。RET 遺伝子の変化は、ヒトにおける一部のがんの発症に関与している、すなわち、腫瘍形成のドライバー遺伝子として機能していることが明らかになっている。RET の発がん性は主に 2 つのメカニズムによって RET が活性化されることによる：（1）染色体再構成により、RET キナーゼドメインとパートナータンパク質の二量体化ドメイン［CCDC6（PTC1）、KIF5B、NCOA4（PTC3）など］とが融合して発がん性ハイブリッドタンパク質が産生され、その結果、リガンドに依存せず恒常的に RET が活性化した状態になる（RET 融合遺伝子）、（2）点突然変異により RET が直接的又は間接的に活性化される（RET 遺伝子変異）。RET の発がん性は、RET コーディング配列を含む再構成されたヒトリンパ系ゲノム DNA 断片がマウス胎仔由来線維芽細胞（NIH-3T3 細胞）の形質転換を誘導することによって初めて確認された（Takahashi et al. 1985）。RET の発がん性が発見された後、甲状腺乳頭癌（papillary thyroid cancer：PTC）の一部（約 10%）で RET 融合遺伝子が（Fusco et al. 1987; Cancer Genome Atlas Research 2014; Kato et al. 2016）、ヒト甲状腺髄様癌（medullary thyroid cancer：MTC）（遺伝性の 90%超、散発性の約 50～60%）で RET 遺伝子の活性化変異が（Donis-Keller et al. 1993; Mulligan et al. 1993; Carlson et al. 1994; Eng et al. 1994; Hofstra et al. 1994; Agrawal et al. 2013; Ji et al. 2015）それぞれ確認されている。さらに最近では、多数のヒト腫瘍遺伝子が次世代シーケンシング（next-generation sequencing：NGS）法により検討された結果、非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer：NSCLC）（腺癌）の一部（約 2%）で RET 融合遺伝子が確認され、結腸・直腸癌、乳癌及び慢性骨髄増殖性腫瘍といったその他の腫瘍タイプでもより低い割合であるものの、確認されている（Ballerini et al. 2012; Ju et al. 2012; Kohno et al. 2012; Lipson et al. 2012; Takeuchi et al. 2012; Bossi et al. 2014; Stransky et al. 2014）。このように、RET 遺伝子異常［RET 融合遺伝子（NSCLC や PTC などの一部で確認されている）及び RET 遺伝子変異（MTC で確認されている）を含む］により恒常的に RET が活性化されると、RET 融合タンパク質を発現又は変異型 RET タンパク質を発現する癌細胞の過剰増殖などが起こると考えられ、その結果として腫瘍細胞の発生・進展などに寄与していると考えられる（Romei et al. 2016; Drilon et al. 2018）。実際に、トランスジェニックマウスを用いた試験においても RET の腫瘍の発生や進展への関与が報告されている（Saito et al. 2014; Huang et al. 2016; Powell et al. 1998; Cho et al. 1999; Michiels et al. 1997; Acton et al. 2000）（第 2.5.1 項）。

RET 遺伝子異常を伴わない RET 発現量の増加も、ヒトにおける一部のがんの増殖及び生存に関与している可能性がある。例えば、RET はエストロゲン受容体（estrogen receptor：ER）の直接的な転写標的であることが示されている（Boulay et al. 2008; Wang et al. 2012）。さらに、ER を介した RET 発現の増加が以下の原因となっている可能性がある：（1）生殖細胞系の RET 変異が検出されない、稀な遺伝性 MTC 症候群を有する家系におけるがんリスクの増加（Smith et al. 2016）及び（2）一部のホルモン受容体陽性乳癌における抗エストロゲン薬への耐性の獲得（Plaza-Menacho et al. 2010; Spanheimer et al. 2014）である。内分泌療法耐性乳癌の非臨床モデルにおいて、低分子干渉 RNA（siRNA）又は RET 阻害剤により RET を阻害したところ、抗エストロゲン薬へ

の感受性が回復したとの知見から、RET 阻害剤と ER 拮抗剤との併用が内分泌療法耐性に対する治療法となり得る可能性が示唆されている（Plaza-Menacho et al. 2010; Morandi et al. 2013; Spanheimer et al. 2014）。また、最近の報告で、一部の組織学的に多様なヒトがん細胞株において RET が主要組織適合遺伝子複合体クラス I（major histocompatibility complex class I：MHC-I）発現の強力な負の制御因子として特定されたことから、RET 阻害により抗がん免疫反応を活性化できる可能性も示唆されている（Brea et al. 2016）。

セルペルカチニブ（LY3527723、LOXO-292 とも記載）は、RET RTK のアデノシン三リン酸（ATP）結合部位を競合的に阻害するように設計された強力かつ選択的な RET 阻害剤である。主要な薬効薬理試験成績を以下に示す。

- セルペルカチニブは in vitro で野生型 RET を阻害し、ATP 濃度が K_m 値相当のときの 50%阻害濃度（half-maximal inhibitory concentration：IC_{50}）は 0.42～0.56 nM であり、生理的濃度と考えられるより高濃度の ATP 存在下では 17 nM であった。変異型 RET に対しても阻害活性を示し、検討したほとんどの変異型 RET（V804M、V804L、M918T、A883F 又は S891A 変異を有する RET）に対する IC_{50} 値は野生型 RET に対する同値の 4 倍以内であった。
- KIF5B-RET 融合遺伝子（変異なし、V804L 変異又は V804M 変異あり）を導入したヒト胎児腎臓細胞（HEK-293 細胞）並びに M918T 変異を有する HEK-293 細胞において、セルペルカチニブは RET の自己リン酸化活性を阻害した。
- RET 融合遺伝子あるいは遺伝子変異を有する 4 種類の細胞株（CCDC6-RET 融合遺伝子を発現する NSCLC 患者由来 LC-2 細胞、CCDC6-RET 融合遺伝子を発現する PTC 患者由来 TPC-1 細胞、RET C634W 遺伝子変異を有する MTC 患者由来 TT 細胞及び RET M918T 遺伝子変異を有する MTC 患者由来 MZ-CRC1 細胞）に対し、セルペルカチニブは in vitro で細胞増殖阻害活性を示し、50%有効濃度（EC_{50}）値はいずれも 10 nM 未満であった。一方、RET 遺伝子異常（融合及び変異の双方）が確認されていない 83 種類のヒトがん細胞株において、セルペルカチニブは有意な抗増殖作用を示さなかった。
- 恒常的に活性化された KIF5B-RET 融合タンパク質を発現する NIH-3T3 細胞を皮下に移植したマウスにおいて、セルペルカチニブの単回経口投与は腫瘍内 RET リン酸化を用量依存性に抑制した。また、KIF5B-RET 融合タンパク質（獲得耐性をもたらす V804M 変異を有する又は有しない）を発現する NIH-3T3 細胞担癌モデルマウスにおいて、セルペルカチニブの 1 日 2 回（*bis in die*; twice a day：BID）の反復投与は用量依存的な抗腫瘍効果を示した。
- 内因性 RET C634W 変異を有するヒト MTC 細胞（TT 細胞株）又は CCDC6-RET 融合タンパク質を発現するヒト NSCLC 細胞（LC-2/ad 細胞株）担癌モデルマウスにおいて、セルペルカチニブは用量依存的な抗腫瘍効果を示し、また忍容性は良好であった。
- CCDC6-RET 融合タンパク質を発現する結腸・直腸癌患者由来異種移植（patient derived xenograft：PDX）腫瘍モデルマウス又は CCDC6-RET-V804M 変異型融合タンパク質を発現する PDX 腫瘍モデルマウスにおいて、セルペルカチニブの反復経口投与は腫瘍増殖を有意に抑制し、その忍容性は良好であった。

- CCDC6-RET 融合タンパク質を発現する結腸・直腸癌患者由来腫瘍をマウスの脳内に直接移植した脳腫瘍モデルにおいて、セルペルカチニブは脳内での腫瘍の増殖を抑制し、生存期間が延長した。
- セルペルカチニブの RET 以外の各種キナーゼに対する広範囲なスクリーニングにおいて、セルペルカチニブは検討した 329 種類のキナーゼ（RET 以外）のほとんど（98%）と比較して野生型 RET に対し高い選択性（250 倍以上）を示した。更なる酵素活性アッセイ、結合アッセイ及び細胞アッセイにおいても、結果は同様であった。セルペルカチニブは酵素活性アッセイにおいて RET 以外に FLT1（VEGFR1）及び FLT4（VEGFR3）のキナーゼ活性を阻害した。細胞アッセイでは FLT4 阻害作用は RET での IC_{50} 値（3.3～4.3 nM）の約 8～10 倍高い濃度（33 nM）で見られた（細胞アッセイでの FLT1 に対する評価は実施していない）。
- キナーゼ以外の各種分子に対するセルペルカチニブの結合又は阻害活性の検討では、50%以上の阻害活性が認められたのは、検討した 54 分子標的のうち 5-HT トランスポーター（70.2%阻害）及び $a_{2c}(h)$ アドレナリン受容体（51.7%阻害）であった。

セルペルカチニブの安全性薬理評価として、in vitro における心血管系に関する試験（GLP 適用の hERG アッセイを含む）、ミニブタを用いた心血管系試験及びラットを用いた呼吸系試験並びに反復投与毒性試験の中での中枢神経系（ラット 28 日間試験）及び心血管系（ミニブタ 28 日間及び 91 日間試験）の評価を行った。安全性薬理評価項目を組み込んだ重要な毒性試験及び独立した安全性薬理試験は GLP を遵守して実施した。主要な安全性薬理試験成績を以下に示す。

- hERG 試験におけるセルペルカチニブの IC_{50} 値は 1.1 μM であり、これは推奨臨床用量（160 mg BID）における日本人患者の最高非結合型濃度［$C_{max,\ unbound}$ =301 nM（158 ng/mL）］の約 4 倍であった。
- 各種イオンチャネル［hERG、Nav1.5、Cav1.2 及び KvLQT1/minK］を発現させた細胞株を用いてセルペルカチニブのイオンチャネル阻害作用を評価した結果、セルペルカチニブは hERG 電流のみを阻害した。また、単離ヒト心室筋細胞においてセルペルカチニブはヒト心室活動電位における 90%再分極時の活動電位持続時間（action potential duration at 90% repolarization：APD_{90}）を延長させた。
- テレメトリー装着覚醒ミニブタにセルペルカチニブを 12 mg/kg までの用量［C_{max}：909 ng/mL、推奨臨床用量におけるヒト C_{max} よりも低い］で単回経口投与したとき、投与に起因する心電図波形の異常、不整脈、並びに心電図及び血行動態データの定量的変化は認められなかった。
- ミニブタに 12 mg/kg（22 日目の C_{max}：1120 ng/mL、ヒト C_{max} よりも低い）までの用量で 28 日間反復投与したとき、心電図の変化は認められなかった。一方、91 日間投与毒性試験において雌のミニブタに 5 mg/kg の用量（雌の 91 日目の C_{max}：565 ng/mL、ヒト C_{max} よりも低い）で投与したとき、投与 88 日目に QTc の有意な延長が認められたが、軽度の変化であったことから毒性変化ではないと判断した。
- ラット 28 日間投与毒性試験において、機能観察総合評価及び自発運動量の評価を含む神経行動機能の評価を行った。75 mg/kg 群の雄（試験途中で 45 mg/kg に減量）及び

150 mg/kg群の雌（試験途中で120 mg/kgに減量）［推奨臨床用量におけるヒト曲線下面積（area under the curve：AUC）の約2～4倍］において、自発運動量の減少が認められた。75/45 mg/kg群の雄では平均前肢握力の有意な低下及び微細運動又は立ち上がりの減少が認められた。いずれも概して可逆的であり、病理組織学的検査で神経組織に異常はなかったことから、高用量で生じた一般状態の悪化及び体重変化に起因すると考えられ、特異的な神経学的変化ではなかったと考えられた。

- ラットを用いた呼吸系試験において、セルペルカチニブを45 mg/kg（ヒトC_{max}の約3倍）の用量まで単回経口投与しても呼吸機能への影響は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro試験

セルペルカチニブの薬理作用を明らかにするため、無細胞系で野生型RET並びに変異型RET阻害作用及びRETへの結合親和性を評価し、細胞を用いてRET融合タンパク質並びにRET変異タンパク質を発現させ、その阻害作用を評価した。また、RET遺伝子異常を有する又は有しない癌細胞に対するセルペルカチニブの阻害作用について比較した。

2.6.2.2.1.1 野生型及び変異型RETに対する阻害活性

報告書LOXO-292-PHARM-003 (4.2.1.1.1)、LOXO-292-PHARM-028 (4.2.1.1.2)、LOXO-292-PHARM-021 (4.2.1.1.3)、LOXO-292-PHARM-027(4.2.1.1.4)

野生型及び変異型ヒトRETキナーゼに対するセルペルカチニブの阻害作用は、放射性標識ATPキナーゼアッセイ及び均一時間分解蛍光（HTRF® KinEASE）アッセイを用いて測定した。

セルペルカチニブは野生型RET活性を阻害し、K_m値に相当するATP濃度におけるIC_{50}値は、放射性標識ATPアッセイでは0.56 nM（報告書LOXO-292-PHARM-028）、HTRFアッセイでは0.42 nM（報告書LOXO-292-PHARM-003）であった（表2.6.2-1）。放射性標識ATPアッセイにおいて、セルペルカチニブは活性化キナーゼドメインのミスセンス変異であるRET V804L、RET V804M、RET A883F及びRET M918Tを阻害し、IC_{50}値はそれぞれ0.42、2.2、0.59及び0.33 nMであった（報告書LOXO-292-PHARM-028）（表2.6.2-1）。また、その他12種類の変異型RETに対してもセルペルカチニブのキナーゼ阻害活性を測定し、IC_{50}値は0.20～10 nMであった（報告書LOXO-292-PHARM-028）（表2.6.2-1）。

さらに、1 mM ATP（生理学的に意義のある濃度と考えられる）存在下でHTRFアッセイを実施した。2つの施設において異なるアッセイ条件及びキナーゼロットを用いてセルペルカチニブのRET阻害活性を測定した。1つ目の試験では、各キナーゼ、基質及びATPを混合し、キナーゼ反応の開始時にセルペルカチニブを添加したところ、セルペルカチニブは野生型RET活性（IC_{50}値：17 nM）並びに変異型RET V804L、RET V804M、RET A883F、RET M918T及びRET S891Aのキナーゼ活性を阻害した（IC_{50}値：29～68 nM、報告書LOXO-292-PHARM-003）（表2.6.2-2）。セルペルカチニブをキナーゼとともに室温で10分間インキュベート後、ATPを添加した別の試験では、セルペルカチニブは野生型RET活性（IC_{50}値：2.8 nM）並びに変異型RET A764T、RET L790F、RET V804M、RET M918T及びRET Δ(898-901)のキナーゼ活性を阻害した（IC_{50}値：0.92～6.4 nM、報告書LOXO-292-PHARM-021）（表2.6.2-2）。RET G810Sに対するセルペルカチニブの阻害作用は弱く、IC_{50}値は295 nMであった（報告書LOXO-292-PHARM-027）（表2.6.2-2）。

これらの結果から、K_m 濃度及び 1 mM の ATP 存在下において、セルペルカチニブは RET 及び変異型 RET（G810S を除き）に対し強い阻害作用を有することが示された。

表 2.6.2-1. K_m 値の ATP 濃度におけるセルペルカチニブの野生型及び変異型 RET 阻害作用

キナーゼ	IC_{50}（nM）	n	アッセイ [a]	RET と比較した倍数 [b]
RET	0.42 ± 0.10	24	HTRF	0.7
RET	0.56 ± 0.03	7	放射性標識	1
RET G691S	1.3 ± 0.12	4	放射性標識	2.4
RET R749T	0.77 ± 0.05	4	放射性標識	1.4
RET V778I	0.74 ± 0.03	4	放射性標識	1.3
RET L790F	0.28 ± 0.01	4	放射性標識	0.5
RET Y791F	0.47 ± 0.02	4	放射性標識	0.8
RET V804E	10 ± 1.0	4	放射性標識	18.3
RET V804L	0.42 ± 0.09	7	放射性標識	0.7
RET V804M	2.2 ± 0.24	3	放射性標識	3.9
RET Y806H	3.0 ± 0.14	4	放射性標識	5.3
RET R813Q	1.7 ± 0.13	4	放射性標識	3.0
RET A883F	0.59 ± 0.03	4	放射性標識	1.1
RET S891A	0.45 ± 0.03	4	放射性標識	0.8
RET S904A	0.71 ± 0.01	4	放射性標識	1.3
RET S904F	0.20 ± 0.12	7	放射性標識	0.4
RET R912P	0.21 ± 0.03	4	放射性標識	0.4
RET M918T	0.33 ± 0.03	4	放射性標識	0.6

IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す。n = 反復測定回数

[a] HTRF® Kinease Reaction では、各 RET、ビオチン化チロシンキナーゼ（TK）基質ペプチド、K_m 相当濃度の ATP 及びセルペルカチニブを混合し、キナーゼ活性の反応後、反応混合液にリン酸化チロシン検出試薬［Sa-XL665 及び TK-AB-クリプテート］を添加した後反応を停止させ、蛍光共鳴エネルギー移動（fluorescence resonance energy transfer：FRET）を検出して RET のキナーゼ活性を定量した（LOXO-292-PHARM-003）。放射性標識 ATP キナーゼアッセイでは、各キナーゼの K_m 値付近の ATP 濃度において、[γ-^{33}P]-ATP 由来[^{33}P]リン酸のペプチド基質への取込みをモニタリングし、各 RET 活性に対するセルペルカチニブの阻害作用を測定した（LOXO-292-PHARM-028）。

[b] 放射性標識 ATP キナーゼアッセイにおける RET の IC_{50} 値との比較

表 2.6.2-2. 1 mM の ATP 濃度におけるセルペルカチニブの野生型及び変異型 RET 阻害作用

キナーゼ	IC_{50}（nM）	n	アッセイ	RET と比較した倍数 [a]
RET	17 ± 6.7	48	HTRF[1]	1
RET V804M	37 ± 18	49	HTRF[1]	2.1
RET V804L	31 ± 4.2	30	HTRF[1]	1.8
RET A883F	68 ± 32	21	HTRF[1]	3.9
RET M918T	29 ± 5.5	30	HTRF[1]	1.7
RET S891A	33 ± 10	21	HTRF[1]	1.9
RET	2.8 ± 0.74	8	HTRF[2]	1
RET A764T	1.8 ± 0.42	8	HTRF[2]	0.6
RET L790F	0.92 ± 0.09	8	HTRF[2]	0.3
RET V804M	6.4 ± 0.75	8	HTRF[2]	2.3
RET M918T	1.5 ± 0.41	8	HTRF[2]	0.5
RET Δ(898-901)	0.97 ± 0.12	8	HTRF[2]	0.3
RET G810S	295 ± 58.1	8	HTRF[3]	105.7[b]

[a] 同じ試験から得られた RET の IC_{50} 値との比較
[b] LOXO-292-PHARM-021 試験から得られた RET の IC_{50} 値との比較
IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す。n = 反復測定回数
[1] HTRF® Kinease Reaction、1 mM の ATP 濃度を使用、キナーゼ反応の開始時にセルペルカチニブを添加（LOXO-292-PHARM-003）
[2] HTRF® KinEASE Reaction、セルペルカチニブをキナーゼとともに室温で 10 分間インキュベートし、その後 ATP（1 mM）を添加（LOXO-292-PHARM-021）
[3] HTRF® KinEASE Reaction、セルペルカチニブを RET G810S とともに室温で 10 分間インキュベートし、その後 ATP（1 mM）を添加（LOXO-292-PHARM-027）

2.6.2.2.1.2 RET への結合親和性の表面プラズモン共鳴法による測定

報告書 LOXO-292-PHARM-003 (4.2.1.1.1)

Biacore T200 を用いた表面プラズモン共鳴法により、セルペルカチニブの RET に対する結合親和性を測定した。ビオチン化 RET をストレプトアビジンアフィニティーチップに捕捉し、1.11～30 nM の濃度でセルペルカチニブを処理した。各濃度で得られたセンサーグラムから、結合速度定数［k_a（$M^{-1}s^{-1}$）］、解離速度定数［k_d（s^{-1}）］を求め、k_d/k_a の比から解離定数（dissociation constant：K_D）を算出した。セルペルカチニブの RET に対する K_D は 0.047 nM であった（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3. セルペルカチニブの RET に対する結合及び解離速度

キナーゼ	k_a（M^{-1} s^{-1}）	k_d（s^{-1}）	解離半減期（分）	K_D（nM）
RET	5.00×10^6	2.35×10^{-4}	49.1	0.047

N = 1
略語：k_a = 酵素と基質の結合速度定数、k_d = 酵素と基質の解離速度定数、M^{-1} = モル$^{-1}$、s^{-1} = 秒$^{-1}$、K_D = 解離定数

2.6.2.2.1.3 細胞における RET 融合及び変異タンパク質の阻害作用

報告書 LOXO-292-PHARM-012 (4.2.1.1.5)、LOXO-292-PHARM-020 (4.2.1.1.6)、LOXO-292-PHARM-027 (4.2.1.1.4)

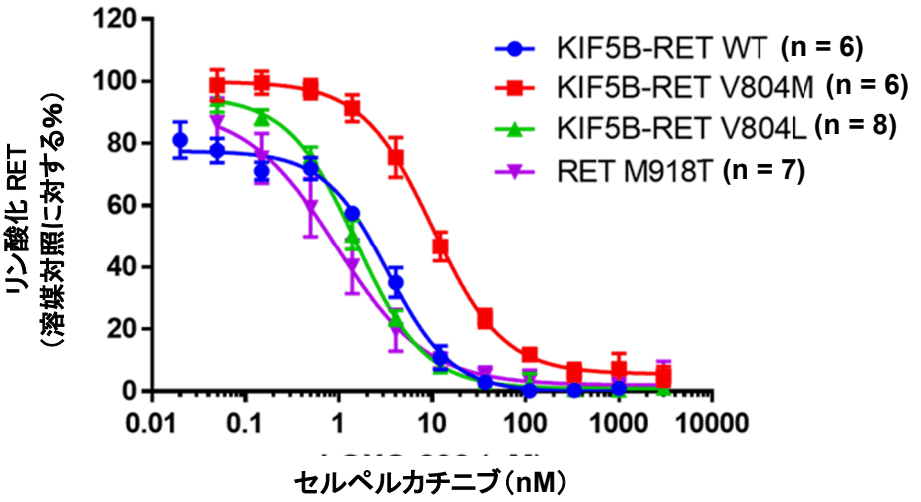
細胞での RET 活性に対するセルペルカチニブの阻害作用を評価する目的で、HEK-293 細胞に KIF5B-RET（融合タンパク質）、KIF5B-RET V804L（V804L 変異のあるもの）、KIF5B-RET V804M（V804M 変異のあるもの）、KIF5B-RET G810S（G810S 変異のあるもの）をコードする

RET 遺伝子変異体を導入した。また別の RET 変異遺伝子として RET M918T をコードする変異体（全長型）を安定的に導入した。RET タンパク質はドキシサイクリン誘導プロモーターのコントロール下で発現させた。これらの RET 融合及び変異タンパク質を導入した HEK-293 細胞アッセイを用いてセルペルカチニブのリン酸化阻害作用を評価した。試験は、2 つの施設で異なる条件を用いて実施した。1 つ目の試験では、セルペルカチニブは細胞における KIF5B-RET、RET M918T、KIF5B-RET V804L 及び KIF5B-RET V804M 活性を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 4.3、8.4、11 及び 32 nM であった（報告書 LOXO-292-PHARM-012）（表 2.6.2-4）。別の試験では、セルペルカチニブは細胞における KIF5B-RET、RET M918T、KIF5B-RET V804L 及び KIF5B-RET V804M（図 2.6.2-1）活性を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 3.3、0.87、1.5 及び 10 nM であった（報告書 LOXO-292-PHARM-020）。KIF5B-RET G810S に対する阻害作用は弱く、IC_{50} 値は 181 nM であった（報告書 LOXO-292-PHARM-027）（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4. 細胞における RET 融合及び変異タンパク質の機能活性に対するセルペルカチニブの阻害作用

発現している RET タンパク質	IC_{50} (nM)	n	KIF5B-RET と比較した倍数 [a]	報告書番号
KIF5B-RET	4.3 ± 1.8	55	1	LOXO-292-PHARM-012
RET M918T	7.5, 9.3	2	2	LOXO-292-PHARM-012
KIF5B-RET V804L	9.5, 13	2	2.8	LOXO-292-PHARM-012
KIF5B-RET V804M	12, 51	2	8	LOXO-292-PHARM-012
KIF5B-RET	3.3 ± 0.19	6	1	LOXO-292-PHARM-020
RET M918T	0.87 ± 0.14	7	0.3	LOXO-292-PHARM-020
KIF5B-RET V804L	1.5 ± 0.05	8	0.4	LOXO-292-PHARM-020
KIF5B-RET V804M	10 ± 0.56	6	3.1	LOXO-292-PHARM-020
KIF5B-RET G810S	181 ± 13.1	6	54.8[b]	LOXO-292-PHARM-027

[a] 同じ試験から得られた KIF5B-RET の IC_{50} 値との比較
[b] LOXO-292-PHARM-020 試験から得られた KIF5B-RET の IC_{50} 値との比較
IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す（n = 2 の場合は個別値を示す）。n = 反復測定回数
LOXO-292-PHARM-012 試験：細胞をドキシサイクリンで一晩処理し RET タンパク質発現を誘導した後、様々な濃度のセルペルカチニブで 1 時間処理した。リン酸化された RET タンパク質（pRET）を免疫蛍光測定法（in-cell Western assay）により定量し、対照群（0.5%DMSO 処置のみ）と比較してセルペルカチニブのリン酸化阻害作用を評価した。
LOXO-292-PHARM-020 試験及び LOXO-292-PHARM-027 試験：細胞をプレートに播種して一晩増殖させ、翌日ドキシサイクリンで RET タンパク質発現を誘導した後（4～6 時間）、様々な濃度のセルペルカチニブで 1 時間処理した。pRET タンパク質を in-cell Western assay により定量し、対照群（0.05%DMSO 処置のみ）と比較してセルペルカチニブのリン酸化阻害作用を評価した。



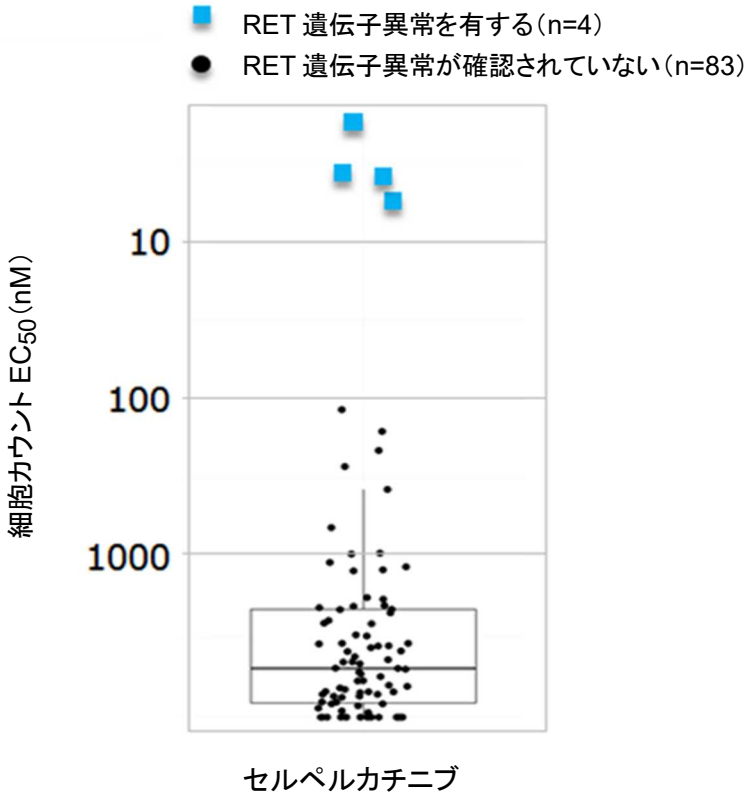
リン酸化 RET の値は平均値 ± 標準偏差で示す（報告書 LOXO-292-PHARM-020）

図 2.6.2-1. KIF5B-RET、RET M918T、KIF5B-RET V804L 及び KIF5B-RET V804M の機能活性に対する阻害作用

2.6.2.2.1.4　RET 遺伝子異常を有する又は有しないヒトがん細胞に対する作用の比較

報告書 LOXO-292-PHARM-016 (4.2.1.1.7)

87 種類のヒトがん細胞株パネルを用い、セルペルカチニブの細胞増殖に対する影響を評価した。RET を恒常的に活性化するとして既知の内因性 RET 遺伝子異常を有する 4 種類の細胞株［LC-2/ad（CCDC6-RET 融合遺伝子を有する NSCLC 細胞株）、TPC-1（CCDC6-RET 融合遺伝子を有する PTC 細胞株）、TT（RET C634W 遺伝子変異を有する MTC 細胞株）及び MZ-CRC1（RET M918T 遺伝子変異を有する MTC 細胞株）］に対するセルペルカチニブの細胞増殖抑制の 50%有効濃度（EC_{50}）値は 10 nM 未満であった（図 2.6.2-2）。一方、既知の RET 遺伝子異常を有することが確認されていない 83 種類のヒトがん細胞株に対するセルペルカチニブの EC_{50} 値は 100 nM ～10 μM の範囲であった。これらの結果から、セルペルカチニブは、RET 遺伝子異常が確認されていない 83 種類のヒトがん細胞株と比較して、RET 遺伝子異常（融合及び変異の双方）を有するがん細胞の増殖を選択的に抑制することが示された。



ヒトがん細胞株パネルをセルペルカチニブで 72 時間処理した後、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（4,6-diamidino-2-phenylindole：DAPI）で染色し、細胞数を計測して細胞増殖に対する影響を評価した。青色の四角は RET 遺伝子異常を有する細胞株を示し、黒色の点は既知の RET 遺伝子異常が確認されていない細胞株を示す。各データセットに重なっている箱は中央値（中央の横線）、25 パーセンタイル（下端）及び 75 パーセンタイル（上端）を示し、ひげはそれぞれ 75 及び 25 パーセンタイルの四分位範囲の 1.5 倍以内にある最大値又は最小値まで伸ばしている。

図 2.6.2-2. セルペルカチニブによる RET 遺伝子異常を有する細胞の選択的増殖抑制作用

2.6.2.2.2　In vivo 試験

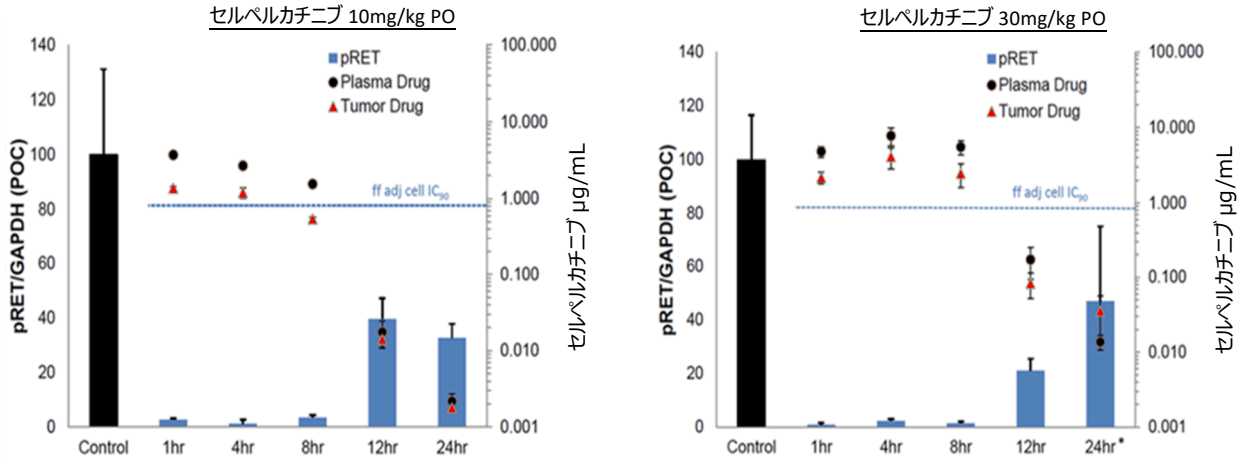
2.6.2.2.2.1　RET 融合遺伝子陽性の腫瘍担癌マウスにおける RET の機能活性に対する阻害作用

報告書 LOXO-292-PHARM-008 (4.2.1.1.8)

ヒト KIF5B-RET 融合遺伝子を NIH-3T3 細胞に安定的に導入し、KIF5B-RET NIH-3T3 細胞株を作製した。この KIF5B-RET NIH-3T3 細胞を雌ヌードマウス（NCr:Nu/Nu）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍が約 400 mm^3 になるまで増殖させた。腫瘍サイズでマウスを無作為に割り付け（1 群 3 匹／時点）、セルペルカチニブ（10 又は 30 mg/kg）又は溶媒対照を単回強制経口投与し、血漿及び腫瘍検体を経時的に採取した。血漿及び腫瘍検体中のセルペルカチニブ濃度は LC-MS/MS 法で分析し、腫瘍検体中のリン酸化 RET（pRET）レベルは、pRET 検出抗体を用いたイムノブロットにより測定した。

セルペルカチニブは 10 及び 30 mg/kg の用量で RET 活性をほぼ完全に阻害し、経口投与後 1、4 及び 8 時間の時点での pRET レベルは低値［溶媒対照に対する割合（percent of control：POC）は 5%未満（<5 POC）］であった（図 2.6.2-3）。1、4 及び 8 時間の時点における血漿及び腫瘍検体中のセルペルカチニブの平均濃度は、いずれの用量群でも遊離型分率で補正した IC_{90} 値（細胞ア

ッセイによる）より高かった（8 時間の時点における腫瘍検体の 10 mg/kg 群を除く）。12 時間の時点で検出された pRET の平均レベルは、10 及び 30 mg/kg 群でそれぞれ 40 POC 及び 21 POC であった。24 時間の時点での 10 及び 30 mg/kg 群における平均値は、それぞれ 33 POC 及び 47 POC であった。pRET レベルが上昇した 12 及び 24 時間時点における血漿及び腫瘍中セルペルカチニブ濃度は、いずれの用量群においても遊離型分率で補正した IC_{90} 値よりも明らかに低かった。これらの結果から、マウスにセルペルカチニブを単回経口投与したとき、RET 自己リン酸化活性は血漿中又は腫瘍中濃度依存的及び時間依存的に阻害されることが示された。



pRET、血漿中及び腫瘍中薬物濃度の値は平均値 ± 標準偏差（n = 3）で示す。
*pRET POC について n = 2（図中 pRET の正方向の誤差範囲は高い値と平均値との差を示す）
略語：ff adj cell IC_{90} = 遊離型分率で補正した IC_{90} 値、GAPDH = グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素、PO = 経口投与、POC = 溶媒対照に対する割合、pRET = リン酸化 RET

図 2.6.2-3. マウスにおける KIF5B-RET 腫瘍の RET リン酸化に対するセルペルカチニブの阻害作用

2.6.2.2.2.2　マウスにおける RET 融合遺伝子陽性 NIH-3T3 同種移植腫瘍の増殖抑制作用

報告書 LOXO-292-PHARM-006 (4.2.1.1.9)、LOXO-292-PHARM-007 (4.2.1.1.10)

ヒト KIF5B-RET 融合遺伝子を安定的に導入した NIH-3T3 細胞を雌ヌードマウス（NCr:Nu/Nu）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 200 mm^3 になるまで増殖させた。腫瘍サイズでマウスを無作為に割り付け（1 群 8 匹）、セルペルカチニブ（10 又は 30 mg/kg BID）を 14 日間又は溶媒対照（BID）を 5 日間経口投与した。セルペルカチニブ投与マウスの腫瘍体積は 1、2、5、7、9、12 及び 14 日目に測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-006）。セルペルカチニブは腫瘍の増殖を用量依存的に抑制し、10 及び 30 mg/kg BID における腫瘍退縮率はそれぞれ 62%及び 88%であった（図 2.6.2-4）。群平均体重減少率が 5%を超えることはなく、薬物に関連した死亡は認められなかった（図 2.6.2-4）。

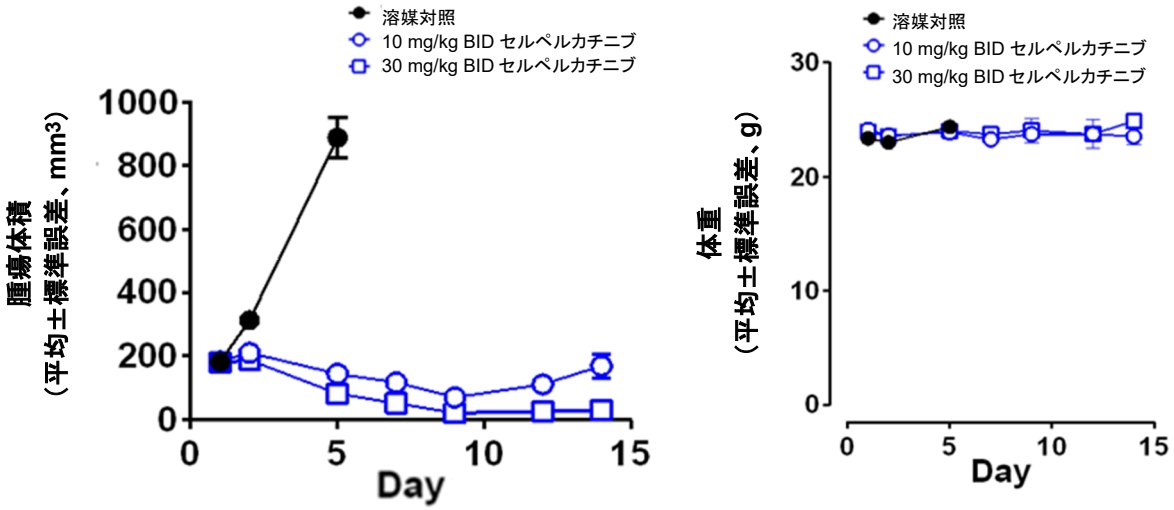


図 2.6.2-4. KIF5B-RET 陽性同種移植腫瘍モデルにおけるセルペルカチニブの腫瘍増殖抑制作用（各群 n = 8）

第 2 のモデルでは、KIF5B-RET 融合遺伝子の変異型である KIF5B-RET-V804M[1]を安定的に導入した NIH-3T3 細胞を雌ヌードマウス（NCr:Nu/Nu）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 210 mm^3 になるまで増殖させた。これらのマウス（1 群 8 匹）にセルペルカチニブ（10、30 又は 100 mg/kg BID）又は溶媒（BID）を 14 日間経口投与し、1、5、8、11 及び 14 日目に腫瘍体積を測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-007）。セルペルカチニブは腫瘍の増殖を用量依存的に抑制し、10、30 及び 100 mg/kg BID における腫瘍退縮率はそれぞれ 16%、50%及び 70%であった（図 2.6.2-5）。100 mg/kg BID では、忍容性が不良で、平均体重減少率は 13.2%であった。10 及び 30 mg/kg 群では、群平均体重減少率が 5%を超えることはなかった（図 2.6.2-5）。

これらの結果から、セルペルカチニブは 2 種類の RET 融合遺伝子陽性腫瘍のマウス同種移植モデルにおける腫瘍増殖を用量依存的に抑制し、忍容性は 30 mg/kg BID まで良好であることが示された。

[1] V804M 変異は獲得耐性をもたらす「ゲートキーパー」変異で、実臨床で生じる可能性がある（第 2.5.1.4.1 項）。

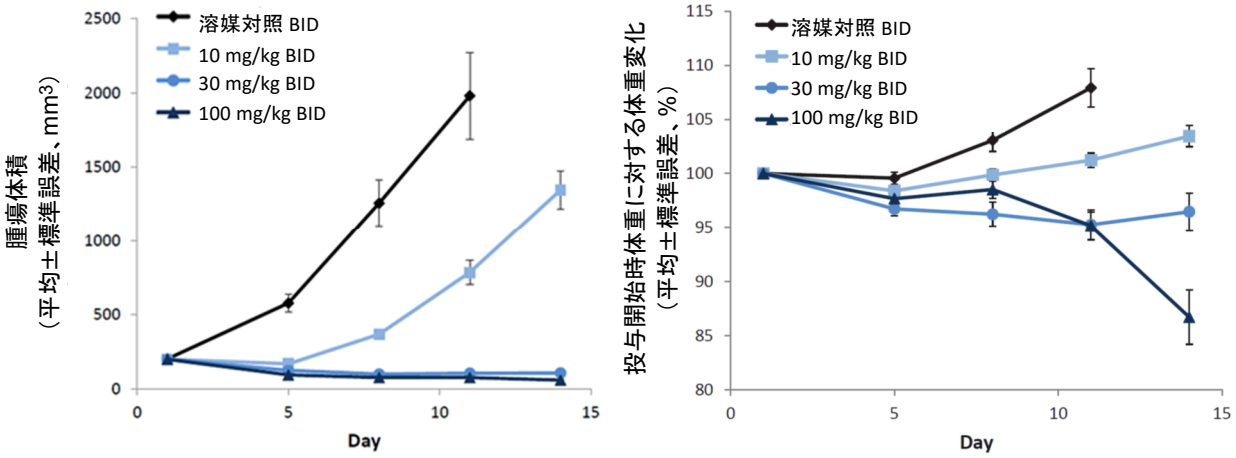


図 2.6.2-5. KIF5B-RET-V804M 陽性同種移植腫瘍モデルにおけるセルペルカチニブの腫瘍増殖抑制作用（各群 n = 8）

2.6.2.2.2.3　RET 遺伝子異常陽性ヒトがん細胞株異種移植腫瘍の増殖抑制作用

報告書 LOXO-292-PHARM-004 (4.2.1.1.11)、LOXO-292-PHARM-005A1 (4.2.1.1.12)

内因性 RET C634W 変異を有する MTC 細胞（TT 細胞株）を雌ヌードマウス（NCr:Nu/Nu）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 200 mm3 になるまで増殖させた。これらのマウスを腫瘍サイズで無作為に割り付け（1 群 8 匹）、セルペルカチニブ（3、10 又は 30 mg/kg BID）又は溶媒（BID）を 21 日間経口投与した。投与期間中、腫瘍体積を 3～5 日ごとに測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-004）。セルペルカチニブは腫瘍増殖を用量依存的に抑制し、10 及び 30 mg/kg BID の用量における腫瘍退縮率はそれぞれ 20%及び 37%であった（図 2.6.2-6　上）。群平均体重減少率が 5%を超えることはなく、薬物に関連した死亡は認められなかった（図 2.6.2-6 上）。投与期間終了後も継続して腫瘍体積を 3～5 日ごとに測定したところ、用量の増加に伴って腫瘍再増殖は遅延し、投与終了後の腫瘍体積倍加時間は 3、10 及び 30 mg/kg BID の用量でそれぞれ 17、22 及び 29 日であった（図 2.6.2-6　上）。

CCDC6-RET 融合タンパク質を発現する NSCLC 細胞（LC-2/ad 細胞株）を、SCID beige 雌マウス（Prkdcscid）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 210 mm3 になるまで増殖させた。これらのマウスを腫瘍サイズで無作為に割り付け（1 群 8 匹）、セルペルカチニブ（3、10 又は 30 mg/kg BID）又は溶媒（BID）を 21 日間経口投与した。投与期間中、腫瘍体積を 3～4 日ごとに測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-005A1）。セルペルカチニブは腫瘍増殖を用量依存的に抑制し、10 及び 30 mg/kg BID の用量における腫瘍退縮率はそれぞれ 3%及び 16%であった（図 2.6.2-6　下）。群平均体重減少率が 6%を超えることはなく、薬物に関連した死亡は認められなかった（図 2.6.2-6　下）。投与期間終了後も継続して腫瘍体積を測定したところ、用量依存的な腫瘍再増殖の遅延が認められ、投与終了後の腫瘍体積倍加時間は 3、10 及び 30 mg/kg BID の用量でそれぞれ 13、16 及び 20 日であった（図 2.6.2-6　下）。

これらの結果から、セルペルカチニブは RET 遺伝子異常を有する MTC 及び NSCLC がん細胞株マウス異種移植腫瘍モデルにおける腫瘍増殖を用量依存的に抑制し、忍容性は良好であることが示された。

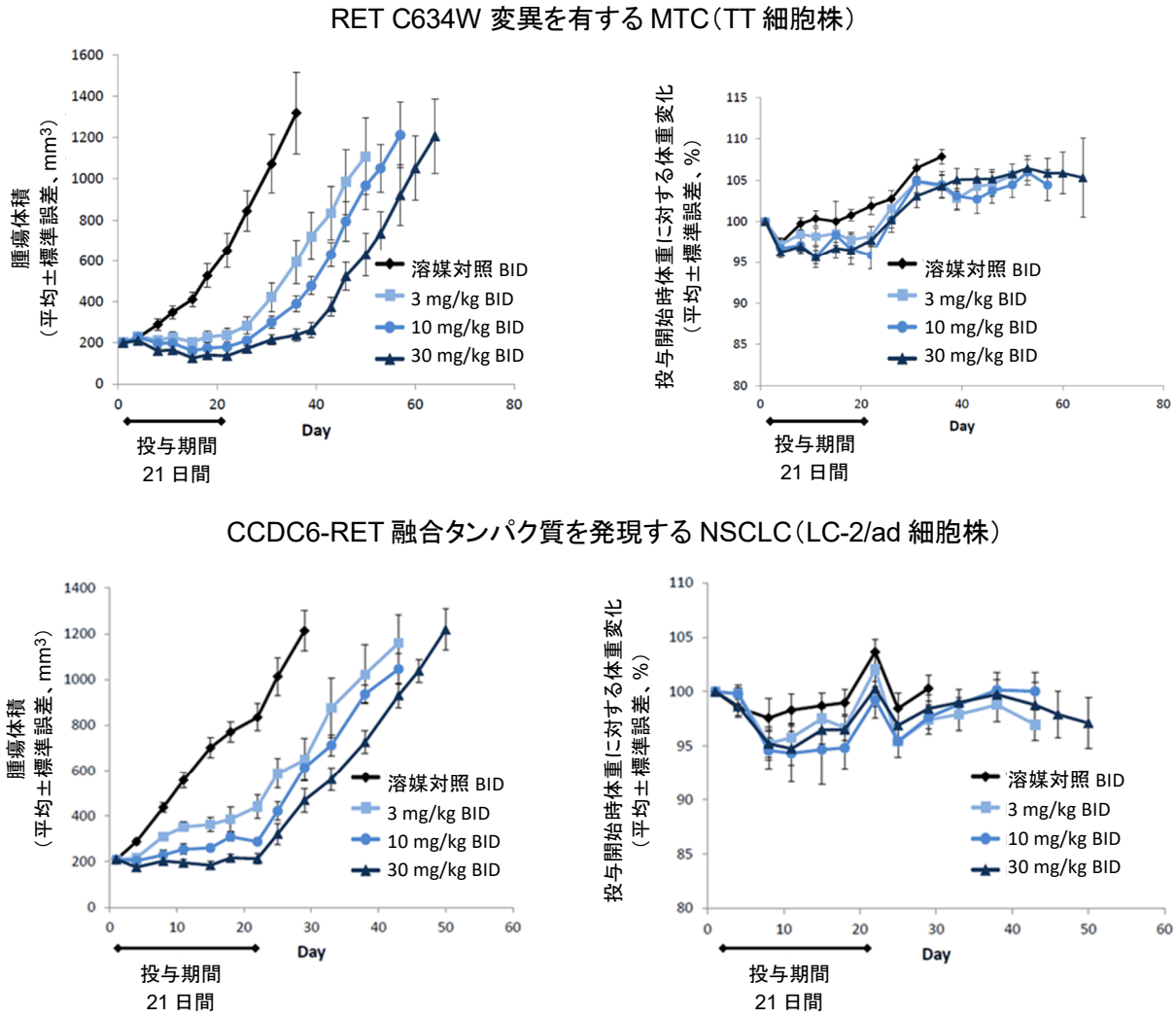


図 2.6.2-6. RET 遺伝子異常陽性ヒトがん細胞株異種移植腫瘍モデルにおける用量依存的な腫瘍増殖抑制作用（各群 n = 8）

2.6.2.2.2.4　RET 遺伝子異常陽性 PDX 腫瘍の増殖抑制作用

報告書 LOXO-292-PHARM-001 (4.2.1.1.13)、LOXO-292-PHARM-017 (4.2.1.1.14)

CR2518（Crown Bioscience HuPrime®腫瘍モデル）は、CCDC6-RET 融合タンパク質を発現する結腸・直腸癌 PDX 腫瘍である。CR2518 懸濁液を雌ヌードマウス（Balb/c:Nu/Nu）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 164 mm^3 になるまで増殖させた。これらのマウスを腫瘍サイズで無作為に割り付け（1 群 10 匹）、セルペルカチニブ［3、10 もしくは 30 mg/kg BID、又は 30 mg/kg 1 日 1 回（*quaque die*; once a day：QD）］を 28 日間経口投与し、溶媒対照群は溶媒を 20 日間（QD）経口投与した。試験開始から 21 日間を 21 日間有効性試験として評価し、その後も投与を継続し

たマウスを延長試験に供した。投与期間中、腫瘍体積を約 3～4 日ごとに測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-001）。セルペルカチニブは 21 日間有効性試験において、すべての用量で統計学的に有意な腫瘍退縮を引き起こした（表 2.6.2-5）。

21 日間有効性試験終了後の延長試験では、溶媒対照群のマウス 10 匹中 8 匹に、試験 21 日目から 116 日目までセルペルカチニブ（10 mg/kg BID）を投与した。この群の 21 日目における平均腫瘍体積は 780.93 mm^3 であったが、21 日目からのセルペルカチニブの投与により、116 日目には腫瘍体積が 50.22 mm^3 まで減少した。セルペルカチニブ投与群における延長試験では、3 mg/kg BID 群は 28 日目まで投与を継続して投与終了後 74 日目まで観察（n = 5）、もしくは 91（n = 1）又は 127 日目（n = 4）まで投与を継続して終了、10 mg/kg BID 群は 28（n = 5）又は 55 日目（n = 5）まで投与継続しその後 116 日目まで観察した。30 mg/kg BID 群は 28 日目まで投与継続しその後 116 日目まで観察（n = 10）、30 mg/kg QD 群は 28 日目まで投与しその後 85 日目まで観察した（n = 10）。セルペルカチニブ投与終了後も用量依存的な腫瘍増殖抑制が認められ、セルペルカチニブを 30 mg/kg BID で 28 日目まで投与しその後 116 日目まで観察したマウス 10 匹中 7 匹において測定可能な腫瘍は見られなかった。また、セルペルカチニブを 30 mg/kg QD の用量で 28 日目まで投与しその後 84 日目に観察したマウス 10匹中2匹においても測定可能な腫瘍は見られなかった。セルペルカチニブの忍容性は良好で、いずれのセルペルカチニブ投与群でも群平均体重減少率が 5%を超えることはなかった。

表 2.6.2-5. CCDC6-RET 陽性 PDX 腫瘍 CR2518 を移植したマウスにおけるセルペルカチニブの腫瘍増殖抑制作用

投与	試験 0 日（無作為化実施日）における腫瘍サイズ [a]（mm^3）	試験 21 日目における腫瘍サイズ [a]（mm^3）	投与群の平均腫瘍体積／対照群の平均腫瘍体積（%）	腫瘍増殖抑制率 [b]（%）	p 値 [c]
溶媒	164.31 ± 13.05	880.95 ± 96.82	該当なし	該当なし	該当なし
3 mg/kg BID	164.33 ± 13.18	3.01 ± 2.02	0.34	122.51	< 0.001
10 mg/kg BID	164.34 ± 12.88	5.04 ± 2.65	0.57	122.23	< 0.001
30 mg/kg BID	164.37 ± 12.94	10.79 ± 6.99	1.23	121.43	< 0.001
30 mg/kg QD	164.34 ± 12.90	0.00 ± 0.00	0	122.93	< 0.001

[a] データは平均値 ± 標準誤差で表す（n = 10）。
[b] 腫瘍増殖抑制率 = [1-(Ti-T0)/(Ci-C0)] × 100%。Ti 及び Ci は、測定日における投与群及び溶媒対照群の平均腫瘍体積。T0 及び C0 は、0 日目の投与群及び溶媒対照群の平均腫瘍体積。
[c] 一元配置分散分析後 Dunnett T3 検定による溶媒対照群との比較。

CR2545（Crown Bioscience HuPrime®腫瘍モデル）は、前述の CCDC6-RET 陽性 CR2518 を異種移植したマウスにポナチニブ（抗 RET 活性を有するマルチキナーゼ阻害剤）を長期投与することにより耐性を獲得した CCDC6-RET-V804M 変異型融合タンパク質を発現する腫瘍モデルである（Yang 2015）。この CR2545 懸濁液を雌ヌードマウス（Balb/c:Nu/Nu）の右側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 170 mm^3 になるまで増殖させた。これらのマウスを腫瘍サイズで無作為に割り付け（1 群 10 匹）、セルペルカチニブ（10 又は 30 mg/kg BID）又は溶媒（QD）を 28 日間経口投与し、腫瘍体積を週 2 回測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-001）。セルペルカチニブは腫瘍増殖を抑制し、10 及び 30 mg/kg BID の用量における腫瘍増殖抑制率はそれぞれ 108%及び 113%で

あった（図 2.6.2-7）。セルペルカチニブの忍容性は良好で、セルペルカチニブ投与群の群平均体重減少率が 5%を超えることはなかった（図 2.6.2-7）。

これらの結果から、セルペルカチニブは、V804M 変異の有無にかかわらず CCDC6-RET 融合タンパク質陽性 PDX 腫瘍の増殖を用量依存的に抑制し、忍容性は良好であることが示された。

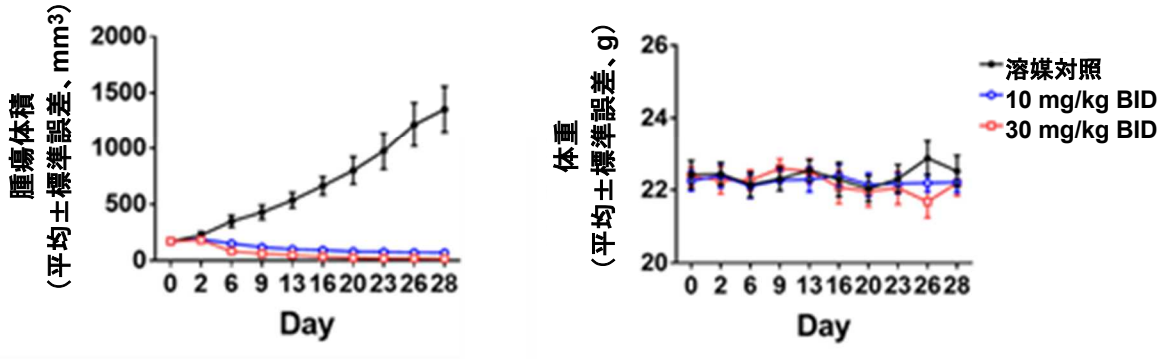


図 2.6.2-7. CCDC6-RET-V804M 陽性 PDX 腫瘍 CR2545 を移植したマウスにおける
セルペルカチニブの抑制作用（各群 n = 10）

CTG-0838（Champions Oncology TumorGraft®モデル）は、KIF5B-RET 融合タンパク質を発現する NSCLC PDX 腫瘍である（Gozgit et al. 2018）。CTG-0838 断片を雌ヌードマウス（無胸腺ヌード *Foxn1*^{nu}）の左側腹部に皮下移植し、腫瘍の体積が約 150～300 mm^3 になるまで増殖させてマウスを腫瘍サイズで無作為に割り付け（1 群 8～12 匹）、2 つの有効性試験を行った（報告書 LOXO-292-PHARM-017）。1 つ目の試験では、セルペルカチニブ（3 又は 30 mg/kg BID）、カボザンチニブ（抗 RET 活性を持つマルチキナーゼ阻害剤、40 mg/kg QD）又は溶媒（QD）を 28 日間経口投与し、腫瘍体積を週 2 回測定した。セルペルカチニブは腫瘍増殖を用量依存的に抑制し、3 及び 30 mg/kg BID 群における 25 日目の腫瘍増殖抑制率はそれぞれ 82%及び 106%であった（図 2.6.2-8　上）。2 つ目の試験では、セルペルカチニブ（30 又は 50 mg/kg BID）、カボザンチニブ（40 mg/kg QD）又は溶媒（QD）を 28 日間経口投与し、腫瘍体積を週 2 回測定した。セルペルカチニブは腫瘍増殖を用量依存的に抑制し、30 及び 50 mg/kg BID 群における腫瘍増殖抑制率はそれぞれ 106%及び 110%であり（図 2.6.2-8　下）、部分奏効が認められたのは、それぞれ 1 及び 5 匹であった。いずれの有効性試験においても、群平均体重減少率が 4%を超えることはなく（図 2.6.2-8　右）、薬物に関連した死亡は認められなかった。これらの結果から、セルペルカチニブは KIF5B-RET 陽性 PDX 腫瘍の増殖を用量依存的に抑制し、忍容性は良好であることが示された。

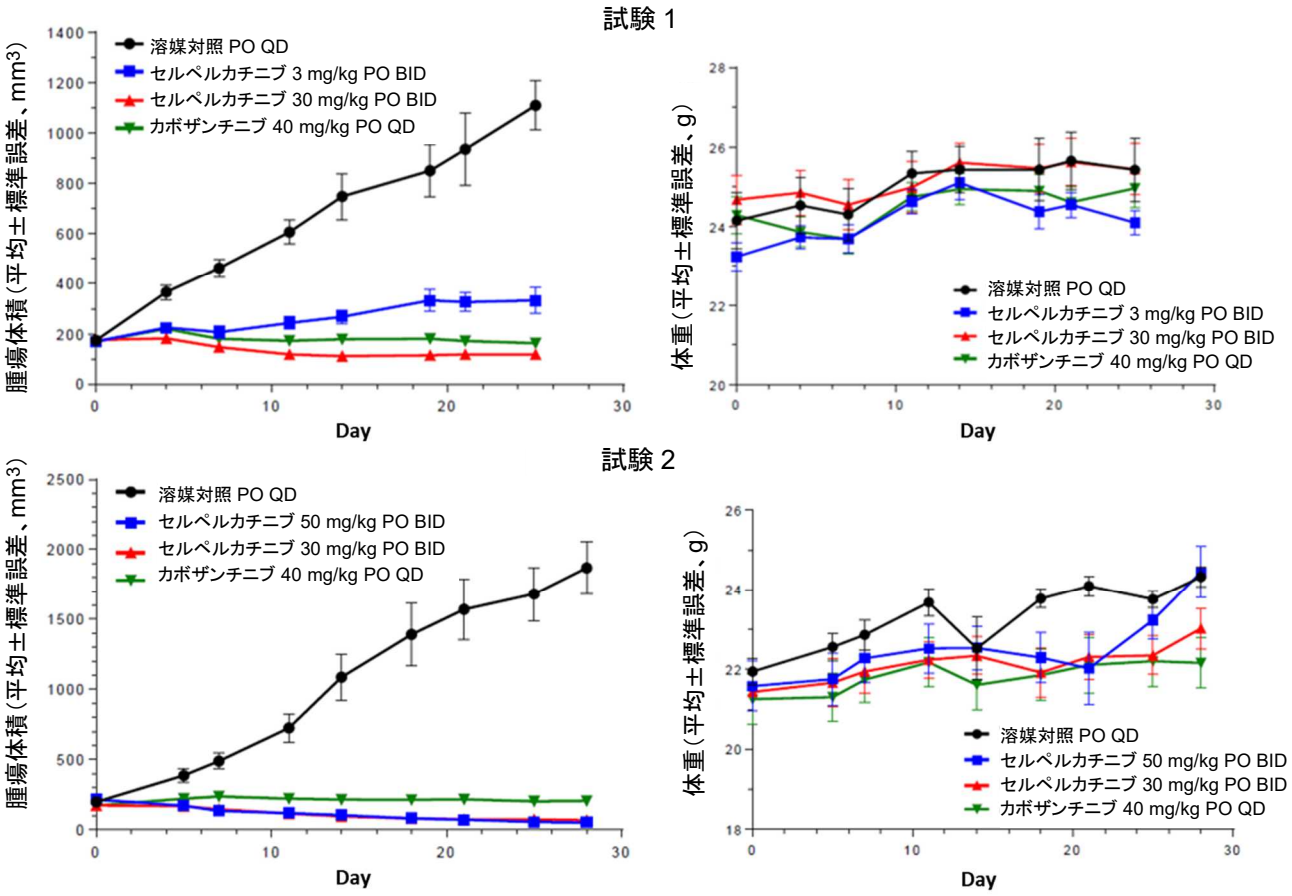


図 2.6.2-8. KIF5B-RET 陽性 NSCLC PDX 腫瘍モデルにおける腫瘍増殖抑制作用
（各群 n = 8、試験 1 のカボザンチニブ群のみ n = 12）

2.6.2.2.2.5　脳に移植した RET 融合遺伝子陽性 PDX 腫瘍の増殖抑制作用

報告書 LOXO-292-PHARM-013 (4.2.1.1.15)

雌ヌードマウス（Balb/c:Nu/Nu）の脳に CCDC6-RET 融合タンパク質発現 PDX 腫瘍である CR2518 懸濁液を注入し、脳内での腫瘍増殖に対するセルペルカチニブの抑制作用を検討した。移植 7 日後にマウスを無作為に割り付け（1 群 10 匹）、セルペルカチニブ（30 mg/kg BID）、ポナチニブ（20 mg/kg QD、陽性対照）又は溶媒（QD）を経口投与した。一般状態及び生死を連日評価し、試験中止基準である倫理的エンドポイントを満たした場合、安楽死させた（報告書 LOXO-292-PHARM-013）。溶媒対照群の動物はいずれも 23～54 日目（生存期間中央値は 28 日）に安楽死させたが、セルペルカチニブ及びポナチニブ投与群では 58 日目に全例が生存していた（図 2.6.2-9）。59 日目にセルペルカチニブ及びポナチニブの用量を 10%量まで減量した。用量の減量後、ポナチニブ投与群では 1 匹を除く全例において 91 日目までに安楽死が必要となった。一方、セルペルカチニブ投与群では 10 匹中 9 匹は試験終了日の 91 日目まで生存した（図 2.6.2-9）。これらの結果から、セルペルカチニブは脳内に移植した RET 融合タンパク質陽性腫瘍の増殖を抑制することが示された。

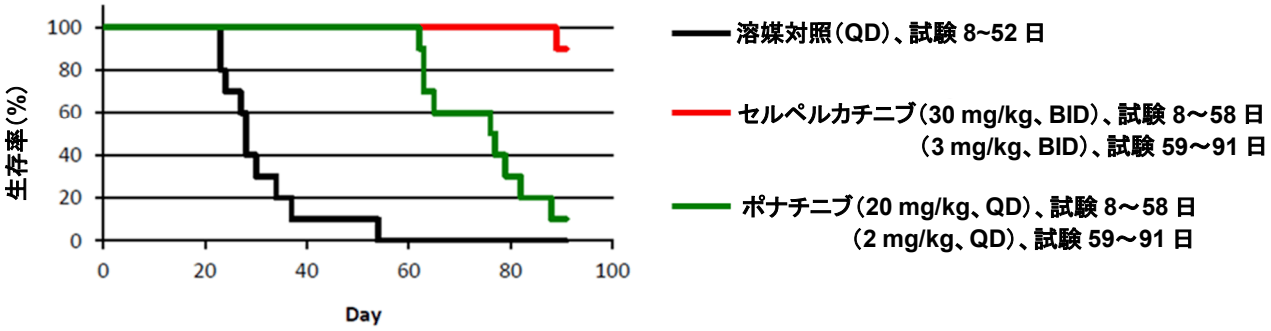


図 2.6.2-9. RET 融合タンパク質陽性 PDX 腫瘍のマウス脳内移植モデルにおける腫瘍増殖抑制作用（各群 n = 10）

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　RET 以外のキナーゼに対する作用

報告書 LOXO-292-PHARM-003 (4.2.1.1.1)、LOXO-292-PHARM-022 (4.2.1.2.1)
LOXO-292-PHARM-026 (4.2.1.2.2)、LOXO-292-PHARM-028 (4.2.1.1.2)
LOXO-292-PHARM-010 (4.2.1.2.3)、LOXO-292-PHARM-025 (4.2.1.2.4)
LOXO-292-PHARM-009 (4.2.1.2.5)、LOXO-292-PHARM-011 (4.2.1.2.6)

セルペルカチニブの RET 以外の各種キナーゼに対する阻害プロファイルを明らかにするため、広範囲なスクリーニングアッセイを実施した。

- 330 種類のキナーゼに対するセルペルカチニブの阻害作用を検討した（Eurofins KinaseProfiler™）。各アッセイは、K_m 値に近い ATP 濃度で実施し、セルペルカチニブは単一濃度［0.1 μM（野生型 RET に対する IC_{50} 値の約 250 倍）］を用いて分析した。その結果、POC 値が 50 未満（阻害率 50%超に相当）であったのは、RET を除く 329 種類のキナーゼのうち 6 種類［FLT4（VEGFR3）、FLT1（VEGFR1）、KDR（VEGFR2）、FGFR1、オーロラキナーゼ B（AURKB）及びオーロラキナーゼ C（AURKC）］のみであった（報告書 LOXO-292-PHARM-003）。
- 別に、468 種類のキナーゼに対するセルペルカチニブの結合親和性を 0.1 μM の濃度で検討した（DiscoverX scan MAX®キナーゼアッセイパネル）。Eurofins KinaseProfiler™ で検討した 330 種類のキナーゼに含まれなかった 110 種類の野生型ヒトキナーゼに限定して分析を行うと、POC 値が 50 未満であったキナーゼは 2 種類（PLK4 及び TIE1）のみであった（報告書 LOXO-292-PHARM-003）。

スクリーニングアッセイにおいて POC 値が 50 未満であった 8 種を含む RET 以外のキナーゼにおけるセルペルカチニブの阻害活性を定量するため、以下に示すアッセイを行った。結果を表 2.6.2-6 に示す。

- FGFR1、FGFR2 及び FGFR3 に対するセルペルカチニブの阻害作用は、K_m 値に相当する ATP 濃度において、時間分解蛍光―蛍光共鳴エネルギー移動（TR-FRET）分析でそれぞれの基質のリン酸化量を測定することにより評価した（報告書 LOXO-292-PHARM-003）。
- FLT1 及び FLT4 に対するセルペルカチニブの阻害作用は、1 mM ATP 存在下で HTRF アッセイを実施して評価した（報告書 LOXO-292-PHARM-003）。
- AURKB に対するセルペルカチニブの阻害作用は、LanthaScreen™ 結合アッセイを用いて FRET 分析で測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-003）。
- AURKC、KDR 及び PLK4 に対するセルペルカチニブの阻害作用は、K_m 値に相当する ATP 濃度における放射性標識 ATP キナーゼアッセイを実施して評価した（報告書 LOXO-292-PHARM-022）。
- TIE1 に対するセルペルカチニブの結合親和性は KINOME*scan*™競合結合アッセイを用いて評価した。このアッセイでは、固定化した TIE1 のリガンドとともに DNA タグ付加 TIE1 及びセルペルカチニブをインキュベートし、DNA タグを定量的 PCR により測定し、セルペルカチニブの TIE1 に対する結合定数（K_d）を算出した（報告書 LOXO-292-PHARM-026）。
- その他のキナーゼとして、AXL（報告書 LOXO-292-PHARM-022）、DDR1、FLT3、JAK1、JAK2、JAK3、PDGFRb、TRKA 及び TRKC に対するセルペルカチニブの阻害活性を評価するため、K_m 値に相当する ATP 濃度において放射性標識 ATP キナーゼアッセイを実施した（報告書 LOXO-292-PHARM-028）。

これらの結果、RET に対するセルペルカチニブの IC_{50} 値（K_m 値に相当する ATP 濃度で測定）はアッセイ系によらず 0.42～0.56 nM であったことに比べて（表 2.6.2-1）、AURKB、AURKC、AXL、DDR1、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、JAK1、JAK2、JAK3、KDR、PDGFRb、PLK4、TRKA 及び TRKC に対する IC_{50} 値はそれぞれ 78.8、214、171、36.3、65.4、26.7、53.8、41.3、>5000、>5000、>5000、21.9、2100、45.6、>5000 及び>5000 nM であった（表 2.6.2-6）。TIE1 に対するセルペルカチニブの K_d 値は 93 nM であった（表 2.6.2-6）。FLT1 及び FLT4 に対する IC_{50} 値（1 mM の ATP 濃度で測定）はそれぞれ 27.7 及び 11.9 nM であり、同じ施設で測定した RET に対する IC_{50} 値は 17.3 nM であった（表 2.6.2-6）。これらのデータから、セルペルカチニブは RET に高度の選択性（FLT1 及び FLT4 を除き）を有することが示された。

表 2.6.2-6. 酵素アッセイでの非標的キナーゼに対するセルペルカチニブの作用

報告書番号	キナーゼ	Eurofins スクリーニング	DiscoverX スクリーニング	酵素アッセイ	K_m ATP 反復測定回数	酵素アッセイ	1 mM ATP 反復測定回数	RET と比較した倍数 [a]
		[セルペルカチニブ] = 0.1 μM	[セルペルカチニブ] =0.1 μM	[ATP] = K_m ATP		[ATP] = 1 mM ATP		
		POC（%）	POC（%）	IC_{50}（nM）	n	IC_{50}（nM）	n	
LOXO-292-PHARM-028	RET	-	-	0.56 ± 0.03	7	-	-	1
LOXO-292-PHARM-003	RET	-1	0	-	-	17.3 ± 6.7	48	1
LOXO-292-PHARM-003	AURKB	33.5	59	78.8 ± 13.7[b]	30	-	-	141
LOXO-292-PHARM-003	AURKC	44.5	18	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-022	AURKC	-	-	214 ± 72	4	-	-	382
LOXO-292-PHARM-003	AXL	64.5	10	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-022	AXL	-	-	171 ± 57	4	-	-	305
LOXO-292-PHARM-003	DDR1	73.5	63	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	DDR1	-	-	36.3 ± 12.0	4	-	-	65
LOXO-292-PHARM-003	FGFR1	29.5	46	65.4 ± 9.8	14	-	-	117
LOXO-292-PHARM-003	FGFR2	57.5	47	26.7 ± 4.4	14	-	-	48
LOXO-292-PHARM-003	FGFR3	76	50	53.8 ± 14.2	14	-	-	96
LOXO-292-PHARM-003	FLT1	10.5	35	-	-	27.7 ± 11.7	35	1.6
LOXO-292-PHARM-003	FLT3	65.5	63	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	FLT3	-	-	41.3 ± 2.8	4	-	-	74
LOXO-292-PHARM-003	FLT4	5.5	8.8	-	-	11.9 ± 4.3	22	0.7
LOXO-292-PHARM-003	JAK1	119	100	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	JAK1	-	-	> 5000	4	-	-	>8900
LOXO-292-PHARM-003	JAK2	86.5	100	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	JAK2	-	-	>5000	4	-	-	>8900
LOXO-292-PHARM-003	JAK3	114	100	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	JAK3	-	-	>5000	4	-	-	>8900
LOXO-292-PHARM-003	KDR	21	43	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-022	KDR	-	-	21.9 ± 6.6	4	-	-	39
LOXO-292-PHARM-003	PDGFRb	87.5	44	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	PDGFRb	-	-	2100 ± 380	4	-	-	3750
LOXO-292-PHARM-003	PLK4	-	12	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-022	PLK4	-	-	45.6 ± 21.6	4	-	-	81

表 2.6.2-6. 酵素アッセイでの非標的キナーゼに対するセルペルカチニブの作用（続き）

報告書番号	キナーゼ	Eurofins スクリーニング	DiscoverX スクリーニング	酵素アッセイ	K_m ATP 反復測定回数	酵素アッセイ	1 mM ATP 反復測定回数	RET と比較した倍数 [a]
		[セルペルカチニブ] = 0.1 μM	[セルペルカチニブ] =0.1 μM	[ATP] = K_m ATP		[ATP] = 1 mM ATP		
		POC（%）	POC（%）	IC_{50}（nM）	n	IC_{50}（nM）	n	
LOXO-292-PHARM-003	TIE1	-	26	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-026	TIE1	-	-	93 ± 23 [b]	4	-	-	166
LOXO-292-PHARM-003	TRKA	189.5	91	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	TRKA	-	-	>5000	4	-	-	>8900
LOXO-292-PHARM-003	TRKC	115.5	77	-	-	-	-	-
LOXO-292-PHARM-028	TRKC	-	-	>5000	4	-	-	>8900

IC_{50} 値は平均値 ± 標準偏差で示す。

[a] 結合アッセイ及び K_m ATP アッセイの結果が得られているキナーゼについては、K_m に相当する ATP 濃度で測定した RET IC_{50} 値と比較した。1 mM の ATP 濃度で測定したキナーゼについては、そのキナーゼアッセイと同じ施設及び同様の方法により得られた RET IC_{50} 値と比較した。

[b] AURKB 及び TIE1 は ATP 非存在下の結合アッセイで測定した。TIE1 の値は K_d である。

Biacore T200 を用いた表面プラズモン共鳴法により、セルペルカチニブの FGFR1 に対する結合親和性を評価した。ビオチン化 FGFR1 をストレプトアビジンアフィニティーチップに捕捉し、様々な濃度でセルペルカチニブを処理した。各濃度で得られたセンサーグラムから、結合速度定数［k_a（$M^{-1}s^{-1}$）］、解離速度定数［k_d（s^{-1}）］を求め、k_d/k_a の比から K_D を算出した（報告書 LOXO-292-PHARM-003）。セルペルカチニブの FGFR1 に対する K_D は 33.8 nM であった（表 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7. セルペルカチニブの FGFR1 に対する結合及び解離速度

キナーゼ	k_a（M^{-1} s^{-1}）	k_d（s^{-1}）	解離半減期（分）	K_D（nM）
FGFR1	9.00×10^5	3.04×10^{-2}	0.38	33.8

N = 1
略語：k_a = 酵素と基質の結合速度定数、k_d = 酵素と基質の解離速度定数、K_D = 解離定数

細胞における各種キナーゼ活性に対するセルペルカチニブの阻害作用を評価するため、以下の試験を実施した。

- 細胞における FGFR1、FGFR2 及び KDR（VEGFR2）に対するセルペルカチニブの活性を定量する目的で、HEK-293 細胞にドキシサイクリン誘導性 FGFR1、FGFR2 又は KDR 遺伝子を安定的に導入した（報告書 LOXO-292-PHARM-010）。これらの細胞を様々な濃度のセルペルカチニブで処理し、リン酸化 FGFR1 及び FGFR2 レベルは ELISA アッセイ、リン酸化 KDR レベルは電気化学発光法で定量し、無処置対照群と比較した。また、細胞における FGFR1 へのセルペルカチニブの結合を評価するため、NanoBRET™技術を用い、FGFR1-NanoLuc を導入した HEK-293 細胞において細胞浸透性トレーサーの結合と競合させるのに必要なセルペルカチニブの濃度を測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-025）。
- 細胞における FLT4 に対するセルペルカチニブの阻害作用を定量するため、FLT4 を発現するマウス胎児線維芽細胞を用いて様々な濃度のセルペルカチニブで処理し、リン酸化 FLT4 レベルを ELISA アッセイで定量し、溶媒対照群と比較した（報告書 LOXO-292-PHARM-009）。
- 細胞における AURKB に対するセルペルカチニブの活性を定量するため、SW620 結腸直腸腺癌細胞を用いて細胞有糸分裂停止能を評価した（報告書 LOXO-292-PHARM-011）。細胞を様々な濃度のセルペルカチニブとともにインキュベートし、リン酸化ヒストン H3（セリン 10）レベルを免疫蛍光測定法（in-cell Western assay）により測定し、対照と比較して POC 値を算出した。
- 細胞における PLK4 へのセルペルカチニブの結合を定量するため、PLK4-NanoLuc を導入した HEK-293 細胞において細胞浸透性トレーサーの結合と競合させるのに必要なセルペルカチニブの濃度を測定した（報告書 LOXO-292-PHARM-022）。

上記の細胞アッセイのいずれにおいても、4 パラメータロジスティック回帰モデルを用いてセルペルカチニブの IC_{50} 値を求めた。結果を表 2.6.2-8 に示す。

表 2.6.2-8. 細胞アッセイでの非標的キナーゼに対するセルペルカチニブの作用

キナーゼ	報告書番号	IC_{50}（nM）	n	評価指標
AURKB	LOXO-292-PHARM-011	5318	2	リン酸化ヒストン H3
FGFR1	LOXO-292-PHARM-010	248 ± 130	16	リン酸化 FGFR1
FGFR1	LOXO-292-PHARM-025	1286 ± 347[a]	3	標的結合
FGFR2	LOXO-292-PHARM-010	242 ± 205	28	リン酸化 FGFR2
FLT4	LOXO-292-PHARM-009	33	2	リン酸化 FLT4
KDR	LOXO-292-PHARM-010	683 ± 167	20	リン酸化 KDR
PLK4	LOXO-292-PHARM-022	>5000	2	標的結合

[a] 平均値±標準誤差で示す。
特に記載のない IC_{50} 値については平均値±標準偏差で示す。

これらの細胞アッセイでのデータから、セルペルカチニブはこれら 6 種類のキナーゼと比較して RET に選択性を有することが示された。表 2.6.2-6 に示したように、セルペルカチニブは 1 mM ATP 存在下で RET、FLT1 及び FLT4 のキナーゼ活性を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 17.3、27.7 及び 11.9 nM であった。より生理学的意義のある細胞アッセイでは、セルペルカチニブの FLT4 に対する IC_{50} 値は 33 nM であり、これは細胞における RET 阻害作用の IC_{50} 値（3.3～4.3 nM）の約 8～10 倍であった。

2.6.2.3.1.2　その他の受容体及び酵素に対する作用

報告書 LOXO-292-PHARM-002 (4.2.1.2.7)

セルペルカチニブの各種分子標的に対する作用を放射性リガンド結合試験、細胞及び核内受容体機能試験、並びに酵素及び取込み試験を用いて評価した。セルペルカチニブは 1 μM の濃度で評価した。放射性リガンド結合試験において、膜貫通型及び可溶型受容体、イオンチャネル、並びにモノアミントランスポーターを含む 54 種類の分子のうち、5-HT トランスポーター（拮抗型放射性リガンドを 70.2%阻害）及び $a_{2c}(h)$ アドレナリン受容体（拮抗型放射性リガンドを 51.7%阻害）を除き、50%以上の結合又は明らかな阻害活性は認められなかった。なお、1 μM は、推奨臨床用量 160 mg BID における最高非結合型濃度（幾何平均値 $C_{max,\ unbound}$ = 301 nM）の約 3 倍の濃度である。

2.6.2.4　安全性薬理試験

セルペルカチニブの安全性薬理評価として、心血管系に関する in vitro 試験（GLP 適用の hERG アッセイを含む）、ミニブタを用いた心血管系試験及びラットを用いた呼吸系試験並びに反復投与毒性試験の中での中枢神経系（ラット 28 日間試験）及び心血管系（ミニブタ 28 日間及び 91 日間試験）の評価を行った。経口投与試験において、セルペルカチニブ投与液の媒体には 1%カルボキシメチルセルロースナトリウム及び 0.02%ドデシル硫酸ナトリウムの水溶液を用いた。

2.6.2.4.1 心血管系に関する試験

2.6.2.4.1.1 イオンチャネルに対する作用（GLP 非適用）

報告書 LOXO-292-SPHARM-001 (4.2.1.3.1)、表 2.6.3.4.1

hERG、Nav1.5、Cav1.2 及び KvLQT1/minK をそれぞれ発現させた各種細胞株を用いて、セルペルカチニブ（1、3、10、30 及び 100 μM）の各種イオン電流［hERG 電流（瞬時活性型カリウム電流：IKr）、ナトリウム電流（ピーク及び遅延）、カルシウム電流、緩徐活性型カリウム電流（IKs）］に対する作用を評価した（ホールセルパッチクランプ法）。その結果、セルペルカチニブは hERG 電流を阻害したが（IC_{50} 値：11.7 μM）、その他のイオン電流に対しては、最高濃度（100 μM）でも阻害率は 50%未満であった。

単離ヒト心室筋細胞におけるセルペルカチニブ（1、3 及び 10 μM）の影響も検討した。ヒト心筋細胞を単離後 24 時間以内に細胞内微小電極法で活動電位を測定したところ、セルペルカチニブは 10 μM の濃度で APD_{90} が約 7.8%延長した。その他の活動電位パラメータ（APD_{30}、APD_{60}、V_{max}）への影響は認められなかった。早期後脱分極などの不整脈イベントは 10 μM までの濃度で認められなかった。

以上の結果から、セルペルカチニブは 30 μM 以下の濃度で hERG を選択的に阻害し、その結果ヒト心室活動電位における APD_{90} の延長が生じる可能性が考えられた。

2.6.2.4.1.2 hERG アッセイ（GLP 適用）

報告書 LOXO-292-SPHARM-003 (4.2.1.3.3)、表 2.6.3.4.2

hERG チャネルを発現させた HEK-293 細胞を用いて、セルペルカチニブの hERG チャネル電流に対する影響を生理的温度条件下で検討した。

セルペルカチニブの 0（媒体対照）、0.3、1、3 及び 10 μM の濃度における hERG 電流阻害率（平均値 ± SEM、n = 3）はそれぞれ 0.5 ± 1.3%、21.4 ± 0.6%、50.2 ± 1.9%、72.3 ± 0.4%及び 88.2 ± 0.3%であり、媒体対照値と比較し全てのセルペルカチニブ処理群で統計学的に有意（$p<0.05$）な差が見られた。セルペルカチニブの hERG 電流阻害作用の IC_{50} 値は 1.1 μM であった。

陽性対照（テルフェナジン：60 nM）の hERG 電流阻害率（平均値 ± 標準偏差、n = 2）は 89.0 ± 0.6%であり、試験系の適切性が確認された。

2.6.2.4.1.3 ミニブタにセルペルカチニブを単回経口投与したときの心血管系への影響（GLP 適用試験）

報告書 LOXO-292-SPHARM-002 (4.2.1.3.2)、表 2.6.3.4.3

テレメトリーを装着した覚醒雄ゲッチンゲンミニブタ 4 匹に、セルペルカチニブを 0（媒体対照）、2、5 及び 12 mg/kg のいずれかの用量を 1、8、15 及び 24 日目に経口投与し、心血管系及び体温に対するセルペルカチニブの影響を評価した（ラテン方格法クロスオーバーデザイン：表 2.6.2-9）。

高用量は、ミニブタの 14 日間投与毒性試験（GLP 非適用試験）（第 2.6.6.3.5 項）において 25 mg/kg 以上の用量では忍容性が認められなかったことから、ミニブタの状態悪化が心血管系評価項目の交絡因子となるのを避けるため、忍容性が認められた用量として 12 mg/kg とした。テレメトリーデータを、少なくとも投与 90 分前から投与後 24 時間以上にわたり連続的に記録し、血

行動態（心拍数並びに収縮期、拡張期及び平均動脈圧）、体温及び心電図パラメータ［PR、RR、QRS、QT、個々に補正した QT（individually corrected QT：QTc(I)］の評価を行った。データは投与時点から投与後 6 時間までの 1 時間ごとの平均値（ブロック 1）及び投与後 6～24 時間までの 2 時間ごとの平均値（ブロック 2）として集計した。

表 2.6.2-9. ミニブタを用いた心血管系への影響に関する試験のデザイン

動物番号	試験セッション			
	Week 1	**Week 2**	**Week 3**	**Week 4**
7M	0 mg/kg	12 mg/kg	5 mg/kg	2 mg/kg
8M	2 mg/kg	0 mg/kg	12 mg/kg	5 mg/kg
9M	5 mg/kg	2 mg/kg	0 mg/kg	12 mg/kg
10M	12 mg/kg	5 mg/kg	2 mg/kg	0 mg/kg

投与容量：5 mL/kg

セルペルカチニブに関連した一般状態の変化及び体重への影響は認められなかった。

用量 2、5 及び 12 mg/kg のセルペルカチニブの投与に起因する異常な心電図波形、不整脈、並びに心電図及び血行動態パラメータの定量的変化は認められなかった。

12 mg/kg において、媒体対照値と比較し心拍数の有意な減少（ブロック 1 及び 2）及び RR 間隔の有意な延長（ブロック 2）が見られた。ブロック 1 における心拍数の減少は、1 匹の動物（10M）に見られた心拍数の減少に起因するものであったが、この動物における投与 3～4 時間後の心拍数は同個体のベースライン値と同程度であったことから、生理学的に重要ではないと判断した。ブロック 2 における心拍数の減少及び RR の延長は、別の 1 匹（9M）に見られた投与 14～24 時間後の心拍数の減少に起因するものであったが、この個体に媒体を投与後の値と同程度であったことから、生理学的に重要ではないと判断した。

以上、本試験条件下において心血管系及び体温への影響は認められず、セルペルカチニブの心血管系機能に関する無影響量（no observed effect level：NOEL）は 12 mg/kg であった。

2.6.2.4.1.4　ミニブタを用いた 28 日間投与毒性試験における心電図の評価（GLP 適用試験）

報告書 LOXO-292-TOX-002 (4.2.3.2.6)、表 2.6.7.7.3

雌雄ゲッチンゲンミニブタを用いたセルペルカチニブの 28 日間投与毒性試験［0（媒体対照）、2、5 又は 12 mg/kg］において心電図の評価を実施した。投与前期間に 2 回（1 週間間隔）、並びに投与 3 日及び 23 日の投与約 2 時間後にそれぞれ 1 回、麻酔下（ミダゾラム及びデクスメデトミジン）にて 6 誘導心電図を測定した。投与 23 日の検査で異常が認められなかったため、回復期間の検査は実施しなかった。

セルペルカチニブの曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-24}）は用量の増加に伴って増加した。いずれの用量においても、心拍数、PR 間隔、QRS 時間、QT 間隔及び QTc 間隔に、セルペルカチニブに関連した影響は認められなかった。対照と比較して統計学的に有意な QT 間隔の変化が、投与期間の 3 日目において 5 及び 12 mg/kg/日群の雌（それぞれ最大 25 及び 27 msec）に、23 日目において 12 mg/kg/日群の雌（最大 37 msec）に認められたが、同じ時点における QTc 値は正常であったことから、生理的意義は低いと判断した。

心電図の定性的評価において、心房性期外収縮が対照群の雄 1 匹（投与前期間に 3 回）、対照群の雌 1 匹（投与前期間に 2 回）及び 2 mg/kg の雄 1 匹（投与 3 日に 1 回）で認められたが、いずれもミニブタの正常範囲内の変化であった。

以上、セルペルカチニブに関連した心電図パラメータの変化は 12 mg/kg までの用量で認められなかった。

2.6.2.4.1.5　ミニブタを用いた 91 日間投与毒性試験における心電図の評価（GLP 適用試験）

報告書 LOXO-292-TOX-012 (4.2.3.2.7)、表 2.6.7.7.4

雌雄のゲッチンゲンミニブタを用いたセルペルカチニブの 91 日間投与毒性試験［0（媒体対照）、2、5 又は 15 mg/kg］において心電図の評価を実施した。投与前期間に 1 回、及び投与 4 日、86 日（雄）及び 88 日（雌）の投与約 2 時間後にそれぞれ 1 回、回復期間の 4 週目に 1 回、麻酔下（ミダゾラム及びデクスメデトミジン）にて 6 誘導心電図を測定した。なお、高用量（15 mg/kg）では 27 日目に雄 3 例、26 日目に雌 4 例をそれぞれ瀕死屠殺した。同群の残りの動物についてはこの時点で投与を終了し、4 週間の回復期間の後剖検したことから、投与 86 日／88 日の心電図データは得られなかった。

セルペルカチニブの曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$）は用量の増加に伴って増加した。

投与 88 日の 5 mg/kg の雌において、QTc 間隔及び QT 間隔が対照と比較し統計学的に有意に延長し、投与前値と比較しても延長した（表 2.6.2-10）。この QTc 延長は軽度（対照群及び投与前値と比較しそれぞれ約 12%及び 7%の増加）であり毒性ではないものの、セルペルカチニブの投与に関連する可能性があると考えられた。

この他、いくつかの時点（投与 4 日：5 mg/kg の雌及び 15 mg/kg の雌雄、投与 86 日：5 mg/kg の雄）で対照と比較し統計学的に有意な QT 間隔延長が見られた。投与 4 日に QT 値で見られた変化は、いずれも同じ時点における QTc 値が正常であったこと及び 4 日目における QT 値が投与前値よりも短かったこと、投与 86 日における 5 mg/kg の雄の QTc 値は、それぞれの投与前期間の値よりも短かったことから、その生理的意義は低くセルペルカチニブ投与の影響ではないと判断した。

表 2.6.2-10. ミニブタを用いた 91 日間投与毒性試験における QT 及び QTc データ

測定パラメータ		QT（msec）					QTc（msec）				
		投与前期間	投与期間		回復期間		投与前期間	投与期間		回復期間	
測定日（day）		-7	4	88	25	28	-7	4	88	25	28
雄	0（媒体対照）	283	290	318	312	NA	349	335	350	356	NA
	2 mg/kg	333	303	331	326	NA	380	341	357	352	NA
	5 mg/kg	347	300	349	305	NA	385	348	376*	347	NA
	15 mg/kg[a]	329	326*	NA	NA	341	369	356	NA	NA	389
雌	0（媒体対照）	326	297	316	317	NA	364	331	357	353	NA
	2 mg/kg	336	294	334	310	NA	368	321	361	345	NA
	5 mg/kg	340	321*	365*	357	NA	372	330	399*	371	NA
	15 mg/kg[a]	351	334*	NA	NA	304	375	353	NA	NA	365

QTc =心拍数で補正した QT （Fridericia 補正）、NA = 該当なし、* p≤0.05、msec = ミリ秒

a 投与 4 週目に一般状態の変化が見られ瀕死状態となった動物について途中屠殺を行った。同群の生存例についてはこの時点で投与を終了し 4 週間の回復期間をおいた。

投与 4 日に 5 mg/kg の雌で心拍数に対照と比較して統計学的に有意な減少が認められたが、15 mg/kg では同様の変化は見られなかったことから、セルペルカチニブとの関連はないと考えられた。PR 間隔及び QRS 時間に変化は認められなかった。回復期間には、心拍数、QT 間隔及び QTc の変化は認められなかった。

心電図の定性的評価（調律及び波形）においてセルペルカチニブに関連した異常は認められなかった。

以上、セルペルカチニブに関連した心電図パラメータの変化として、投与 88 日に 5 mg/kg の雌で軽度な QTc 延長が見られたが、毒性変化ではないと判断した。

2.6.2.4.2　中枢神経系に関する試験（GLP 適用試験）

報告書 LOXO-292-TOX-001(4.2.3.2.3)、表 2.6.7.7.1

雌雄の Sprague Dawley ラットを用いた 28 日間投与毒性試験［雄には 0（媒体対照）、5、20 及び 75/45[2] mg/kg、雌には 0、15、50、150/120 [1] mg/kg の用量で投与］において、機能観察総合評価並びに体温及び自発運動量の評価を実施した。検査は投与開始前及び投与 4 週（10 匹/性/群）並びに回復期間 4 週（5 匹/性/群）に盲検下で実施した。検査はほぼ同じ時刻に実施し、各個体とも機能観察総合評価［ホームケージ内での観察、ハンドリング観察及びオープンフィールド観察、並びに刺激に対する感覚反応性（行動誘発）］での測定を実施した後、引き続き自発運動量測定［自動化フォトセル運動量測定装置による 40 分間の運動量（基本運動、X + Y 移動、微細運動及び立ち上がり運動）］を実施した。

機能観察総合評価の結果

高用量群において投与 4 週の自発運動量の減少の発現頻度が軽度に上昇し、同群の雄では平均前肢握力の統計学的に有意な減少も認められた。回復期間におけるこれらの値は、対照とほぼ同程度であった。高用量の雌で回復期間における前肢握力は対照群と比較しわずかに弱かったが、統計学的有意差は認められなかった。その他の神経学的評価（ホームケージ観察、ハンドヘルド観察、その他の行動誘発）に所見は認められなかった。

自発運動量の結果

高用量の雄で投与 4 週の基本運動及び X + Y 移動の数の統計学的に有意な減少が認められた。同群では微細運動及び立ち上がりについても低値であった（統計学的解析は実施せず）。雌でもこれらの値が減少した例がごく少数見られ、一部は統計学的に有意な差も見られたものの、変化に一貫性が認められなかったことからセルペルカチニブによるものではないと考えられた。

回復期間において、統計学的に有意な変化は認められなかったものの、高用量の雄では基本運動、微細運動及び X + Y 移動において概して低値を示した。

以上、高用量（雄：75/45 mg/kg、雌：150/120 mg/kg）において機能観察総合評価における変化及び自発運動量の減少が見られたものの、その他の神経学的評価において所見は認められず、病理組織学的検査で中枢神経系の組織に異常は認められなかった。本毒性試験における高用量は、動物の 10%に重篤な毒性が発現する投与量（severely toxic dose in 10% of animals：STD10）であっ

[2] 高用量（雄：75 mg/kg、雌：150 mg/kg）で重度の毒性が見られたため、同群の雄は 8～10 日目に休薬した後、11 日目に 45 mg/kg に減量して投与を再開した。高用量（150 mg/kg）の雌についても、16 日目に 120 mg/kg に減量したが、重度の毒性が持続したため 18～20 日目に休薬した後、21 日目に 120 mg/kg で投与を再開した。

たことから、高用量での機能観察総合評価及び自発運動量の変化は、特異的な神経学的変化ではなく、動物の全身状態の悪化及び体重変化に関連するものと考えられた。

2.6.2.4.3 呼吸系に関する試験（GLP 適用試験）

報告書 LOXO-292-SPHARM-004 (4.2.1.3.4)、表 2.6.3.4.4

雄 SD ラット（8 匹/群）にセルペルカチニブ［0（媒体対照）、5、20 又は 45 mg/kg］を単回経口投与したときの 1 回換気量、呼吸数及び分時換気量について、ヘッドアウトプレチスモグラフィーを用いて測定し、呼吸系機能への影響を評価した。

高用量（45 mg/kg）は、ラットを用いた 28 日間投与毒性試験（第 2.6.6.3.3 項）において、75 mg/kg の雄で重度の一般状態変化及び体重減少が生じたため 2 匹を途中屠殺し、生存例については 45 mg/kg に減量したことから設定した。投与前日（ベースライン）、投与 30 分後から 6 時間後まで、及び投与 24 時間後にデータを採取した。さらに、動物の全身健康状態の評価を生死及び一般状態の観察により行った。

死亡および一般状態の変化は見られなかった。呼吸系機能のいずれのパラメータにもセルペルカチニブ投与の影響は認められなかった。

以上、セルペルカチニブのラット呼吸系機能に関する NOEL は 45 mg/kg であった。

2.6.2.5 考察及び結論

In vitro 及び in vivo 薬力学的試験において、セルペルカチニブは強力かつ選択的な RET RTK 阻害剤であり、RET 以外のキナーゼ及び分子はほとんど阻害せず、良好な薬理プロファイルを示すことが確認された。In vitro 試験において、セルペルカチニブは野生型 RET キナーゼを阻害し、IC_{50} 値は、K_m 値相当の ATP 濃度で測定したとき 0.4～0.56 nM、KIF5B-RET 発現 HEK-293 細胞を用いて測定したとき 3.3～4.3 nM であった。また、セルペルカチニブは遺伝性変異（A883F、M918T）及び耐性獲得性変異（V804L、V804M）といった多様な活性変異型 RET に対しても十分な活性を示した。

恒常的に活性化された KIF5B-RET 融合タンパク質を発現する NIH-3T3 細胞を皮下移植したマウスにセルペルカチニブを単回経口投与したところ、腫瘍内 RET リン酸化を抑制した。V804M 変異を有する腫瘍モデル［KIF5B-RET-V804M NIH-3T3 及び CR2545（CCDC6-RET-V804M）］を含む複数の RET 遺伝子異常陽性腫瘍モデルにセルペルカチニブを 1 日 2 回経口投与したとき、腫瘍増殖が有意に抑制された。また、RET 融合遺伝子陽性患者由来腫瘍の脳内移植モデルにおいて、セルペルカチニブは生存期間を有意に延長した。

セルペルカチニブの in vitro での各種キナーゼに対する広範囲なスクリーニングにおいて、セルペルカチニブは検討した 329 種類のキナーゼ（RET 以外）の 98%と比較して RET に高い選択性（250 倍以上）を示し、更なる酵素活性アッセイ、結合アッセイ及び細胞アッセイにおいても、RET 以外のキナーゼ並びに分子と比較して RET に対する高い選択性を示した。なお、セルペルカチニブは 1 mM ATP 存在下で RET、FLT1 及び FLT4 のキナーゼ活性を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 17.3、27.7 及び 11.9 nM であった。より生理学的意義のある細胞アッセイでは、セルペルカチニブの FLT4 に対する IC_{50} 値は 33 nM であり、これは細胞における RET 阻害作用の IC_{50} 値（3.3～4.3 nM）の約 8～10 倍であった。特異的 RET 阻害剤で想定されるように、恒常的に活性化され

たRETを発現していないヒトがん細胞株には、セルペルカチニブは有意な抗増殖作用を示さなかった。

セルペルカチニブの安全性薬理評価として、in vitroにおける心血管系に関する試験（GLP適用のhERGアッセイを含む）、ミニブタを用いた心血管系試験及びラットを用いた呼吸系試験並びに反復投与毒性試験の中での中枢神経系（ラット28日間試験）及び心血管系（ミニブタ28日間及び91日間試験）の評価を行った。

hERGアッセイにおけるセルペルカチニブのIC_{50}値は1.1 μMであった。各種イオンチャネル［hERG、Nav1.5、Cav1.2及びKvLQT1/minK］を発現させた細胞株を用いてセルペルカチニブのイオンチャネル阻害作用を評価した結果、セルペルカチニブはhERG電流のみを阻害した。テレメトリー装着覚醒ミニブタにセルペルカチニブを12 mg/kgまでの用量で単回経口投与したとき、投与に起因する心電図波形の異常、不整脈、並びに心電図及び血行動態データの定量的変化は認められなかった。この用量におけるC_{max}及びその$C_{max,\ unbound}$はそれぞれ909 ng/mL［臨床用量（160 mg BID）におけるヒトC_{max}（表2.6.2-11参照）よりも低い］及び47 nM（hERGアッセイにおけるIC_{50}値よりも低い）であった。ミニブタに12 mg/kg（22日目のC_{max}：1120 ng/mL）までの用量で28日間反復投与したとき、心電図の変化は認められなかった。一方、91日間投与毒性試験において雌のミニブタに5 mg/kgの用量（雌の91日目のC_{max}：565 ng/mL）で投与したとき、投与88日目にQTcの有意な延長が認められたが、軽度の変化であったことから毒性変化ではないと判断した。

セルペルカチニブのミニブタを用いた試験は、予備試験（ミニブタの14日間投与毒性試験）で25 mg/kgの用量において忍容性が認められず、セルペルカチニブの毒性の用量反応曲線は極めて急峻であったことから、ヒトよりも低い曝露量での評価しかできなかった。

ラット28日間投与毒性試験において、機能観察総合評価及び自発運動量の評価を含む神経行動機能の評価を行った。75 mg/kg群の雄（試験途中で45 mg/kgに減量）及び150 mg/kg群の雌（試験途中で120 mg/kgに減量）において、自発運動量の減少が認められた。75/45 mg/kg群の雄では平均前肢握力の有意な低下及び微細運動又は立ち上がりの減少が認められた。いずれも概して可逆的であり、病理組織学的検査で神経組織に異常はなかったことから、高用量で生じた一般状態の悪化及び体重変化に起因すると考えられ、特異的な神経学的変化ではなかったと考えられた。また、セルペルカチニブについて各種受容体、イオンチャネル、並びにモノアミントランスポーターを含む54種類の標的に対するリガンド結合阻害を調べた結果、5-HTトランスポーター（拮抗型放射性リガンドを70.2%阻害）及び$a_{2c}(h)$（拮抗型放射性リガンドを51.7%阻害）の2種を除き、50%以上の結合又は明らかな阻害活性は認められなかった。さらに、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]セルペルカチニブ由来放射能の脳室周囲以外の中枢神経系組織への分布は低かった（第2.6.4.4.2項）。

ラットを用いた呼吸系試験において、セルペルカチニブを45 mg/kgの用量まで単回経口投与しても呼吸機能への影響は認められなかった。

動物及びヒトにおける全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24}$、C_{max}）の比較を表2.6.2-11に示す。

表 2.6.2-11. 安全性薬理評価におけるセルペルカチニブの濃度あるいは全身曝露量とヒト曝露量の比較

重要な所見	用量（mg/kg/日）	AUC_{0-24}[a] (ng·h/mL)	C_{max}[a] (ng/mL)	曝露倍数[a] AUC に基づく[b]	曝露倍数[a] C_{max} に基づく[c]
心血管系試験					
hERG 試験 IC_{50}	1.1 μM[e]				4[d]
ミニブタ単回投与心血管系試験 血行動態及び心電図への影響なし	12		909[f]		0.2
ミニブタ 28 日間投与毒性試験 心電図の変化なし	12		1120[g]		0.3
ミニブタ 91 日間投与毒性試験 非毒性的な QTc 延長（投与 88 日、雌）	5		565[h]		0.1
中枢神経系					
ラット 28 日間投与毒性試験 自発運動量の減少（雌雄） 前肢握力の有意な減少（雄） 微細運動/立ち上がりの減少（雄）	雄：75/45 雌：150/120	雄：151000[i] 雌：260000[j]	雄：11700[i] 雌：19100[j]	雄：2 雌：4	雄：3 雌：5
呼吸系					
ラット単回呼吸系試験 影響なし	45		11700[i]		3
ヒト（報告書 LOXO-RET-17001）					
ヒト	160 mg BID	74200[k]	4060[k]（非結合型：301 nM、158 ng/mL）		

[a] 曝露倍数の算出には、hERG 試験については非結合型血漿中濃度を、動物を用いた試験については総血漿中濃度を用いた。

[b] AUC に基づく曝露倍数 ＝ 動物の AUC_{0-24} ÷ ヒト AUC_{0-24}

[c] C_{max} に基づく曝露倍数 ＝動物の C_{max} ÷ ヒト C_{max}

[d] hERG 試験の IC_{50} ÷ 非結合型ヒト C_{max}

[e] hERG 試験の IC_{50} 値

[f] ミニブタ 28 日間投与試験の投与 1 日における C_{max}（2.6.6.3.6）

[g] ミニブタ 28 日間投与試験の投与 22 日における C_{max}（2.6.6.3.6）

[h] ミニブタ 91 日間投与試験の投与 91 日における雌の C_{max}（2.6.6.3.7）

[i] ラット 28 日間投与試験の投与 28 日における雄の C_{max} あるいは AUC_{0-24}（2.6.6.3.3）

[j] ラット 28 日間投与試験の投与 28 日における雌の C_{max} あるいは AUC_{0-24}（2.6.6.3.3）

[k] $C_{max,human}$ 及び $AUC_{0-24,human}$ は、日本人患者（58 例）に 160 mg BID の用量で投与した臨床試験 LOXO-RET-17001 からの定常状態値（8 日目）であった（来院カットオフ：2020 年 3 月 30 日）。非結合型 C_{max} は、ヒトにおけるセルペルカチニブの遊離型分率 3.9%に基づき算出。

要約すると、セルペルカチニブの非臨床薬理学的特性から、臨床において RET 遺伝子異常（RET 融合及び変異）陽性のがんの増殖を抑制することが期待される。安全性薬理試験において、セルペルカチニブはヒトの血漿中濃度の 4 倍の濃度で hERG 電流を 50%阻害した。臨床では QTc 延長及び高血圧が報告されているが（CTD 第 2.7.4 項）、同様の心血管系に対する影響はミニブタの単回投与あるいは 28 日間投与試験では見られなかった。この理由としてミニブタではセルペルカチニブに対する感受性が特に高かったため、低い曝露量でしか試験を実施できなかったためと考えられる。なお、心血管系への影響は、RET 阻害活性を示すマルチキナーゼ阻害剤［スニチニブ（FDA, NDA 021968 sunitinib 2006）、バンデタニブ（FDA, NDA 22405 vandetanib 2011）、レンバチニブ（FDA, NDA 206947 lenvatinib 2014）］の非臨床試験及び臨床試験で報告されている。

セルペルカチニブは中枢神経系への特異的な作用や呼吸系への影響を生じる可能性が低いことが安全性薬理試験結果から示唆された。

2.6.2.6　参考文献

Acton DS, D Velthuyzen, CJ Lips, JW Höppener. Multiple endocrine neoplasia type 2B mutation in human RET oncogene induces medullary thyroid carcinoma in transgenic mice. *Oncogene*. 2000;19(27):3121-5.

Agrawal N, Y Jiao, M Sausen, R Leary, C Bettegowda, NJ Roberts, et al. Exomic sequencing of medullary thyroid cancer reveals dominant and mutually exclusive oncogenic mutations in RET and RAS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):E364-9.

Ballerini P, S Struski, C Cresson, N Prade, S Toujani, C Deswarte, et al. RET fusion genes are associated with chronic myelomonocytic leukemia and enhance monocytic differentiation. *Leukemia*. 2012;26:2384-9.

Bossi D, F Carlomagno, I Pallavicini, G Pruneri, M Trubia, PR Raviele, et al. Functional characterization of a novel FGFR1OP-RET rearrangement in hematopoietic malignancies. *Mol Oncol*. 2014;8:221-31.

Boulay A, M Breuleux, C Stephan, C Fux, C Brisken, M Fiche, et al. The Ret receptor tyrosine kinase pathway functionally interacts with the ERalpha pathway in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(10):3743-51.

Brea EJ, CY Oh, E Manchado, S Budhu, RS Gejman, G Mo, et al. Kinase Regulation of Human MHC Class I Molecule Expression on Cancer Cells. *Cancer Immunol Res*. 2016;4:936-47.

Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell*. 2014;159(3):676-90.

Carlson KM, S Dou, D Chi, N Scavarda, K Toshima, CE Jackson, et al. Single missense mutation in the tyrosine kinase catalytic domain of the RET protooncogene is associated with multiple endocrine neoplasia type 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:1579-83.

Cho JY, JE Sagartz, CC Capen, EL Mazzaferri, SM Jhiang. Early cellular abnormalities induced by RET/PTC1 oncogene in thyroid-targeted transgenic mice. *Oncogene*. 1999;18(24):3659-65.

Donis-Keller H, S Dou, D Chi, KM Carlson, K Toshima, TC Lairmore, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet*. 1993;2:851-6.

Drilon A, ZI Hu, GGY Lai, DSW Tan. Targeting RET-driven cancers: lessons from evolving preclinical and clinical landscapes. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(3):151-67.

Eng C, DP Smith, LM Mulligan, MA Nagai, CS Healey, MA Ponder, et al. Point mutation within the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2B and related sporadic tumours. *Hum Mol Genet*. 1994;3:237-41.

Fusco A, M Grieco, M Santoro, MT Berlingieri, S Pilotti, MA Pierotti, et al. A new oncogene in human thyroid papillary carcinomas and their lymph-nodal metastases. *Nature*. 1987;328:170-2.

Gozgit JM, Chen T-H, Song Y, Wardwell S, Wang F, Cai J, et al. RET fusions observed in lung and colorectal cancers are sensitive to ponatinib. *Oncotarget*. 2018;9:29654-64.

Hofstra RM, RM Landsvater, I Ceccherini, RP Stulp, T Stelwagen, Y Luo, et al. A mutation in the RET proto-oncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 1994;367:375-6.

Huang Q, VE Schneeberger, N Luetteke, C Jin, R Afzal, MM Budzevich, et al. Preclinical Modeling of KIF5B-RET Fusion Lung Adenocarcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(10):2521-9.
Ji JH, YL Oh, M Hong, JW Yun, HW Lee, D Kim, et al. Identification of Driving ALK Fusion Genes and Genomic Landscape of Medullary Thyroid Cancer. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005467.
Ju YS, WC Lee, JY Shin, S Lee, T Bleazard, JK Won, et al. A transforming KIF5B and RET gene fusion in lung adenocarcinoma revealed from whole-genome and transcriptome sequencing. *Genome Res*. 2012;22:436-45.
Kato S, V Subbiah, E Marchlik, SK Elkin, JL Carter, R Kurzrock. RET aberrations in diverse cancers: Next-generation sequencing of 4,871 patients. *Clin Cancer Res*. 2016;23(8):1988-97
Kohno T, H Ichikawa, Y Totoki, K Yasuda, M Hiramoto, T Nammo, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2012;18:375-7.
Lipson D, M Capelletti, R Yelensky, G Otto, A Parker, M Jarosz. Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 2012;18(3):382-4.
Michiels FM, S Chappuis, B Caillou, A Pasini, M Talbot, R Monier, et al. Development of medullary thyroid carcinoma in transgenic mice expressing the RET protooncogene altered by a multiple endocrine neoplasia type 2A mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):3330-5.
Morandi A, LA Martin, Q Gao, S Pancholi, A Mackay, D Robertson, et al. GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors. *Cancer Res*. 2013;73:3783-95.
Mulligan LM, JB Kwok, CS Healey, MJ Elsdon, C Eng, E Gardner. et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993;363:458-60.
Mulligan LM. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:173-86.
NDA 22405 vandetanib (2011)
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/022405Orig1s000PharmR.pdf
NDA 021968 sunitinib (2006)
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2006/021938_S000_Sutent_PharmR.pdf
NDA 206947 lenvatinib (2014)
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2015/206947Orig1s000PharmR.pdf
Plaza-Menacho I, A Morandi, D Robertson, S Pancholi, S Drury, M Dowsett, et al. Targeting the receptor tyrosine kinase RET sensitizes breast cancer cells to tamoxifen treatment and reveals a role for RET in endocrine resistance. *Oncogene*. 2010;29:4648-57.
Powell DJ Jr, J Russell, K Nibu, G Li, E Rhee, M Liao, et al. The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res.* 1998;58(23):5523-8.
Romei C, R Ciampi, R Elisei. A comprehensive overview of the role of the RET proto-oncogene in thyroid carcinoma. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(4):192-202.
Saito M, T Ishigame, K Tsuta, K Kumamoto, T Imai, T Kohno. A mouse model of KIF5B-RET fusion-dependent lung tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 2014;35(11):2452-6.
Smith J, ML Read, J Hoffman, R Brown, B Bradshaw, C Campbell, et al. Germline ESR2 mutation predisposes to medullary thyroid carcinoma and causes up-regulation of RET expression. *Hum Mol Genet*. 2016;25:1836-45.
Spanheimer PM, JM Park, RW Askeland, MV Kulak, GW Woodfield, JP De Andrade, et al. Inhibition of RET increases the efficacy of antiestrogen and is a novel treatment strategy for luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20:2115-25.
Stransky N, E Cerami, S Schalm, JL Kim, C Lengauer. The landscape of kinase fusions in cancer. *Nat Commun*. 2014;5:4846-55.
Takahashi M, J Ritz, GM Cooper. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell*. 1985;42:581-8.
Takeuchi K, M Soda, Y Togashi, R Suzuki, S Sakata, S Hatano, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18:378-81.
Wang C, JA Mayer, A Mazumdar, PH Brown. The rearranged during transfection/papillary thyroid carcinoma tyrosine kinase is an estrogen-dependent gene required for the growth of estrogen receptor positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2012;133(2):487-500.
Yang M, J Cai, S Guo, JP Wery, HQX Li. Rapid conversion to resistance, of a colon PDX with ret-fusion, by Ponatinib treatment could potentially be attributed to the introduction of the gate keeper mutation, V804M. *AACR Annual Meeting*. 2015;Poster 3581.

レットヴィモカプセル 40mg
レットヴィモカプセル 80mg

2.6.3　薬理試験概要表

日本イーライリリー株式会社

目次

2.6.3.1 Pharmacology 1
2.6.3.1.1 Pharmacology Overview 1
2.6.3.1.2 Pharmacology Overview (Continued) 2
2.6.3.1.3 Pharmacology Overview (Concluded) 3
2.6.3.2 Primary Pharmacology
(See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2) 4
2.6.3.3 Secondary Pharmacology
(See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2) 4
2.6.3.4 Safety Pharmacology 5
2.6.3.4.1 Cardiovascular - Ion Channel-Blocking Profiling (Non-GLP) 5
2.6.3.4.2 Cardiovascular - hERG in HEK-293 cells (GLP) 6
2.6.3.4.3 Cardiovascular Study in Minipig (GLP) 7
2.6.3.4.4 Respiratory Study in Rats (GLP) 8

2.6.3.1 Pharmacology

2.6.3.1.1 Pharmacology Overview

Type of Study/Description	GLP[1]	Test System	Route	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics						
RET enzyme assays	No	Isolated kinases	In vitro	[redacted] ([redacted] USA), [redacted] ([redacted] USA) [redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-003	4.2.1.1.1
Biochemical activity of LOXO-292 on RET, RET mutants, and non-RET kinases	No	Isolated kinases	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-028	4.2.1.1.2
Enzyme inhibition against RET and five RET mutations	No	Isolated kinases	In vitro	Loxo Oncology (Boulder, CO, USA)	LOXO-292-PHARM-021	4.2.1.1.3
Cellular and enzyme inhibition against RET (G810S) mutation	No	Isolated kinase Cells (HEK-293)	In vitro	Loxo Oncology (Boulder, CO, USA)	LOXO-292-PHARM-027	4.2.1.1.4
Cellular activity against KIF5B-RET WT, KIF5B-RET V804L, KIF5B-RET V804M, and RET M918T	No	Cells (HEK-293)	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-012	4.2.1.1.5
Cellular activity against KIF5B-RET WT, KIF5B-RET V804L, KIF5B-RET V804M, and RET M918T	No	Cells (HEK-293)	In vitro	Loxo Oncology (Boulder, CO, USA)	LOXO-292-PHARM-020	4.2.1.1.6
Cytotoxicity in 87 human cancer cell lines	No	Cancer cell lines in vitro	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-016	4.2.1.1.7
PK/PD study evaluating the inhibition of phospho-RET in NIH-3T3 KIF5B-RET allograft tumors	No	Mouse/NCr:Nu/Nu	Oral dose	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-008	4.2.1.1.8
Inhibition of tumor growth in a NIH-3T3 KIF5B-RET allograft study	No	Mouse/NCr:Nu/Nu	Oral dose	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-006	4.2.1.1.9
Inhibition of tumor growth in a NIH-3T3 KIF5B-RET V804M allograft study	No	Mouse/NCr:Nu/Nu	Oral dose	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-007	4.2.1.1.10

(Continued)

2.6.3.1.2 Pharmacology Overview (Continued)

Type of Study/Description	GLP[1]	Test System	Route	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
In vivo efficacy in a TT human thyroid carcinoma xenograft tumor model study	No	Mouse/NCr:Nu/Nu	Oral dose	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-004	4.2.1.1.11
In vivo efficacy in a LC-2/ad human lung carcinoma xenograft tumor model study	No	Mouse/SCID beige	Oral dose	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-005A1	4.2.1.1.12
In vivo efficacy in RET fusion PDX tumor model studies	No	PDX (CR2518 CCDC6-RET, CR2545 CCDC6-RET-V804M) Mouse/Balb/c:Nu/Nu	Oral dose	[redacted] ([redacted] China)	LOXO-292-PHARM-001	4.2.1.1.13
In vivo efficacy in Champions CTG-0838 TumorGraft® model of human non-small cell lung cancer	No	Mouse/ Athymic Nude-*Foxn1*^{nu}	Oral dose	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-017	4.2.1.1.14
In vivo efficacy in an intracranial RET fusion PDX tumor model study	No	PDX (CR2518 CCDC6-RET) Mouse/Balb/c:Nu/Nu	Oral dose	[redacted] ([redacted] China)	LOXO-292-PHARM-013	4.2.1.1.15
Secondary Pharmacodynamics						
Biochemical and cellular activity of LOXO-292 on non-RET kinases	No	Isolated kinases Cells (HEK-293)	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-022	4.2.1.2.1
Binding assay to TIE1	No	Isolated kinase	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-026	4.2.1.2.2
Cellular activity against FGFR1, FGFR2 and KDR (VEGFR2)	No	Cells (HEK-293)	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-010	4.2.1.2.3
Inhibition of FGFR1	No	Cells (HEK-293)	In vitro	Loxo Oncology (Boulder, CO, USA)	LOXO-292-PHARM-025	4.2.1.2.4
Cellular activity against FLT4 (VEGF-R3)	No	Cells (mouse embryonic fibroblasts)	In vitro	[redacted] ([redacted] Germany)	LOXO-292-PHARM-009	4.2.1.2.5
Cellular mitotic arrest activity	No	Cells (SW620)	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-011	4.2.1.2.6
In vitro pharmacology, cellular activity	No	Binding assays, enzyme inhibition, cellular effect	In vitro	[redacted] ([redacted] France)	LOXO-292-PHARM-002	4.2.1.2.7

(Continued)

2.6.3.1.3 Pharmacology Overview (Concluded)

Type of Study/Description	GLP[1]	Test System	Route	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Biochemical activity of N-oxide metabolite of LOXO-292 on RET kinase	No	Isolated kinases	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-023	4.2.1.2.8
Inhibition of RET by LOXO-292 Metabolites	No	Isolated kinase Cells (HEK-293)	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-PHARM-029	4.2.1.2.9
Safety Pharmacology						
Cardiovascular						
hERG, Nav1.5, Cav1.2, KvLQT1/minK channels / whole-cell patch clamp variant	No	HEK-293 cells, CHO cells, human ventricular myocytes	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-SPHARM-001	4.2.1.3.1
hERG channel / transgenic HEK-293 cells stably expressing hERG	Yes	HEK-293 cells	In vitro	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-SPHARM-003	4.2.1.3.3
In vivo cardiovascular	Yes	Göttingen minipig	Oral gavage	[redacted] ([redacted] UK)	LOXO-292-SPHARM-002	4.2.1.3.2
Repeated-dose minipig toxicity (28 days)	Yes	Göttingen minipig	Oral gavage	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-TOX-002	4.2.3.2.6
Repeated-dose minipig toxicity (91 days)	Yes	Göttingen minipig	Oral gavage	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-TOX-012	4.2.3.2.7
Central nervous						
Repeated-dose rat toxicity (28 days)	Yes	SD Rats	Oral gavage	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-TOX-001	4.2.3.2.3
Respiratory						
In vivo respiratory function	Yes	SD Rats	Oral gavage	[redacted] ([redacted] USA)	LOXO-292-SPHARM-004	4.2.1.3.4

[1] An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practices; HEK-293 = human embryonic kidney cells; hERG = human ether-à-go-go-related gene; LOXO-292 = selpercatinib; PDX = patient derived xenograft; PK/PD = Pharmacokinetic/Pharmacodynamic; RET = rearranged during transfection; SD = Sprague-Dawley

2.6.3.2　Primary Pharmacology (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2)

2.6.3.3　Secondary Pharmacology (See the Pharmacology Written Summary, Module 2.6.2)

2.6.3.4 Safety Pharmacology

2.6.3.4.1 Cardiovascular - Ion Channel-Blocking Profiling (Non-GLP)

Test System: hERG, Nav1.5, Cav1.2 in Stably Transfected HEK-293 cells, KvLQT1/minK in Stably Transfected CHO cells, human ventricular myocytes in whole-cell patch clamp variant. **Positive Control:** dofetilide (hERG), flecainide (Nav1.5 peak), ranolazine (Nav1.5 late), verapamil (Cav1.2), chromanol 293b (KvLQT1/minK)	**Date of Initiation:** [redacted] 20[redacted] **Vehicle/Formulation:** 0.1% DMSO Temperature: 37 ± 1°C	**Test Article:** Selpercatinib **Study No.:** LOXO-292-SPHARM-001 **Location in CTD:** 4.2.1.3.1 **GLP compliance:** No

Test Article	Concentration (µM)	Number of Cells Evaluated	Mean % Inhibition of Channel Current (± SEM)					hERG IC_{50}
			hERG	Nav1.5 peak	Nav1.5 late	Cav1.2	KvLQT1/minK	
Selpercatinib (AR00494192-04)	1	4-5	11.0 ± 2.3	0.2 ± 0.2	1.1 ± 0.9	2.2 ± 1.9	0.9 ± 0.3	11.7 µM
	3	4-5	24.0 ± 5.0	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.2	2.6 ± 1.1	1.2 ± 0.4	
	10	4-5	43.5 ± 5.4	0.4 ± 0.1	1.1 ± 1.1	2.7 ± 1.3	1.4 ± 0.5	
	30	4-5	70.5 ± 1.6	1.2 ± 0.6	1.1 ± 1.1	10.0 ± 1.5	5.5 ± 0.7	
	100	4-5	90.0 ± 2.1	5.0 ± 2.6	3.1 ± 1.4	27.4 ± 2.1	14.1 ± 1.4	
			Mean % Change					
Dofetilide	0.01	2	-76.9	NA	NA	NA	NA	
Flecainide	20	2	NA	-55.6	NA	NA	NA	
Ranolazine	6.9	2	NA	NA	-51.1	NA	NA	
Verapamil	0.5	2	NA	NA	NA	-51.3	NA	
Chromanol 293b	100	2	NA	NA	NA	NA	-55.5	

Test Article	Concentration (µM)	Number of Cells Evaluated	Action Potential (Mean ± SEM)					
			APD_{90}	APD_{60}	APD_{30}	V_{max} (V/s)		
Selpercatinib (AR00494192-04)	1	3	3.2 ± 0.4	5.5 ± 0.8	-1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.7		
	3	3	5.1 ± 0.6	6.2 ± 0.3	-0.2 ± 0.5	1.4 ± 0.4		
	10	3	7.8 ± 0.8	7.3 ± 0.3	-1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.3		

hERG = human ether-à-go-go-related gene; HEK-293 = human embryonic kidney cells; CHO = Chinese hamster ovary; DMSO = dimethylsulfoxide; µM = micromolar; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; V_{max} = maximum upstroke velocity; $APD_{30, 60, 90}$ = action potential duration at 30, 60, or 90% repolarization; V/s = volts per second; SEM = standard error of the mean; NA = not applicable

2.6.3.4.2 Cardiovascular - hERG in HEK-293 cells (GLP)

Test system: Transgenic HEK-293 cells stably expressing hERG **Positive control:** Terfenadine[1] **Temperature:** 33 to 35ºC	**Date of Initiation:** [redacted] 20[redacted] **Vehicle/Formulation:** DMSO **Pulse Protocol:** Holding potential -80 mV, 1 second prepulse to +20 mV followed by a repolarizing test ramp to – 80 mV (-0.5 V/s) repeated at 5-second intervals	**Test Article:** Selpercatinib **Study No.:** LOXO-292-SPHARM-003 **Location in CTD:** 4.2.1.3.3 **GLP compliance:** Yes **Facility:** [redacted] [redacted] USA

Test Article	Concentration (µM)[2]	Number of Cells Evaluated	% Inhibition of hERG Channel Current (Mean ± SEM)	IC_{50} (µM)
Selpercatinib	0.3	3	21.4 ± 0.6	1.1
	1	3	50.2 ± 1.9	
	3	3	72.3 ± 0.4	
	10	3	88.2 ± 0.3	

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

[2] Concentration of the test article formulation solutions were collected from the outflow of the solution delivery system. All formulations analyzed were within ± 15.0% of nominal (% RE ± 15.0%), thereby meeting the acceptance criteria

ºC = degrees Celcius; mV = millivolt; V/s = volts per second; SEM = standard error of the mean; DMSO = dimethylsulfoxide; µM = micromolar; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; hERG = human ether-à-go-go-related gene; HEK293 = human embryonic kidney cells

2.6.3.4.3 Cardiovascular Study in Minipig (GLP)

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Conscious State	Method of Administration/ Design[1]	Selpercatinib Dose (mg/kg)	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	GLP[2]	Study Number Location in CTD:
Cardiovascular Blood Pressure • Systolic • Diastolic • Mean • Heart rate Electrocardiogram Body temperature	Minipig/ Göttingen	Conscious	PO/ (4X4 Latin square design)	0 (Control)[3] 2 (low) 5 (mid) 12 (high)	M4	None NOEL = 12 mg/kg	Yes	LOXO-292-SPHARM-002 4.2.1.3.2

[1] Single dose in 4X4 Latin square dosing design.

[2] An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement

[3] Vehicle control article was 1% (w/v) carboxymethylcellulose sodium (medium viscosity; 400-800 cP), 0.02% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS; synonymous with sodium lauryl sulfate) in deionized/purified water

PO = oral gavage; M = male; NOEL = no-observed-effect-level

2.6.3.4.4 Respiratory Study in Rats (GLP)

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Conscious State	Method of Administration/ Design	Selpercatinib Dose (mg/kg)	Gender and Number per Group	Noteworthy Findings	GLP[1]	Study Number Location in CTD:
Respiratory Function Tidal volume Respiration rate Minute volume	Rat/ SD	Conscious	PO/ single dose	0 (Control)[2]	M8	None NOEL = 45 mg/kg	Yes	LOXO-292-SPHARM-004 4.2.1.3.4
				5	M8			
				20	M8			
				45	M8			

[1] An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement

[2] Vehicle control article was 1% (w/v) carboxymethylcellulose sodium (medium viscosity; 400-800 cP), 0.02% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS; synonymous with sodium lauryl sulfate) in deionized water

Dose volume=10 mL/kg

PO = oral gavage; M = male; SD = Sprague-Dawley; NOEL = no-observed-effect-level