第 2 部　CTD の概要

一般名：セルメチニブ硫酸塩

版番号：[redacted]

2.4　非臨床試験の概括評価
セルメチニブ硫酸塩

本資料に記載された情報に係る権利はアレクシオンファーマ合同会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
略語及び専門用語一覧表 4
2.4.1　非臨床試験計画概略 6
2.4.2　薬理試験 9
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 9
2.4.2.2　副次的薬理試験 11
2.4.2.3　安全性薬理試験 11
2.4.3　薬物動態試験 11
2.4.3.1　分析法 12
2.4.3.2　吸収 12
2.4.3.3　分布 13
2.4.3.4　代謝 13
2.4.3.4.1　代謝物 14
2.4.3.4.2　代謝酵素 15
2.4.3.5　排泄 16
2.4.3.6　薬物相互作用 17
2.4.3.6.1　CYP を介した薬物相互作用 17
2.4.3.6.2　UGT を介した薬物相互作用 18
2.4.3.6.3　トランスポーターを介した薬物相互作用 18
2.4.3.7　薬物動態の要約 19
2.4.4　毒性試験 20
2.4.4.1　単回投与毒性試験 20
2.4.4.2　反復投与毒性試験 20
2.4.4.2.1　マウスを用いた反復投与毒性試験 21
2.4.4.2.2　ラットを用いた反復投与毒性試験 21
2.4.4.2.3　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験 22
2.4.4.2.4　トキシコキネティクス 23
2.4.4.3　遺伝毒性試験 23
2.4.4.4　がん原性試験 23
2.4.4.4.1　ラットを用いたセルメチニブ硫酸塩の 2 年間がん原性試験 23
2.4.4.4.2　RasH2 Tg マウスを用いたセルメチニブ硫酸塩の 6 カ月間がん原性試験 23
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 24
2.4.4.6　その他の毒性試験 25
2.4.4.6.1　代謝物の試験 25
2.4.4.6.2　不純物の試験 25
2.4.4.6.3　光毒性試験 26
2.4.4.7　毒性試験の要約 26

2.4.5　総括及び結論 26
2.4.5.1　作用機序 26
2.4.5.2　安全性薬理試験の主な結果 27
2.4.5.3　薬物動態の主な結果 27
2.4.5.4　毒性試験の主な所見 28
2.4.6　結論 32
2.4.7　参考文献 32

表目次

表 1　薬物相互作用評価に用いたパラメータ 17
表 2　薬物トランスポーター試験における結果の概要 19
表 3　主要毒性試験の最低毒性量及び無毒性量における曝露量 28

図目次

図 1　セルメチニブから M10 及び M2 への推定代謝経路 16

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
AZ	AstraZeneca：アストラゼネカ
α_1-AGP	alpha-1 acid glycoprotein：α_1-酸性糖蛋白質
amu	Atomic mass unit：原子質量単位
ATP	Adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	Area under the plasma concentration time curve to infinity：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{(0\text{-}12)}$	Area under the plasma concentration time curve from 0 to 12 hours：投与後 0 時間から 12 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein
BID	Twice daily：1 日 2 回投与
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1：V-raf マウス肉腫ウイルスの発癌遺伝子ホモログ B1
C_{max}	Maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450：シトクロム P450
ERK	Extracellular signal-regulated kinase：細胞外シグナル制御キナーゼ
GAD	GTPase activating domain：GTP アーゼ活性化ドメイン
GAP	GTPase activating protein：GTP アーゼ活性化タンパク質
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
GTP	Guanosine-5'-triphosphate：グアノシン-5'-三リン酸
hERG	Human ether-a-go-go related gene：ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC-MS/MS	High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry：高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析
IC_{50}	Concentration which results in 50% inhibition：50%阻害濃度
ICH	Half maximal inhibitory concentration：医薬品規制調和国際会議
jnk	c-Jun N-terminal kinase：c-Jun N 末端キナーゼ
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog：カーステンラット肉腫ウイルスの発癌遺伝子ホモログ
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ
mTOR	Mammalian target of rapamycin：ERK5 や哺乳類ラパマイシン標的タンパク質
NF1	Neurofibromatosis type 1：神経線維腫症 1 型
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白質
p38	p38 Mitogen activated protein kinase：p38 マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
PN	Plexiform neurofibroma：叢状神経線維腫

略語及び専門用語	用語の説明
QTc	Corrected QT interval：補正 QT 間隔
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography：定量的全身オートラジオグラフィー
RAF	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase：プロトオンコジーンセリン/トレオニンプロテインキナーゼ
RAS	A GTPase-activating protein：GTP アーゼ活性化タンパク質
RIS	Relative induction score
$t_{1/2}$	Half life：半減期
TK	Toxicokinetics：トキシコキネティクス
t_{max}	Time to reach maximum concentration：最高血漿中濃度到達時間
UGT	Uridine glucoronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素

2.4.1　非臨床試験計画概略

セルメチニブ（旧称：AZD6244、ARRY-142886 及び AZ12252244）は強力かつ選択的な分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ 1 及び 2（MEK1 及び 2、又は MAP2K1 及び MAP2K2）の経口阻害薬であり、アデノシン三リン酸（ATP）と競合しない。セルメチニブは、手術不能かつ症候性の叢状神経線維腫（PN）を有する 3 歳以上の小児神経線維腫症 1 型（NF1）患者の治療を適応とする。

申請治療用量は 25 mg/m^2 の 1 日 2 回（BID）経口投与であり、投与期間は最長で数年という長期間に及ぶことが予想される。

MEK1/2 は、RAS により制御される RAF/MEK/ERK 経路の重要な構成要素であり（Caunt et al 2015）、ヒトがんにおいて高頻度で活性化されている。この経路は、受容体チロシンキナーゼ、G タンパク質共役型受容体及びサイトカイン受容体等の一連の受容体型によって活性化される。MEK1/2 は二重特異性キナーゼであり、細胞外シグナル制御キナーゼ（ERK）1/2 の活性化ループにおいて保存スレオニン残基及びチロシン残基をリン酸化することにより、ERK1/2 を活性化する。MEK1 及び MEK2 は高い（79%）アミノ酸相同性を示し、それらの基質である ERK1/2 に対するリン酸化能及び活性化能は同程度であると考えられる（Zheng et al 1993、Ohren et al 2004）。MEK1/2 の ERK1/2 に対する高い基質特異性と対照的に、ERK の基質として数百種類ものタンパク質が特定されている。これにより、RAF/MEK/ERK 経路がいかにして腫瘍細胞の増殖及び生存を含む多くの細胞プロセスに影響を及ぼすかが説明される（Caunt et al 2015）。したがって、MEK の阻害により、RAF/MEK/ERK 経路が活性化されている腫瘍細胞の増殖及び生存を阻害することができる。

NF1 は常染色体優性の遺伝性疾患であり、腫瘍抑制タンパク質ニューロフィブロミン 1 をコードする *NF1* 遺伝子（17q11.2）の生殖細胞系突然変異によって生じる。まれに 17q11 の微小欠失（わずか 5%）によっても生じる。NF1 患者では、中枢及び末梢神経系の腫瘍発生リスクが上昇する。PN は患者に認められる良性腫瘍として最も多く、患者の約 20%～50%に発生する（Korf 1999、Mautner et al 2008）。ニューロフィブロミン 1 は、GAP（GTP アーゼ活性化タンパク質）関連ドメイン（GAD）を含むが、GAD の一般的機能は GTP アーゼ活性亢進を介した RAS 不活性化である（Bollag et al 1991、Ballester et al 1990、Martin et al 1990、Xu et al 1990）。すべての神経線維腫は両アレルの *NF1* 変異を有する神経シュワン細胞を含む（Ryan et al 1999、Serra et al 2000）。神経線維腫から急速培養した神経線維肉腫及びシュワン細胞では、RAS-GTP 濃度の上昇が認められる（Basu et al 1992、Sherman et al 2000、Kim et al 1995）。ヒト神経線維腫及びマウスの神経線維腫モデルから採取した組織切片において、p-ERK は正常神経よりも神経線維腫で高濃度に検出される（Jessen et al 2013）。したがって、NF1 機能が喪失すると、GTP 結合型の活性化 RAS が選好され、その結果、良性腫瘍や悪性腫瘍等、様々なタイプの腫瘍の原因となり得る、あるいは、成長を維持し得る RAF/MEK/ERK 経路が活性化する。セルメチニブ等の MEK1/2 阻害薬は、RAF/MEK/ERK 経路の阻害薬として、NF1 機能喪失の結果として生じる RAF/MEK/ERK 経路の活性化に起因する腫瘍細胞の増殖と成長を阻害することが期待される。したがって、MEK1/2 の阻害は、RAF/MEK/ERK シグナル伝達が活性化されている PN 等の腫瘍に対する有望な治療戦略である。

セルメチニブは Array BioPharma 社によって創製され、その化学名は 5-[(4-bromo-2-chlorophenyl)amino]-4-fluoro-6-[(2-hydroxyethoxy)carbamoyl]-1-methyl-1H-benzimidazol-3-ium であり、硫酸塩として製剤化されている。

セルメチニブは、その薬理作用、安全性薬理、薬物動態及び毒性を評価するべくデザインされた *in vitro* 及び *in vivo* 試験からなる総合的パッケージにおいて評価されてきた。非臨床開発試験

では 2 つの形態のセルメチニブを使用した。初期の試験はセルメチニブの遊離塩基を使用して実施した。セルメチニブの遊離塩基は溶解性が低く、バイオアベイラビリティが低かったため、セルメチニブの硫酸塩を開発してその後の試験に使用した。

セルメチニブには、薬理活性を有する微量代謝物が少なくとも 2 種類存在する。これらはセルメチニブの N-脱メチル体（別名 AZ12442942；薬理活性は未変化体の約 3～5 倍）及びアミド体（別名 AZ12791138；薬理活性は未変化体の 50 分の 1 以下）であり、いくつかの試験で検討されている。[^{14}C]-セルメチニブ 75 mg を単回経口投与したとき、ヒト血漿中におけるセルメチニブの N-脱メチル体は血漿中総放射能の約 2.9%、アミド体は 1.6%未満であった。非臨床試験では、血漿検体中のセルメチニブの N-脱メチル体及び未変化体を常に定量した。ヒトプール血漿及び尿で最も多く存在するセルメチニブ代謝物は、O-グルクロン酸抱合体である M2（別名 AZ14216282；血漿中及び尿中の総放射能濃度のそれぞれ約 22%及び 10%）であった。セルメチニブの主要代謝物である M2 の MEK に対する阻害活性を生化学アッセイ及び細胞を用いたアッセイで評価した。両方のアッセイで、代謝物 M2 は 10 μmol/L の濃度まで不活性であることが示された。

一連の非臨床試験において、セルメチニブ（遊離塩基）の薬理学的作用を評価した（薬理試験の概要文 2.6.2 項及び薬理試験概要表 2.6.3 項を参照）。セルメチニブが MEK1 及び MEK2 の強力かつ選択的な ATP 非競合的阻害薬であることを確認するため、*in vitro* 酵素アッセイを用いた。腫瘍細胞株のパネルを用いて、セルメチニブと 2 種類の微量代謝物（N-脱メチル体及びアミド体）の RAS/MEK/ERK 経路に対する阻害強度を測定した。N-脱メチル体のみが顕著な活性（セルメチニブよりも 3～5 倍強力）を示したが、アミド体の活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下であった。

他の関連するシグナル伝達経路と比較して RAF/MEK/ERK 経路阻害に対する選択性を立証するために細胞株アッセイが用いられた。セルメチニブが最も強力な増殖阻害作用を示した腫瘍細胞株は、*RAS* 及び *BRAF* 遺伝子変異を有し、RAF/MEK/ERK シグナル伝達活性を有する細胞株で多く認められた。（Davies et al 2007、Dry et al 2010）。

ヒト腫瘍を皮下に異種移植し、セルメチニブを臨床的に意味のある血漿中濃度となる用量範囲で経口投与したとき、セルメチニブは ERK のリン酸化に対して時間及び曝露量に依存した抑制作用を示した（Davies et al 2007）。ヒトの *NF1* の遺伝子型及び表現型を再現する神経線維腫が発生するよう遺伝子改変したマウスの NF1 モデルでは、セルメチニブの経口投与によって、ERK のリン酸化が阻害され、神経線維腫の腫瘍量、増殖、数及び成長が抑制された。

In vitro 副次薬理試験及び安全性薬理試験のパネルを用いてセルメチニブを評価し、心血管系、呼吸器系、消化器系及び中枢神経系に影響を及ぼす可能性を検討した。主要な安全性薬理試験は、安全性薬理試験に関する ICH ガイドライン（ICH S7A、ICH S7B）に従い、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に関する規制を遵守して実施した（薬理試験の概要文 2.6.2 項及び薬理試験概要表 2.6.3 項を参照）。すべての安全性薬理試験でセルメチニブの遊離塩基を使用した。*In vivo* 試験の投与経路は、臨床投与経路である経口投与とした。セルメチニブの N-脱メチル体についても、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）アッセイ及び副次的薬理試験の標的パネルにおいて *in vitro* 評価を行った。

非臨床薬物動態試験は、薬理試験及び毒性試験と同じ動物種及び系統を用いて実施した。初期の試験ではセルメチニブ遊離塩基を用い、後の試験ではセルメチニブ硫酸塩を用いて薬物動態及び TK を評価した。セルメチニブの組織分布は、白色ラット及び有色ラットを用い、QWBA で検討した。セルメチニブの代謝は、ヒト肝ミクロソーム、ラット及びヒト肝細胞、ヒト CYP 及び

UGT 発現系を用いた *in vitro* 代謝、並びにマウス、ラット、サル及びヒトにおける *in vivo* 代謝により検討した。

セルメチニブが相互作用薬及び被相互作用薬となる可能性を *in vitro* で評価した。*In vitro* 薬物相互作用試験の結果は、薬物相互作用の検討に関するガイドライン（EMA 2012、FDA 2017 及び MHLW 2018）に記載の基準に従い評価した。（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項及び薬物動態試験概要表 2.6.5 項を参照）。

薬理学的に適切な動物種として、げっ歯類（ラット及びマウス）及び非げっ歯類（カニクイザル）を用いてセルメチニブの毒性を評価した。当初は、セルメチニブ遊離塩基を用いてラット及びサルにおける安全性評価を行った。両動物種で単回投与（単回投与又は 1 日に 2 回投与）及び 1 カ月間反復投与毒性試験を行い、*in vitro* 及び *in vivo* での遺伝毒性試験を実施した。セルメチニブ硫酸塩の開発後、毒性試験として、CD-1 マウス及びカニクイザルを用いた最長 9 カ月間の反復投与毒性試験、CD-1 マウスを用いた生殖発生毒性試験（受胎能、初期胚発生、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後の発生を評価）、マウスを用いた *in vivo* 遺伝毒性試験等を実施した。マウスではヒトにおける第一相主代謝物（N-脱メチル体）が生成されるが、ラット及びサルではこれらの代謝物の生成量が多くないことから、セルメチニブ硫酸塩を用いた上記試験で使用するげっ歯類としてマウスを選択した。がん原性試験の用量選択のため、セルメチニブ硫酸塩を用いて、CByB6F1 マウスを用いた最長 1 カ月間及びラットを用いた最長 3 カ月間の用量設定試験を実施した。CByB6F1/Tg rasH2 ヘミ接合体マウス（rasH2 Tg マウス）を用いた 6 カ月間がん原性試験及びラットを用いた 2 年間がん原性試験において、セルメチニブ硫酸塩のがん原性を評価した。N-脱メチル体及び変異原性を有する可能性があるいくつかの不純物について、*in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。

すべての重要な毒性試験は ICH ガイドラインに従って適切にデザインされ、GLP を遵守して実施された（毒性試験の概要文 2.6.6 項及び毒性試験概要表 2.6.7 項参照）。GLP 非適用の用量設定試験も、GLP 準拠した試験施設において実施した。

毒性試験パッケージは、ICH M3(R2)ガイドラインに準拠しており、申請適応症におけるセルメチニブ使用に対し適切と考えられる。成熟動物を用いた非臨床試験で確認された毒性プロファイルは小児患者に対しても適用可能と考えられることから、セルメチニブの幼若動物毒性試験は実施しなかった。[redacted]は、20[redacted] 年 [redacted] 月に EMA の [redacted]、20[redacted] 年 [redacted] 月に EMA、20[redacted] 年 [redacted] 月に FDA、20[redacted] 年 [redacted] 月に PMDA により了承されている。（毒性試験の概要文 2.6.6.9.12 項参照）。セルメチニブの非臨床試験で認められた所見は、すべて臨床においてモニタリング及び管理が可能であると考えられる。

マウスにおいてセルメチニブの胚、胎児への毒性及び催奇形性の可能性が示されていることを考慮し、第 2 種目の非げっ歯類を用いた胚・胎児発生毒性試験は実施しなかった。妊娠可能な女性には、有効な避妊法を使用するように指導している（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

セルメチニブの免疫毒性については、反復投与毒性試験で評価されたパラメータにより適切な評価が十分に可能であると判断されたため、個別の免疫毒性試験は実施していない。セルメチニブの臨床投与経路は経口のみであることから、局所刺激性試験は実施していない。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

NF1 患者に対する安全かつ有効な薬剤の必要性が認識されている。PN 等の腫瘍増殖によって顕著な病態を有する患者において特に必要とされている。PN 腫瘍は、ごく若年の段階から NF1 患者の生活に影響を及ぼす顕著な病態（疼痛、身体的及び機能的障害、並びに容貌の損失）をもたらす。さらに、NF1 腫瘍は、腫瘍の発現部位や悪性化によっては生命を脅かす病態に至る可能性がある。

NF1 の原因となる遺伝学的事象は、タンパク質ニューロフィブロミン 1 をコードする腫瘍抑制遺伝子 *NF1* の欠失である。ニューロフィブロミン 1 に含まれる GAP GAD の正常機能は、GTP アーゼ活性の亢進による RAS 不活性化の促進である。よって、NF1 は RAS 活性の調節不全疾患であると考えられ、RAF/MEK/ERK 経路が活性化する。以上より、MEK 阻害薬を使用してこの経路を強力かつ選択的に阻害することが NF1 患者の治療方法になり得る根拠が示されている。

セルメチニブは、経口投与可能な、ATP と競合しない、選択的な MEK1/2 阻害薬としてデザインされ、臨床試験を行うためにファーストインクラスの MEK 阻害薬である CI-1040 と比較して改善された物理学的特性を有している（Wallace et al 2005、Allen et al 2003、Yeh et al 2007）。セルメチニブの合成及びその MEK 阻害薬としての特性については、次の特許（U.S. Patent No. 7,425,637 B2；セルメチニブは化合物 29c）に記載されている。MEK1 及び MEK2 の配列及び構造は相同性が高い（Ohren et al 2004）。セルメチニブ及び関連する MEK 阻害薬の結合ポケットは、他のタンパク質チロシンキナーゼとの配列相同性が低い領域にある。このことは、このクラスの MEK 阻害薬がその他のタンパク質キナーゼよりも MEK1/2 に対して高い選択性を有することと一致する。

セルメチニブは MEK1 及び MEK2 の強力かつ選択的な ATP 非競合的阻害薬である。このことは *in vitro* 酵素アッセイによって示されている。セルメチニブは放射分析アッセイにおいて、変異的に活性化されたヒト組換え MEK1 を阻害し、その IC_{50} 値の平均は 15.3 nmol/L であった。また、その阻害作用は ATP と競合しないことが示された。酵素アッセイで認められた作用は、腫瘍細胞株のパネルにおける RAF/MEK/ERK シグナル伝達に対するセルメチニブの阻害作用（検討した多くの細胞株で IC_{50} 値は 10 nmol/L 未満）と同程度の強度であった。別の酵素アッセイにおいて、完全長の活性化野生型 MEK1 又は MEK2 を用いて不活性型 ERK2 をリン酸化したところ、セルメチニブは MEK の両分子種に対して同程度の作用を示し、その IC_{50} 値は 200～400 nmol/L の範囲であった。MEK に対する活性とは対照的に、セルメチニブの他のキナーゼパネルに対する活性は認められないか、ごく軽微であった。また、細胞アッセイにおいて、セルメチニブは 10 µmol/L 以下の濃度で ERK5、mTOR、jnk 又は p38 キナーゼを介するその他のシグナル伝達のいずれも阻害しなかった（Yeh et al 2007、Lyssikatos 2006）。腫瘍細胞株のパネルで検討したとき、セルメチニブに感受性ありと分類された細胞株の大部分は、*BRAF* 変異又は *RAS* 変異を有しているか、そうでない場合は RAF/MEK/ERK シグナル伝達系が活性化されていた（Davies et al 2007、Dry et al 2010）。

セルメチニブの代謝物である N-脱メチル体及びアミド体の作用強度について、変異により活性化されたヒト組換え MEK1 の放射分析アッセイで検討したところ、IC_{50} 値はそれぞれ 7 nmol/L 及び 272 nmol/L であった。これらの代謝物については、腫瘍細胞株のパネルを用いた細胞アッセイにおいても検討した。N-脱メチル体は、腫瘍細胞株における ERK リン酸化に対して、セルメチニブの約 3～5 倍（範囲：2.93～4.54 倍）強力な阻害作用を示し、アミド体の同アッセイにおける作用強度はセルメチニブの 50 分の 1 以下であった。以上より、N-脱メチル体は、達成された血

漿中曝露量に応じて、観察された RAF/MEK/ERK シグナル伝達の阻害及び非臨床薬理試験で認められた抗腫瘍効果に寄与する可能性があるが、アミド体はこのような作用を示さないと考えられる。セルメチニブ主要代謝物の O-グルクロン酸抱合体である M2 について、*in vitro* の生化学的酵素アッセイで MEK1 に対する阻害活性を評価し、培養腫瘍細胞において MEK1/2 に対する阻害活性を評価したところ、両分析で代謝物 M2 は 10 μmol/L の濃度まで不活性であった。

ヒト腫瘍異種移植片を用いて用量依存的な薬力学的作用及び抗腫瘍効果を確立し、マウスの NF1 モデルにおける抗腫瘍効果を立証するため、非臨床モデルを用いてセルメチニブの *in vivo* 評価を行った。Calu-6 *KRAS* 変異非小細胞肺癌（NSCLC）のヒト腫瘍移植片を皮下で増殖させたマウスを使用して用量反応試験を実施したところ、腫瘍増殖の統計的に有意な抑制が認められた最小用量は 0.75 mg/kg BID であると判断された。同モデルにおいて、セルメチニブを一定範囲の用量（臨床的に意味のある血漿中薬物濃度となる用量を含む）で単回経口投与したとき、腫瘍における ERK リン酸化に対する時間及び用量依存的な阻害作用が認められた。臨床的に意味のある曝露量が得られる用量では、ERK リン酸化に対する最大阻害率は 40%～80%であった。

ヒト神経線維腫の遺伝子型と表現型の両者を再現する遺伝子改変マウスモデルが入手可能になったことから、PN 治療の可能性を評価できるようになった（Wu et al 2008、Wu et al 2012、Jessen et al 2013、Hall et al 2006、Hirbe et al 2016）。最近の研究において、ヒト叢状神経線維腫における平均遺伝子変化数は 1 であり（Pemov et al 2017）、NF1 自体の欠失であることが確認された。したがって、上記のシュワン細胞の NF1 が欠失した遺伝子改変マウスモデルでは、ヒト NF1 の遺伝子型が再現される。これらのモデルは普遍的で、有効性と無効性の両者の予測において有用性が認められている。3 種類の薬剤が非臨床試験で評価され、治療上の有用性が認められ、臨床試験に進んだ。これらの薬剤はイマチニブ（グリベック®）、セルメチニブ及び mTOR 阻害薬エベロリムス（アフィニトール®）である。イマチニブは NF1 関連 PN で使用され、マウスモデルと患者の双方で PN における部分的な腫瘍縮小を示した最初の薬剤であった（Robertson et al 2012、Yang et al 2008）。本モデルは、患者における生物学的活性を予測する非臨床モデルに加え、ヒトでも腫瘍縮小効果を示さない薬剤を予測し、特定することもできる。mTOR 阻害薬であるエベロリムスは、この非臨床モデルで腫瘍縮小効果を示さなかったと報告されている（Wu et al 2012）。その後、他の mTOR 阻害薬（シロリムス）を用いたアメリカ国防総省コンソーシアムの試験で、腫瘍サイズに意味のある縮小は認められず、無増悪期間の延長がわずかであったことから、上記知見が検証された（Weiss et al 2014、Weiss et al 2015）。

これらのモデルを用いて、神経線維腫の形成、サイズ及び増殖の阻害におけるセルメチニブの効力について非臨床評価を行った（Dombi et al 2016）。シュワン細胞前駆体における *NFI* の欠失によって神経線維腫が形成される、異なるマウスモデルを使用して 2 通りの試験を行ったところ、セルメチニブの経口投与によって腫瘍における ERK リン酸化が阻害され、腫瘍の数が減少し、サイズが縮小することが示された。重要な知見として、投与 2 時間後の腫瘍における ERK リン酸化阻害の程度を定量化したところ、ERK のリン酸化が 40%～60%抑制されていることが判明したことから、マウスモデルにおける神経線維腫の形成及び増殖の阻害には ERK リン酸化の完全な阻害は不要であることが示唆された。なお、マウスモデルにセルメチニブの有効用量を投与したときの曝露量は、小児患者に治療用量を投与したときの曝露量よりも大きい。マウスモデルと小児患者における有効性は質的に同様であるものの、有効性につながる曝露量については、ヒト神経線維腫の方が MEK 阻害に対する感度が高いと判断される（薬理試験の概要文 2.6.2 項を参照）。

2.4.2.2　副次的薬理試験

種々の分子標的を含む *in vitro* 放射性リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイのパネルを用いて、セルメチニブ及び N-脱メチル体の濃度 10 μmol/L で試験を行った。ヒト治療用量でのセルメチニブ又は N-脱メチル体の血漿中曝露量で薬理学的に問題となると考えられる標的は特定されなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

セルメチニブ（遊離塩基）について一連の GLP 準拠安全性薬理試験を実施し、ラットで中枢神経系、呼吸器系及び消化器系に影響を及ぼす可能性、*in vitro* hERG 及びミニブタで心血管系に影響を及ぼす可能性を検討した。更に、N-脱メチル体についても *in vitro* の非 GLP 試験において hERG 活性を検討した。

セルメチニブ及び N-脱メチル体は、それぞれ 10 μmol/L 及び 100 μmol/L 以下の濃度で hERG 電流を阻害しなかった。これらの最高被験濃度はいずれも、セルメチニブを推奨臨床用量である 25 mg/m^2 BID で投与したときのセルメチニブの非結合形 C_{max}（11.69 ng/mL ≡ 0.026 μmol/L）及び N-脱メチル体の非結合形 C_{max}（1.13 ng/mL ≡ 0.003 μmol/L）の 390 倍以上である。

無麻酔非拘束のミニブタにセルメチニブ（遊離塩基）を最大 30 mg/kg BID（臨床での 25 mg/m^2 BID 投与時における非結合形 C_{max} の約 2 倍）の用量で経口投与したとき、動脈圧（平均値、収縮期血圧、拡張期血圧）、心拍数、心電図パラメータ（補正 QT 間隔［QTc］を含む）に影響は認められなかった。カニクイザルの毒性試験において、心電図に投与に関連した明らかな影響は認められなかった。

ラットにセルメチニブ（遊離塩基）を 100 mg/kg 以下の用量で単回経口投与したとき、投与後 24 時間にわたって体温、並びに神経学的及び行動学的指標に有害な影響は認められなかった。ラットにセルメチニブを単回投与したとき、30 及び 100 mg/kg で胃に刺激性変化が認められたが、ラット 29 日間反復投与毒性試験では、これらの用量で胃の刺激性変化を示す病理組織学的所見は認められなかった。マウスでは、非腺胃粘膜のびらん／潰瘍化が認められた（2.4.4.2.1 項を参照）。麻酔ラットにセルメチニブ（遊離塩基）を 100 mg/kg 以下の用量で単回経口投与したところ、1 回換気量、呼吸数、動肺コンプライアンスや分時換気量に影響はみられなかった。なお、100 mg/kg 投与群に限り、投与 2 時間後に気道抵抗の軽微な上昇（ベースラインよりも 18% 高値）が認められた。ラット 29 日間反復投与毒性試験では、この用量で呼吸器の異常は認められなかった。ラットの安全性薬理試験ではセルメチニブの血漿中濃度（C_{max}）を測定しなかったが、29 日間反復投与毒性試験の 1 日目における雄での血漿中濃度とほぼ同程度であると考えられる。よって、ラットにセルメチニブ 100 mg/kg を投与したときの非結合形 C_{max}（72 ng/mL）は、臨床で 25 mg/m^2 BID を投与したときの非結合形 C_{max} の約 6 倍高値であった。

2.4.3　薬物動態試験

非臨床薬物動態試験は、薬理試験及び毒性試験と同じ動物種及び系統を用いて実施した。セルメチニブには少なくとも 2 種類の微量の活性代謝物、N-脱メチル体（薬理活性はセルメチニブの約 3～5 倍）及びアミド体（薬理活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下）の存在が非臨床試験で確認され、これら活性代謝物についても複数の非臨床薬物動態試験で検討した。セルメチニブの組織分布は、白色ラット及び有色ラットを用い、QWBA で検討した。ヒト組織を用いた *in vitro* 試験、並びにヒト代謝酵素及びトランスポーター発現系を用いた *in vitro* 試験を実施した。初期の試験ではセルメチニブ遊離塩基を用い、後の試験ではセルメチニブ硫酸塩を用いて薬物動態及び TK を評価した。経口投与は適切な溶媒を用いて強制経口投与し、必要に応じ GLP 準拠の試験を

実施した。薬物動態試験の主な所見を以下に示す。薬物動態試験の一覧は薬物動態試験概要表 2.6.5.1 項に示した。

2.4.3.1　分析法

薬物動態試験及び主要毒性試験では、セルメチニブと 2 種類の活性代謝物 N-脱メチル体及びアミド体（それぞれ AZ12442942 及び AZ12791138）を HPLC-MS/MS 法により定量した。TK ではバリデーション済みの分析法を用いて定量した。マウス、ラット及びサル血漿中のセルメチニブ、N-脱メチル体及びアミド体は、試料保存期間及び分析中に安定であった。すべての分析法は試験実施時のバリデーション及び定量の基準に適合した。

2.4.3.2　吸収

初期の非臨床試験ではセルメチニブ遊離塩基、後の試験ではセルメチニブ硫酸塩を用いた。ラット及びサルにセルメチニブ遊離塩基を低用量で投与時の吸収は中程度～良好であり、吸収の飽和がマウス、ラット及びサルで認められた。一方、マウス及びサルにセルメチニブ硫酸塩投与時の曝露量は概ね用量比例的に増加し、より高い曝露量が得られた。硫酸塩投与の方が適切と考えられたことから、その後の非臨床試験及び臨床試験では硫酸塩を用いた。

セルメチニブ遊離塩基を用いたラット及びサルにおける 1 カ月間反復投与毒性試験では、いずれの用量でも反復投与後に累積は認められなかった。ラット及びサルにおける用量増加に伴う曝露量増加は用量比より小さかった。これはセルメチニブ遊離塩基の溶解度が低いため、高用量で吸収が制限されることを反映したものと考えられる。ラットでは性差が認められ、雌の方が雄に比べて曝露量が高い傾向にあった。

雄マウスにセルメチニブ遊離塩基（50、160 又は 500 mg/kg）を単回経口投与後のセルメチニブ及び N-脱メチル体の血漿中曝露量は、50～160 mg/kg では用量比を下回る増加（約 1.5～2 倍）を示し、160～500 mg/kg では軽微な増加のみが認められた。N-脱メチル体の C_{max} はセルメチニブの C_{max} より概して遅れて認められた。N-脱メチル体の C_{max} 及び AUC は、同じ用量のセルメチニブの C_{max} 及び AUC のそれぞれ 8%～18%及び 8%～14%であった。

マウス 1 カ月間反復投与毒性試験でセルメチニブ硫酸塩を反復投与後にセルメチニブの累積は認められず、$AUC_{(0\text{-}12)}$は概ね用量比例的に増加した。N-脱メチル体の曝露量はセルメチニブより低く、反復投与後に低下した。マウス 26 週間反復投与毒性試験も同様で、N-脱メチル体の曝露量はセルメチニブより低く、雌雄共に Day 1 以降に低下し、セルメチニブに対する N-脱メチル体の相対比は低下した。マウスにおける N-脱メチル体の $t_{1/2}$ は 2.9～7.1 時間でセルメチニブと同程度であり、N-脱メチル体の累積は認められなかった。セルメチニブ硫酸塩を投与したマウス 26 週間投与試験は、同じく硫酸塩を投与した 1 カ月間反復投与毒性試験と同様の TK 結果を示した。マウスにおける全試験でセルメチニブの平均曝露量は概ね雌の方が雄の 2 倍高く、累積は認められなかった。なお、げっ歯類における CYP を介した薬物代謝には性差があり、代謝酵素の発現量に性差があることが報告されている（Skett 1988 及び Waxman and Holloway 2009）。

サル 1 カ月間及び 26 週間反復投与毒性試験で曝露量に同様のパターンが認められた。サルにおける曝露量は、セルメチニブ硫酸塩投与時の方が遊離塩基投与時より高く、$AUC_{(0\text{-}12)}$は硫酸塩 7.5 mg/kg 投与時及び遊離塩基 30 mg/kg 投与時でそれぞれ 10 μg.h/mL 及び 4 μg.h/mL であった。セルメチニブ 5 mg/kg 投与時の経口バイオアベイラビリティは遊離塩基及び硫酸塩投与時でそれぞれ 29%及び 56%であった。サル 26 週間投与試験では、セルメチニブの曝露量は雌雄で同程度であった。$AUC_{(0\text{-}12)}$は Week 1 から Week 26 にかけて 1.5～1.9 倍とある程度の累積が認められた。終末相の $t_{1/2}$ 平均値は約 6 時間であり、個体値の範囲は 2.95～11 時間であった。サルにおけ

る N-脱メチル体の曝露量はわずかであり、サル 1 カ月間反復投与毒性試験では N-脱メチル体の曝露量はセルメチニブの約 0.05%～0.2%、26 週間反復投与毒性試験では大部分の血漿試料で N-脱メチル体は検出されなかった。この所見は、サルに N-脱メチル体を経口投与した試験で N-脱メチル体の血漿中濃度は定量下限未満であり、同様にラットに N-脱メチル体を経口投与時のバイオアベイラビリティは 4.5%と低かったことから裏付けられている。

ヒトに[^{14}C]-セルメチニブを投与したヒトマスバランス試験において、セルメチニブのアミド体は血漿中放射能の約 2%であった。アミド体は弱い活性代謝物で、薬理活性は最大でセルメチニブの 50 分の 1 であった。また、反復投与毒性試験で試験完了後にアミド体の血漿中濃度を測定した。マウス及びサル 26 週間反復投与毒性試験では、両動物種共に初回投与後のアミド体の血漿中濃度はセルメチニブの約 2%～3%であった。この比率は反復投与により増加し、マウスの Week 16/26 時点に比べ、サルの Week 26 時点の方が顕著であった。ラットでも低い血漿中濃度でアミド体が認められた（セルメチニブの約 2%～3%）。マウス、ラット及びサルでは、Day 1 より後の時点でアミド体濃度が上昇する傾向が認められ、アミド体の曝露量は反復投与後に増加する傾向が認められた。

2.4.3.3　分布

マウス、ラット、イヌ、ミニブタ、サル及びヒトにおけるセルメチニブ及び N-脱メチル体の血漿蛋白結合率を測定した。セルメチニブ及び N-脱メチル体の血漿蛋白結合率はいずれも濃度に依存せず、またいずれの種も同程度の血漿蛋白結合率を示した。セルメチニブ及び N-脱メチル体の血漿蛋白結合率はミニブタで最も低かった（それぞれ 93.7%及び 95.4%）。セルメチニブの血漿蛋白結合率はマウス（98.9%）で最も高く、次いでヒト（98.4%）で高かった。セルメチニブのヒト血清アルブミン及び α_1-AGP との結合率はそれぞれ 96.1%及び 27.2%であった（α_1-AGP への結合率は濃度依存的であった：範囲 13.1%～34.5%）。

ラットを用いた QWBA で放射能の組織分布を評価した。放射能は広範な組織に分布し、組織中放射能濃度は概ね血液中よりも低く、中枢神経系への移行はわずかであった。有色及び白色ラットのいずれも大部分の組織中放射能濃度は同じ測定時点の血液中濃度より低かった。肺、肝臓、腎臓及び副腎における放射能濃度が比較的高かったが、有色組織（有色皮膚及びブドウ膜）でメラニン特異的な放射能の結合は観察されなかった。ブドウ膜における放射能濃度は経時的に低下し、投与 72 時間後でバックグラウンド値と判別不能となった。

マウスでも QWBA で放射能の組織分布を評価した。ヒト Calu-6 肺癌移植した雌ヌードマウスに[^{14}C]-セルメチニブを単回経口投与し、放射能の組織分布を評価した。放射能は全ての組織に低濃度で分布し、ラットと同様の分布パターンであった。腫瘍内部の放射能濃度は外側よりも低かった。腫瘍における放射能濃度は投与 12 時間後まで血液中濃度より低かったが、腫瘍の放射能濃度は他の大部分の組織より長期間にわたり測定可能であった。

2.4.3.4　代謝

セルメチニブには 2 種類の微量の活性代謝物 N-脱メチル体（M8、薬理活性はセルメチニブの約 3～5 倍）及びアミド体（M14、薬理活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下）が確認されている。[^{14}C]-セルメチニブ 75 mg を単回経口投与したヒトマスバランス試験において、ヒト血漿中の M8 及び M14 はそれぞれ血漿中総放射能の約 2.9%及び 1.6%未満であった。

2.4.3.4.1　代謝物

セルメチニブの代謝は、ヒト肝ミクロソーム、ラット及びヒト肝細胞、ヒト CYP 及び UGT 発現系を用いた *in vitro* 代謝、並びにマウス、ラット、サル及びヒトにおける *in vivo* 代謝により検討した。セルメチニブの代謝の解明に際し、主なグルクロン酸抱合体 M2 及びその前期体 M10 の代謝物構造の同定が重要であるが、M10 は開発過程の遅い段階で同定された代謝物である。セルメチニブからの M10（イミダゾインダゾール体）の生成には稀な分子内環化が関与している。この代謝物構造を特定する上で複雑となったのは、開発初期に M10 をイミダゾインダゾール体とみかけの質量が同じフッ素脱離による水酸化体と誤って割り当てたためで、フッ素脱離による水酸化体は一部の動物種で生成する可能性はあるがヒト代謝物中には認められなかった。

ヒト血漿中の主なセルメチニブ由来成分はセルメチニブ未変化体であり、血漿中放射能の 40%を占めた（プール血漿 0～72 時間の AUC の全被験者平均値）。血漿中の主代謝物 M2 は、エチレングリコール脱離及びグルクロン酸抱合を受け、さらに 2-amu 減少した代謝物であり、血漿中放射能の 22%を占めた（全被験者平均）。化学構造解析の結果、M2 は分子内環化により生成したイミダゾインダゾール体 M10 のグルクロン酸抱合体であった（図 1）。ラット肝細胞を用いた検討からグルクロン酸抱合体を単離し、ヒト血漿中の M2 とクロマトグラフィー及び質量分析の比較により M2 はイミダゾインダゾール体のグルクロン酸抱合体と確認した。さらに M2 の前駆体であるイミダゾインダゾール体 M10（AZ14166690）の標準品を合成した。M10 はアミノエタノール側鎖の脱落したセルメチニブの CYP による代謝での N-N 結合を形成する分子内環化（Takahashi et al 2015）を通して生成すると考えられる。

ヒト血漿中でさらに 6 種類の代謝物が同定され、それぞれ血漿中放射能量の 2%～7%（全被験者平均）であった。6 種類の血漿中代謝物は、N-脱メチル化、エチレングリコールの脱離及びグルクロン酸抱合を受け、さらに N-メチルベンゾイミダゾール部分の酸化又は分子内環化した代謝物（M1、3.5%）、N-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（M3、2.5%）、未変化体の直接グルクロン酸抱合体（M4、7.1%）、N-脱メチル体（M8、2.9%）、N-脱メチル体の第一級アルコール部分が酸化されたカルボン酸体（M11、3.6%）及びアミド部分の加水分解より生成したカルボン酸体（M15、2.2%）であった。他にも多くの微量代謝物（血漿中放射能の 2%未満）が同定され、この中にはエチレングリコールの脱離により生じた第一級アミド体（M14）も含まれる。尿中代謝物で投与量の 3%超の代謝物には、2 種類のセルメチニブへの直接グルクロン酸抱合体（それぞれ投与量の 6.0%及び 3.8%）及び N-脱メチル体のグルクロン酸抱合体（M3、3.4%）があった。尿中のセルメチニブ未変化体は全ての患者で投与量の 1%以下と少なかった。糞中ではセルメチニブ未変化体が主な成分で、投与量の 6%～34%であった。

マウスにおける代謝物組成はヒトと同様で、投与後 4 時間の血漿中で未変化体が主な成分であり（雄 62%、雌 82%）、血漿中で検出された計 32 種類の代謝物の中で N-脱メチル体（M8）が多く（雄 20.3%、雌 9.1%）、尿糞中の N-脱メチル体はいずれの採取期間でも 3%未満であった。ラットでは、[^{14}C]-セルメチニブ投与後の血漿中放射能の主な成分は未変化体で（投与後 36 時間で血漿中総放射能の 63%）、代謝物ではセルメチニブのヒドロキシエチル側鎖の直接酸化により生成した 2 種類のカルボン酸誘導体が主な成分であり（投与後 36 時間で血漿中総放射能の 27%及び 10%）、ヒトの代謝パターンと異なることが示唆された。ラット胆汁中放射能（0～48 時間）の主な成分はセルメチニブのグルクロン酸抱合体であった（投与量の約 18%）。サルにおける代謝物組成もヒトと同様であり、主代謝物は 2 種類のセルメチニブのグルクロン酸抱合体及び N-脱メチル体であった。

In vitro 試験から、セルメチニブは側鎖の酸化、N-脱メチル化、側鎖の脱離によるアミド体生成及びカルボン酸体生成などの第一相代謝を受けることが示された。また、数種類のグルクロン酸

抱合体が検出され、直接的及び間接的な第二相抱合反応を受けることが示された。初期の *in vitro* 及び *in vivo* 試験では M2 及び M10 の構造を誤り、M2 をアミド体がフッ素の脱離と水酸基の付加を受けた代謝物のグルクロン酸抱合体と報告していたが、M2 とみかけの質量が同じ代謝物が検出された。その後に実施したラット及びヒト肝細胞を用いた試験、セルメチニブ経口投与後のラット及びマウス血漿を用いた試験でフッ素脱離が実際に起こるかどうかを検討した。代謝の種差を検討した *in vitro* 試験で、Peak B は質量に基づきアミド体がフッ素の脱離と水酸基の付加を受けた代謝物のグルクロン酸抱合体と報告された。その後に実施のラット及びヒト肝細胞を用いた試験で、精密な質量分析によりこの代謝物は 2-amu 少ない N-脱メチルアミド体のグルクロン酸抱合体（イミダゾインダゾール構造を有する）に相当し、ヒト血漿中には認められなかった。ラット血漿にはアミド体がフッ素脱離及び水酸基付加を受けた代謝物（P2）と 2-amu 少ないアミド体（M10）が認められた。これらの結果から、少なくともラットではフッ素脱離及び水酸基付加、並びに分子内環化に伴う 2-amu 減少の両方が起こり得ることが示唆された。サルにおける試験では、フッ素脱離及び水酸基付加を受けた代謝物とイミダゾインダゾール体を区別していなかった。

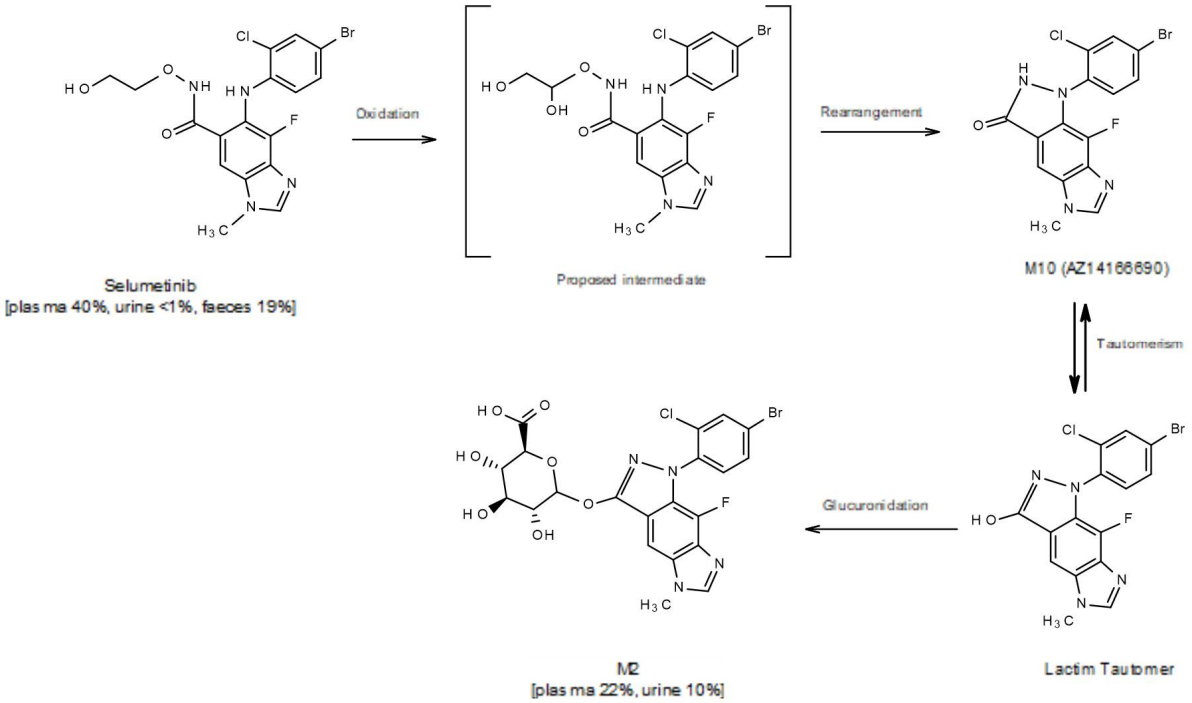
2.4.3.4.2　代謝酵素

セルメチニブは主に CYP3A4 により代謝され、CYP2C19 の関与も示唆されている。CYP1A2、2C9、2E1 及び 3A5 による代謝も認められたが寄与は小さかった。活性代謝物 N-脱メチル体 M8 の生成には主に CYP2C19 が関与し、CYP1A2、2A6 及び 2C9 の関与も認められた。M8 はセルメチニブと同様の経路で代謝される。

セルメチニブの直接グルクロン酸抱合に関与する UGT 分子種について検討するため、9 種類のヒト UGT 発現系を用い、[^{14}C]-セルメチニブの *in vitro* 代謝試験を実施した。UGT1A1 及び 1A3 とのインキュベーションで未変化体に対するグルクロン酸抱合体が 1 種類認められ、生成量はそれぞれクロマトグラム上の放射能の約 51%及び約 23%であった。他の UGT 分子種では対照試料中に存在しない代謝物ピークは検出されなかった。

ヒトに[^{14}C]-セルメチニブを投与したヒトマスバランス試験において、プール血漿中における主代謝物はグルクロン酸抱合体 M2（血漿中総放射能の約 22%）であった。ヒト UGT 発現系と合成した前駆体 M10 をインキュベーションした試験から、M10 から M2 の生成には UGT1A1、1A9、2B7、1A3 及び 2B15 が関与すると考えられた。

図 1　　セルメチニブから M10 及び M2 への推定代謝経路



Square brackets values indicate mean percentage of radiolabel dosed.

N-脱メチル体の CYP 阻害作用を *in vitro* で評価したが、薬物相互作用の検討に関するガイドライン（EMA 2012、FDA 2017 及び MHLW 2018）では、ヒトで AUC が未変化体の 25%未満の代謝物に関する薬物相互作用のリスク評価は不要である。ヒト血漿中の主代謝物は O-グルクロン酸抱合体 M2（血漿中総放射能の 22%）であった。また O-（エーテル型）及び N-グルクロン酸抱合体は蛋白と可逆的な反応を示す可能性は低く、薬理学的及び毒性学的な影響のトリガーとなる可能性は低い（FDA 2017、Luffer-Atlas et al 2017）。

2.4.3.5　　排泄

ラット（無処置及び胆管カニューレ処置）、サル及びマウスでマスバランス試験を実施した。全ての動物種で主排泄経路は糞中排泄であり、尿中排泄は少なかった。

ラットに[^{14}C]-セルメチニブを経口投与後の放射能総回収率は約 106%であった。主排泄経路は糞中であり、糞中排泄率は雄で 92%、雌で 102%であった。。尿中排泄率は相対的に低く、雄で 9.3%、雌で 4.9%であった。放射能の排泄は速やかで、投与後 48 時間以内の放射能回収率は雄で約 98%、雌で 104%であった。同様にマウスに経口投与後の糞中排泄率は雄で 65%、雌で 54%、尿中排泄率は雄で 5%、雌で 11%であった。サルに経口投与後の主排泄経路も糞中であり、糞中排泄率は 67%、尿中排泄率は 23%であった（試験は雄のみ）。

静脈内投与後の糞中排泄率も高く、胆管カニューレを施したラットを用いた検討で胆汁中排泄が重要な排泄経路であることを確認した。なお、呼気中に放射能の排泄は検出されず、放射能標識位置は代謝的に安定な部位であると考えられた。

2.4.3.6　　薬物相互作用

セルメチニブが相互作用薬及び被相互作用薬となる可能性を *in vitro* で評価した。*In vitro* 薬物相互作用試験の結果解釈に用いた臨床における定常状態の C_{max}（0.869 μg/mL = 1.9 μM）は、日本人小児 NF1 患者における D1346C00013 試験のセルメチニブ推奨用量 25 mg/m^2 BID で得られた値である。なお、体表面積 1.90 m^2 以上の患者の用量は一律 50 mg BID（用量上限）である（臨床概要 2.7.2 項を参照）。この C_{max} はセルメチニブの血漿蛋白結合率 98.4%評価時の検討濃度範囲内（0.1～30 μg/mL）にあり、血漿蛋白への非結合率 1.6%より定常状態の非結合形 C_{max} 0.030 μM を算出した。

In vitro 薬物相互作用試験の結果は、薬物相互作用の検討に関するガイドライン（EMA 2012、FDA 2017 及び MHLW 2018）に記載の基準に従い評価した。セルメチニブ 50 mg の溶解度及びバイオアベイラビリティを完全と仮定し、[I_{gut}]、[$I_{in\ max}$]、[$I_{in\ free}$]、非結合形 C_{max} の 50 倍値及び [$I_{in\ free}$]の 25 倍値を算出した。算出したパラメータを表 1 に要約する。

表 1　　薬物相互作用評価に用いたパラメータ

Dose (mg)	Plasma C_{max} (μg/ml)	[I_{max}] Plasma C_{max} (μM)	Fraction unbound (%)	[I_{maxu}] Unbound C_{max} (μM)	[$I_{in\ max}$] (μM)	[$I_{in\ free}$] (μM)	50 x unbound C_{max} (μM)	25 x [$I_{in\ free}$] (μM)	[I_{gut}] (μM)	0.1 x [I_{gut}] (μM)
50	0.869	1.9	1.6	0.030	8.88	0.142	1.5	3.55	437	43.7

[I_{max}]　Maximum plasma concentration C_{max} at 50 mg dose of selumetinib
[I_{maxu}]　Maximum unbound plasma concentration at 50 mg dose of selumetinib
[I_{gut}]　Maximum intestinal concentration when 50 mg dose is in 250 mL intestinal fluid
[$I_{in\ max}$]　Maximum total liver inlet concentration
[$I_{in\ free}$]　Maximum unbound liver inlet concentration

2.4.3.6.1　　CYP を介した薬物相互作用

肝細胞、ヒト肝ミクロソーム及び CYP 発現系を用いた *in vitro* 代謝試験から、セルメチニブの消失は主に CYP3A4 及び 2C19 による代謝に依存し、強い CYP3A 及び 2C19 の阻害薬又は誘導薬の併用によりセルメチニブの消失は影響を受ける可能性が示唆された。

セルメチニブの CYP に対する直接的及び時間依存的阻害作用を *in vitro* で評価した。セルメチニブ（最高濃度 70 μM）は CYP1A2、2A6、2C8、2C19、2E1 及び 3A4/5（基質ニフェジピン及びミダゾラム）にほとんど又は全く直接阻害作用を示さず、IC_{50} 値は算出不能であった（IC_{50} 値は 70 μM 超）。CYP2B6、2C9 及び 2D6 には弱い阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 53.1 μM、52.1 μM 及び 45.3 μM であった。薬物相互作用ガイドライン（EMA 2012、FDA 2017 及び MHLW 2018）に記載の静的薬物速度論モデルを用いて評価した結果、セルメチニブの CYP に対する直接的阻害により臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。時間依存的阻害作用を評価した試験では、セルメチニブは濃度 50 μM で CYP1A2、2B6 及び 2C19 に弱い時間依存的阻害作用を示した（それぞれ 31%、26%及び 47%阻害）。これら CYP 分子種の時間依存的阻害に関するパラメータ K_{inact} 及び K_I を算出し、薬物相互作用ガイドライン（EMA 2012、FDA 2017 及び MHLW 2018）に記載の静的薬物速度論モデルを用いて評価した結果、セルメチニブの CYP に対する時間依存的阻害により臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

セルメチニブは *in vitro* で CYP1A、3A 及び 2C9 に弱い誘導作用を示した。セルメチニブ最高濃度 30 μM の試験で、CYP1A、3A 及び 2C9 に対する最大誘導作用は各 CYP の典型誘導薬のそれぞれ約 40%、約 30%及び 10%未満であった。さらに、ヒト初代培養肝細胞を用い CYP1A2、2B6 及び 3A4 の mRNA 発現量の変化並びに酵素活性を測定した。セルメチニブ最高濃度 100 μM の試験で、mRNA 発現量は肝細胞 3 ロット中 2 ロットで CYP3A4 のみ増加し、酵素活性は肝細胞 3 ロット中 1 ロットの最高濃度で CYP3A4 のみ誘導され、酵素活性誘導の最大値は陽性対照の 16%であった。またヒト肝細胞を用い、消化管における CYP3A4 誘導の可能性を評価した。RIS 相関モデルを用いた手法で、セルメチニブによるミダゾラム AUC の減少は 10%～11%のみと予測され、臨床的に影響する可能性は低いと考えられた。

2.4.3.6.2　　UGT を介した薬物相互作用

セルメチニブが UGT 分子種（UGT1A1、1A3、1A4、1A6、1A9 及び 2B7）を直接阻害することで薬物相互作用を引き起こす可能性を *in vitro* で評価した。いくつかの UGT 分子種に対して阻害作用が認められたが、臨床用量におけるセルメチニブの曝露量では臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

2.4.3.6.3　　トランスポーターを介した薬物相互作用

MDR1（P-gp）及び BCRP 発現 MDCKII 細胞を用いた試験、OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 発現 HEK-293 細胞を用いた試験より、セルメチニブは MDR1 及び BCRP の基質であるが、OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質でないことが示された。MDR1 を発現させた昆虫の *Sf9* 細胞から単離した膜小胞とベラパミル（40 μM）をインキュベーションし、セルメチニブの存在下（0～100 μM）及び非存在下で ATPase 活性を測定した。ATPase 活性の増加はセルメチニブの検討最高濃度でのみ認められ、セルメチニブの MDR1 に対する基質親和性は高くないことが示唆された。

In vitro 試験においてセルメチニブは BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1 及び MATE2-K を阻害することが示唆されたが、MDR1 及び OCT1 に対する阻害作用は認められなかった。なお OAT3 阻害に関し、臨床用量 25 mg/m^2 における曝露量で、EMA ガイドラインの基準では臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性を否定できなかったが、FDA 及び MHLW ガイドラインの基準では薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

薬物トランスポーター試験における結果の概要を表 2 に示す。

表 2　　薬物トランスポーター試験における結果の概要

Transporter	Substrate	Inhibitor
MDR1 (P-gp)	Yes: Data from MDCKII-MDR1 cells and *Sf9* membranes	No: Data from MDCKII cells
BCRP	Yes: Data from MDCKII-BCRP cells and *Sf9* membrane and Caco-2 cells	IC_{50} 66.4 μM: Data from LLC-PK1 cells
OATP1B1	No: Data from HEK-293-OATP1B1 cells	IC_{50} 8.76 μM: Data from HEK-293 cells
OATP1B3	No: Data from HEK-293-OATP1B3 cells	Weak: IC_{50} 19.0 μM: Data from HEK-293 cells
OCT1	No: Data from HEK-293-OCT1 cells	No: Data from HEK-293 cells
OCT2	Not tested	IC_{50} = 5.64 μM Data from HEK-293 cells
OAT1	Not tested	IC_{50} = 2.14 μM Data from S2 cells
OAT3	Not tested	IC_{50} = 0.84 μM Data from S2 cells
MATE1	Not tested	Weak: IC_{50} = 46.4 μM Data from HEK-293 cells
MATE2-K	Not tested	Weak: IC_{50} = 82.4 μM Data from HEK-293 cells

2.4.3.7　　薬物動態の要約

セルメチニブの薬物動態特性を明らかにするため、非臨床試験で検討を行い、またヒトでの代謝及び臨床使用時に薬物相互作用が生じる可能性についても検討した。主な所見を以下に示す。

- セルメチニブのヒトにおける消失は、第一相の酸化的代謝及び第二相のグルクロン酸抱合化に大きく依存する。
- セルメチニブのヒト血漿中の主代謝物はグルクロン酸抱合体であり、最も多いグルクロン酸抱合体は O-グルクロン酸抱合体（M2）であった。
- 活性代謝物 N-脱メチル体（M8）は、ヒト血漿中に低濃度で認められ、マウス及びサル血漿中にも認められた。
- ヒト尿糞中のセルメチニブ由来成分は未変化体及び複数の代謝物であり、多くは微量の代謝物であった。大部分のヒト代謝物は、マウス、ラット又はサルの尿糞中でも認められた。フッ素脱離及び水酸基付加を受けた代謝物はラットで認められ、サルにおいても存在する可能性があるが、ヒトでは認められなかった。
- セルメチニブの酸化的代謝に関与する主な CYP 分子種は CYP3A4 及び 2C19 であり、強い CYP3A 及び 2C19 の阻害薬又は誘導薬の併用によりセルメチニブの消失は影響を受ける可能性が示唆された。
- セルメチニブは CYP2B6、2C9 及び 2D6 に弱い直接阻害作用を示し、CYP1A2、2B6 及び 2C19 に弱い時間依存的阻害作用を示した。また CYP1A、3A 及び 2C9 に弱い誘導作用を示した。しかしながら、これらの CYP 阻害及び誘導により臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

- セルメチニブの UGT 阻害により臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。
- セルメチニブは MDR1（P-gp）及び BCRP の基質であり、また BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1 及び MATE2-K に阻害作用を示した。しかしながら、これらトランスポーターを介した臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

以上、非臨床薬物動態特性は本適応申請におけるセルメチニブの使用を支持するものである。

2.4.4　毒性試験

セルメチニブの毒性について、ラットの最長 3 カ月間、マウスの最長 26 週間、並びにサルの最長 9 カ月の反復経口投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験、がん原性試験、生殖発生毒性試験、並びに *in vitro* 光毒性試験で評価した。N-脱メチル体及び変異原性の可能性があるいくつかの不純物についても遺伝毒性を評価した。セルメチニブ関連所見の可逆性については、マウス、ラット及びサルの 1 カ月間投与試験、並びにマウスの 26 週間投与試験で評価した。上記試験の主な所見を以下に記載する。毒性試験の一覧は毒性試験概要表 2.6.7.1 項に示した。

臨床で経口投与が予定されていることから、すべての毒性試験でセルメチニブを経口投与した。セルメチニブ遊離塩基又は硫酸塩を用いたすべての主要な試験において、Captisol®（スルホブチルエーテル β-シクロデキストリン）を用いた懸濁液を使用した。ただし、がん原性試験並びに出生時及び出生後発生試験（用量設定試験を含む）は例外とし、Captisol の既知の消化器への作用（Stella et al 2008）を避けるため、Phosal ベースの媒体を用いた媒体を使用した。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

ラットにセルメチニブ遊離塩基を 0、30、100 及び 300 mg/kg で単回経口投与したとき、忍容性は良好であり、投与に関連した所見は認められなかった。本試験における無毒性量は 300 mg/kg であった。

カニクイザルにセルメチニブ遊離塩基を 0、10、30 又は 100 mg/kg BID（1 日投与量 0、20、60 又は 200 mg/kg/日）、約 12 時間間隔で 1 日 2 回経口投与したとき、忍容性は良好であった。媒体対照群を含む、すべての用量で水様～液状便が認められた。媒体として使用した Captisol が対照群で認められた胃腸障害の原因であると考えられ、セルメチニブによる胃腸障害（液状便）の悪化をもたらした。血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼの一過性の増加が、関連する病理組織学的所見はみられないものの、セルメチニブの全用量群で認められた。本試験における無影響量は 30 mg/kg BID であった。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いて、セルメチニブ遊離塩基の最長 29 日間の反復経口投与毒性試験を行った。また、セルメチニブ硫酸塩の CD-1 マウスを用いた 28 日間及び 26 週間、並びにカニクイザルを用いた 9 カ月間の反復経口投与毒性試験も実施した。がん原性試験における用量選択の目的で、セルメチニブ硫酸塩を用いて、CByB6F1 マウスで最長 1 カ月間、ラットで最長 3 カ月間の用量設定試験を実施した。

セルメチニブ（遊離塩基又は硫酸塩）を用いたマウス、ラット及びサルの反復投与試験における主な所見の要約を以下に示す。

2.4.4.2.1　　マウスを用いた反復投与毒性試験

マウス 7 日間反復投与試験において、セルメチニブ硫酸塩を 151 mg/kg BID（302 mg/kg/日）以上投与したとき、一般状態変化が認められ早期死亡（死亡発見又は動物愛護の観点からの屠殺）に至った。これらのマウスの死亡原因は、消化管のびらん性及び炎症性変化並びに胃の病変（鉱質化、腺上皮変性及び粘膜下浮腫）であると考えられた。

マウス 1 カ月間反復投与試験において、セルメチニブ硫酸塩を 103 mg/kg BID（206 mg/kg/日）で投与したときの忍容性は悪く、複数の雄が早期屠殺された。その結果、12 日目に高用量を 69 mg/kg BID（137 mg/kg/日）まで減量したところ、同群の残りの全マウスが予定剖検まで生存した。103 mg/kg BID の上記雄における死亡原因は、消化管のびらん性及び炎症性所見が関連していると考えられた。生存動物においては、セルメチニブ硫酸塩によって一般症状変化（34 mg/kg BID 以上）及び血液生化学的検査値の変化（血漿中のカルシウム及び無機リン酸の増加とアルブミンの減少、69 mg/kg BID）が認められた。病理組織学的検査では、11 mg/kg BID 以上で種々の組織（角膜、腎臓、肝臓、心筋及び骨格筋）に用量依存的な鉱質化が認められ、69 mg/kg BID で消化管にびらん性及び炎症性変化がみられた。103/69 mg/kg BID で認められたその他の病理組織学的所見は、骨髄細胞充実性低下、脾臓における髄外造血増加及び肝門脈部の炎症性細胞浸潤などであった。同様の病理組織学的所見は 4 週間の回復期間の終了時にも認められたが、その発現率や重症度は主試験の動物と比較して低下していた。

マウス 26 週間反復投与試験で、セルメチニブ硫酸塩を 20 mg/kg BID（40 mg/kg/日）で投与したときの忍容性は悪く、投与 8～16 週目にほとんどの雄が死亡するか、早期屠殺された。これらの雄の死亡原因は、球海綿体筋の海綿体におけるうっ血に起因する尿路閉塞であった。20 mg/kg BID では、大腸の顕著な炎症性変化を伴う早期死亡（11～25 週目）もみられた。生存雌では、20 mg/kg BID で 26 週間投与したとき、体重増加抑制がみられ、血液学的検査及び血液生化学的検査結果に変化が認められた。病理組織学的変化として、リンパ細網系の二次的変化を伴う消化管の中程度～顕著な炎症性変化などがみられた。1 mg/kg BID 以上で、過形成を伴う軽微～軽度の炎症が消化管に認められた。数例の雄（20 mg/kg BID）の肝臓で多巣性の鉱質化が認められた。

RasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間がん原性試験の用量選択を目的として、CByB6F1 ハイブリッドマウス（非トランスジェニック同腹児）を用いた MTD/DRF 試験及び 1 カ月間投与試験でセルメチニブ硫酸塩を評価した。MTD 評価期では、350 mg/kg BID まで忍容性は良好であった。DRF 期では、150 mg/kg BID 投与は忍容性がなく、一般状態変化、体重に対する影響及び早期死亡が認められた。1 カ月間投与用量設定試験では、雄では 25、37.5 又は 50 mg/kg BID（50、75 又は 100 mg/kg/日）、雌では 50、75 又は 100 mg/kg BID（100、150 又は 200 mg/kg/日）で、CByB6F1 ハイブリッドマウスに強制経口投与した。雌に 100 mg/kg BID を投与したとき、一般状態変化及び体重減少が認められた。病理組織学的検査により、主な標的器官は雌雄ともに消化器であることが確認された。被験物質に関連した病理組織学的変化として、前胃粘膜、盲腸及び結腸のびらん／潰瘍形成などが 37.5 mg/kg BID 以上の雄及び 50 mg/kg BID 以上の雌で認められた。

2.4.4.2.2　　ラットを用いた反復投与毒性試験

ラット 29 日間反復投与毒性試験でセルメチニブ遊離塩基を 1 日 1 回経口投与したとき、10 mg/kg/日以上のすべての雄及び 30 mg/kg/日以上の雌で軟便が認められた。これらのラットにおける消化器への影響は、病理組織学的所見を伴わず、回復期間終了時には完全に回復していた。本試験では、血清中の無機リン酸、アルブミン及び／又はカルシウムの変化を伴う軟組織の鉱質化も認められた。29 日間反復投与後に、すべての用量（10 mg/kg/日以上）の雄及び 30

mg/kg/日以上の雌で、用量依存性の胃粘膜の鉱質化が認められた。回復期間終了後においても、この胃粘膜の鉱質化は認められた。

ラット 2 年間がん原性試験における用量選択のため、セルメチニブ硫酸塩を用いた 14 日間及び 3 カ月間用量設定試験を実施したところ、皮膚に所見が認められた。14 日間 DRF 試験において、雌（25 mg/kg/日以上）で皮膚病変（背腹両側の痂皮）がみられた。3 カ月間投与試験では、皮膚病変又は痂皮の一般状態変化のため、20 mg/kg/日の雄及び 25 mg/kg/日以上の雌が 26 日目及び 30 日目に早期屠殺され、本試験に 2 つの低用量群（雄の 1 又は 2.5 mg/kg/日及び雌の 2.5 又は 5 mg/kg/日）の追加が必要となった。2.5 mg/kg/日以上の雌及び 5 mg/kg/日以上の雄では、3 カ月間の投与期間終了時に、皮膚病変及び痂皮が依然として認められた。皮膚病変／痂皮の発現率及び重症度は用量増加に伴って上昇し、少数例の雄（5 mg/kg/日以上）及び雌（2.5 mg/kg/日以上）で観察された皮膚潰瘍化の病理組織学的所見と相関していた。

セルメチニブ硫酸塩の 3 カ月間用量設定試験において、早期死亡例の腎臓、胃、肝臓、心臓、舌及び肺等のさまざまな組織で軟組織の鉱質化がみられた。鉱質化は、3 カ月間の投与期間終了時も 1 mg/kg/日以上の雄及び 2.5 mg/kg/日以上の雌でみられたが、26/30 日目に安楽死させたラットと比較して、観察された組織数は少なかった。血清無機リンの増加及び血清アルブミンの減少が 14 日間及び 3 カ月間の両試験で認められた。本試験の 26 又は 30 日目に早期屠殺された雄（20 mg/kg/日）及び雌（25 又は 50 mg/kg/日）ラットで、大腿骨の骨端軟骨異形成及び大腿骨髄の細胞充実性低下が認められた。試験終了時には、10 mg/kg/日投与の雄に骨髄における病理組織学的所見（骨端軟骨異形成）が認められた。

2.4.4.2.3　　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験

カニクイザルにセルメチニブ遊離塩基を 1 日 2 回、29 日間投与したとき、すべての用量（3 mg/kg BID 以上）で持続的な水様便がみられた。セルメチニブ投与に関連する所見の大部分は、持続的な水様便による二次的な所見であり、脱水とそれに伴う血液生化学的検査パラメータの変化（10 mg/kg BID 以上）などであった。30 mg/kg BID において、より重度の脱水に伴う二次的な腎臓の組織学的変化が認められ、同群の雄 1 例が瀕死状態となり 29 日目に安楽殺された。その他のサルでは、4 週間の回復期間終了時にすべての変化が消失していた。

MTD 試験でセルメチニブ硫酸塩を 15 mg/kg BID（30 mg/kg/日）投与したとき、忍容性は不良で、腹部不快感、持続的な軟便／液状便／赤色便、肛門からの赤色物排泄、脱水及び体重減少、血液学的変化がすべての動物で認められ、雄 1 例を動物愛護の観点から早期屠殺された。28 日間及び 26 週間反復投与試験では、より低用量の 0、1.5、5 又は 7.5 mg/kg BID（0、3、10 及び 15 mg/kg/日）並びに 0、0.5、1.5 又は 4 mg/kg BID（0、1、3 及び 8 mg/kg/日）をそれぞれ投与した。28 日間投与試験（5 mg/kg BID 以上）及び 26 週間投与試験（1.5 mg/kg BID 以上）における主な所見は軟便であった。投与の継続に伴い、軟便は液状便となり、高用量では脱水の徴候を伴っていた。28 日間及び 26 週間反復投与試験のいずれにおいても、関連する病理組織学的所見はみられなかった。28 日間の休薬期間終了時に、消化器系の変化（液状便）及び関連する二次性変化からの回復が確認された。

セルメチニブ硫酸塩をカニクイザルに 0、0.5、1.5 又は 2.5 mg/kg BID（0、1、3 又は 5 mg/kg/日）で 9 カ月間投与したとき、忍容性は良好であった。セルメチニブ投与に起因する所見として、軟便／液状便が 1.5 mg/kg BID 以上で試験 5 週目まで、鼠径リンパ節の腫脹が 1.5 mg/kg BID 以上で試験 274 日目に、軽度の体重増加抑制が 2.5 mg/kg BID で試験期間を通じて、軽微で一時的な白血球、好中球及び好酸球数の増加が 1.5 mg/kg BID 以上で、軽度なアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの増加が 2.5 mg/kg BID で認められた。これらの変化に関連する病理組織学的変化は認められなかった。この試験における無毒性量は、2.5 mg/kg BID と判断された。

2.4.4.2.4　トキシコキネティクス

セルメチニブの主要毒性試験における総曝露量、及び非結合形曝露量（血漿蛋白結合率で補正）と、25 mg/m^2 BID を投与された患者におけるそれぞれの曝露量との比較を、毒性試験の概要文 2.6.6 項の表 2 に示す。トキシコキネティクスに関する考察を 2.4.3.2 項に示す。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

セルメチニブは、肝代謝活性化系（S9）の存在下及び非存在下で、細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）で突然変異誘発性を示さず、L5178Y *tk* マウスリンフォーマ試験でも陰性であった。CD-1 マウスにセルメチニブを 121 mg/kg/日以上の用量で 2 日間経口投与したとき、骨髄で小核の誘発がみられ、無影響量は 24 mg/kg/日であった。セントロメア染色により、小核の誘発は、セルメチニブの薬理作用と一致した染色体数的異常誘発作用によることが確認された。

2.4.4.4　がん原性試験

RasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間投与試験及び Han Wistar ラットを用いた 2 年間投与試験において、セルメチニブ硫酸塩のがん原性を評価した。がん原性試験における用量は、CByB6F1 マウスを用いた最長 1 カ月間の用量設定試験及び Han Wistar ラットを用いた最長 3 カ月間の用量設定試験により選択した。がん原性試験では、10%エタノール、30% PEG 400 及び 60% Phosal 50 PG（50%（w/w）ホスファチジルコリン、3%（w/w）ベニバナ種子油及び 40%（w/w）プロピレングリコール）を含む媒体を用い、セルメチニブ硫酸塩を投与した。

2.4.4.4.1　ラットを用いたセルメチニブ硫酸塩の 2 年間がん原性試験

1 群あたり雌雄各 50 例からなる Han Wistar CRL:WI(Han)ラット 3 群に、セルメチニブを 1 日 1 回 2 年間経口投与した。用量は雄で 0.25、0.8 又は 2.5 mg/kg/日、雌で 0.1、0.3 又は 1 mg/kg/日とした。2 つの対照群には Milli-Q 水又は媒体を投与した。

セルメチニブ硫酸塩を投与したすべての動物において、セルメチニブの全身曝露が確認された。いずれの投与群も、媒体投与群と比較したとき、死亡率に統計学的有意差は認められなかった。セルメチニブの投与により、触知腫瘤の発現率が増加することはなかった。雌雄ラットにセルメチニブ硫酸塩を 1 日 1 回最長 104 週間にわたって強制経口投与したときの忍容性は、概して良好であった。セルメチニブ投与と関連がある一般状態の変化は、すべての用量の雌雄で痂皮及び毛皮の着色（黄色）が用量依存的に認められたのみであった。

いずれの用量のセルメチニブ投与群でも、腫瘍性所見や前腫瘍性所見は認められなかった。セルメチニブ投与と関連する病理組織学的所見は孤発的な皮膚のびらん／潰瘍が認められたのみであったが、雄の 0.8 mg/kg/日以上で発現率及び重症度とも高く、雌では 1 mg/kg/日群で重症度が高かった。2.5 mg/kg/日の雄では、対照群を含めた他群と比べ、腸間膜リンパ節での赤血球貪食／赤血球増加の発現率も高かった。

以上より、セルメチニブは Han Wistar ラットにがん原性を示さないと考えられた。

2.4.4.4.2　RasH2 Tg マウスを用いたセルメチニブ硫酸塩の 6 カ月間がん原性試験

3 群の雌雄 rasH2 Tg マウスに、3、8 又は 25/15 mg/kg BID（6、16 又は 50/30 mg/kg/日）のセルメチニブ硫酸塩を強制経口投与した。25 mg/kg BID において、16 週目から死亡、一般状態変化、及び体重減少が認められたため、19 週目（130 日目）から 15 mg/kg BID（30 mg/kg/日）に減量し

た。対照群として、水投与群及び媒体投与群を設け、陽性対照群には 1 日目のみ 7.5 mg/mL の N-ニトロソメチルウレアえを腹腔内投与した。セルメチニブ硫酸塩を投与した主試験において、雌雄の生存率に統計的有意差は認められなかった。一方、25 mg/kg BID を投与した TK 群のマウスで早期死亡が増加したことから（雄 3 例及び雌 1 例）、この用量は忍容されないことが示された。したがって、残りの試験期間では投与量を 15 mg/kg BID まで減量し、試験終了までの期間を通じて、当該用量で忍容性が認められた。

セルメチニブを投与されたすべての動物に、セルメチニブ及び N-脱メチル体への曝露が認められた。セルメチニブの投与に関連した非腫瘍性の病理組織学的所見が盲腸（8 mg/kg BID 以上の雌雄における陰窩過形成）、結腸（3 mg/kg BID 以上の雄及び 25/15 mg/kg BID の雌における陰窩過形成、25/15 mg/kg BID の雌雄における憩室）、並びに脾臓（3 mg/kg BID 以上の雌における色素性マクロファージ増加）で認められた。

いずれの用量においても、被験物質に関連した肉眼所見及び腫瘍性の病理組織学的所見は認められなかった。したがって、セルメチニブは rasH2 Tg マウスにがん原性を示さないと考えられた。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

マウスを用いた 26 週間投与試験において、雄受胎能を評価した（毒性試験の概要文 2.6.6.6 項参照）。セルメチニブ硫酸塩を 0、1、5 又は 20 mg/kg BID（0、2、10 及び 40 mg/kg/日）で 10 週間投与した雄マウスを無処置の雌と交配させ、雄の交尾行動及び受胎能を評価した。雄の交尾行動及び受胎能に対する無影響量は 20 mg/kg BID であった。

雌マウス（22 例/群）にセルメチニブ硫酸塩を 0、2.5、12.5 又は 37.5 mg/kg BID（0、5、25 及び 75 mg/kg/日）で交配前の 14 日間、交配中及び交配後の妊娠 6 日目まで強制経口投与し、雌受胎及び生殖能に対する影響を評価した。0 又は 37.5 mg/kg BID を投与した雌 12 例で、21 日間の無投与期間後に生殖能を評価した。セルメチニブ 12.5 mg/kg BID 以上での母体毒性は軽微であり、37.5 mg/kg BID においても交尾行動及び受胎能に有害な作用は認められなかった。12.5 mg/kg BID 以上で、統計学的に有意な生存胚数の軽度減少が認められたが、投与量との相関は認められなかった。21 日間の回復期間後、生存胚数への影響はみられなかった。母体毒性及び生殖能に対する無毒性量は、いずれも 2.5 mg/kg BID（5 mg/kg/日）と考えられた。

胚・胎児発生試験での用量を設定するため、交配した雌 CD-1 マウス（10 例/群）を用いた用量設定試験を実施した。器官形成期（交尾後 6 日から 16 日まで）に、マウスにセルメチニブを 0、2.5、12.5、37.5 又は 75 mg/kg BID（0、5、25、75 又は 150 mg/kg/日）で投与した。75 mg/kg BID 以下の忍容性は良好であり、母体毒性はみられなかったが、12.5 mg/kg BID 以上では、胚の死亡、平均胎児重量の減少、胎児奇形（開眼、腹壁裂又は口蓋裂など）が認められた。この試験における胚・胎児の生存及び発生に対する無影響量は 2.5 mg/kg BID であった。胚・胎児発生に関する本試験では、交配させた雌マウス（22 例/群）に器官形成期（妊娠 6～16 日目）にセルメチニブ硫酸塩を 0、2.5 又は 37.5 mg/kg BID で投与した。37.5 mg/kg BID で投与したとき、生存胎児数の減少、並びに開眼及び口蓋裂の発生率の上昇がみられた。高用量では胎児体重及び出生児体重の減少が認められた。母体毒性、胎児異常及び変異に対する無毒性量は 2.5 mg/kg BID であった。

出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験では、交配した CD-1 マウス（8 例/群）に 0、5、12.5、25、40 又は 75 mg/kg BID（0、10、25、50、80 又は 150 mg/kg/日）を妊娠 6 日目から授乳 15 日目まで投与した。他の群には 75 mg/kg BID（150 mg/kg/日）を妊娠 15 日目から授乳 15 日目まで投与した。生存した F0 世代の雌とその同腹児を授乳 15 日目に屠殺した。セルメチニブを

40 mg/kg BID 以上で投与したとき、一般状態変化が認められ、一般状態変化を示した動物は出産しなかった。5 mg/kg BID 以上では母体の体重増加抑制が認められた。全同腹児死亡を含む胚・胎児死亡（25 mg/kg BID 以上）、出生児の生存率低下（25 mg/kg BID 以上）、出生児体重の減少（12.5 mg/kg BID 以上）が認められた。分娩後の F1 世代の出生児に、セルメチニブに関連した一般状態変化が認められ、それに伴って 12.5 mg/kg BID 以上で生存率の低下がみられた。その他に、セルメチニブに起因すると考えられた出生児における変化として、12.5 mg/kg BID 以上の投与で水晶体混濁、開眼、口蓋裂及び後肢内転などが認められた。以上の結果から、マウスを用いた出生時及び出生後の発生に関する試験の用量として、0.5、2 及び 7.5 mg/kg BID を選択した。

出生時及び出生後の発生に関する本試験では、各群 25 例の交配後雌 CD1 マウス（F0）に、セルメチニブ硫酸塩又は媒体を 0、0.5、2 又は 7.5 mg/kg BID（0、1、4 及び 15 mg/kg/日）で投与した。投与は妊娠 6 日目から開始し、授乳 20 日目（出産したマウス）又は妊娠 22 日目（出産しなかったマウス）まで継続した。妊娠マウスにセルメチニブを妊娠 6 日から授乳 20 日目まで投与したとき、出生児の体重抑制が認められ、7.5 mg/kg BID 投与では授乳 21 日目の時点で瞳孔収斂基準を満たした出生児の数が少なかった。すべての用量で奇形（開眼及び口蓋裂）の発現率が増加したことから、無毒性量は確認できなかった。

2.4.4.6　その他の毒性試験

2.4.4.6.1　代謝物の試験

N-脱メチル体は、ラット S9 代謝活性化系の存在下及び非存在下で実施した細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ試験で遺伝毒性を示さなかった。

2.4.4.6.2　不純物の試験

不純物E* はセルメチニブ硫酸塩の中間体であり、加水分解産物である。細菌を用いた復帰突然変異試験を実施したところ、ネズミチフス菌 TA1535 株を用いたラット S9 存在下で陽性結果を示した。上記結果の機序を検討するための試験では、3 種のヒスチジン要求性ネズミチフス菌株（TA1535、TA1535NR 及び YG7127）を用い評価した。YG7127 株は、TA1535 のニトロ還元酵素遺伝子が欠損した株であり（Yamada et al 1997）、TA1535 の陽性結果が細菌特異的であるかを検討するために用いた。本試験では YG7127 株は陰性であったが、TA1535 株及び T1535NR 株では弱い陽性結果を示したことから、陽性結果にはニトロ還元酵素が関与していることが明らかとなった。したがって、TA1535 での陽性結果は哺乳類細胞においては意義がなく、不純物E* に変異原性はないと考えられた。

不純物E* は、S9 の存在下及び非存在下で、1 mM（ICH S2(R1)ガイドラインによる i*n vitro* 小核試験における最大推奨濃度）までの濃度で L5178Y 細胞を処理したとき、小核を誘発しなかった。

セルメチニブ硫酸塩の製造における出発物質である不純物F* の突然変異誘発性を、S9 存在下及び非存在下の復帰突然変異試験で評価したところ、S9 の存在下でネズミチフス菌 TA98 株の復帰変異コロニー数を有意に増加させた。

不純物である不純物I* 及び不純物G* を、細菌を用いた復帰突然変異試験で評価したところ、いずれも陰性であった。セルメチニブ硫酸塩中の理論上想定されるニトロソアミン不純物である不純物H* を、プレインキュベーション法を使用しラット及びハムスター肝由来 S9 の存在下及び非存在下で変異原性ニトロソアミンの検出に最適化した復帰突然変異試験で評価したところ、陰性であった。

ICH M7(R1)ガイドラインに従い、製造工程において変異原性又は変異原性の可能性を有する不純物を管理している。

2.4.4.6.3　光毒性試験

セルメチニブ硫酸塩の光毒性を、Balb/c 3T3 線維芽細胞を用いた *in vitro* ニュートラルレッド取り込み試験で、0.316、1.0、3.16、10.0、31.6、100.0、316.0 及び 1000 μg/mL の濃度で評価した。セルメチニブは ICH S10 ガイドラインの推奨最高濃度である 100 μg/mL では光毒性を示さなかった。セルメチニブは 316 μg/mL 以上の濃度で光毒性を起こす UV を吸収し、3T3 を用いたニュートラルレッド取り込み試験では、UV 存在下において細胞毒性を増強させた。

2.4.4.7　毒性試験の要約

セルメチニブの非臨床安全性プロファイルは、このクラスの薬剤で予想される薬理作用と一致していた。主な標的臓器は皮膚、消化管及び骨であった。げっ歯類ではいくつかの器官で軟組織の鉱質化が認められた。軟組織の鉱質化を除くすべての所見は可逆的であった。臨床最高用量の 25 mg/m^2 BID を投与したときの曝露量以上の曝露量で、標的臓器毒性が認められた。

セルメチニブは細菌又は哺乳類細胞を用いた *in vitro* の試験で遺伝毒性を示さなかったが、*in vivo* のマウス骨髄小核試験において小核を誘発した。これは染色体数的異常誘発作用によるものと考えられた。rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間投与試験及び Han Wistar ラットを用いた 2 年間投与試験において、セルメチニブはがん原性を示さなかった。

セルメチニブは雌雄マウスの受胎能に影響を及ぼさなかったが、臨床での 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量を下回る曝露量で、胚・胎児の生存及び発生に対して有害作用を及ぼす可能性が示された。

以上から、セルメチニブの非臨床安全性プロファイルは、予定している適応症におけるセルメチニブの使用を支持するものである。

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　作用機序

薬理作用及び作用機序を評価するようにデザインした *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験から成る総合的なパッケージにおいて、セルメチニブを評価した。セルメチニブは、MEK1 及び MEK2（MAP2K1 及び MAP2K2）の強力かつ選択的な ATP 非競合的阻害薬である。細胞株を用いた *in vitro* 試験で、セルメチニブは強力かつ選択的な MEK1/2 阻害活性を示した。ヒト腫瘍を皮下に異種移植したモデルに、セルメチニブを臨床的に意味のある血漿中濃度となる用量範囲で経口投与したとき、セルメチニブは ERK のリン酸化に対して時間及び曝露量に依存した阻害作用を示した。ヒトの *NF1* の遺伝子型及び表現型を再現する神経線維腫が発生するよう、遺伝子改変したマウスの NF1 モデルでは、セルメチニブの経口投与によって、ERK のリン酸化が阻害され、神経線維腫の腫瘍量、増殖、数及び成長が抑制された。セルメチニブの 2 種類の代謝物について MEK 阻害の作用強度を評価した。細胞における MEK1/2 活性に対して、N-脱メチル体はセルメチニブよりも 3～5 倍強力な阻害作用を示したが、アミド体の作用強度はセルメチニブの 50 分の 1 以下であった。セルメチニブの主要代謝物である M2 の MEK に対する阻害活性を生化学アッセイ及び細胞を用いたアッセイで評価した。両方のアッセイで、代謝物 M2 は 10 μmol/L の濃度まで不活性であることが示された。

2.4.5.2　安全性薬理試験の主な結果

セルメチニブ（遊離塩基）に関する一連の *in vivo* 安全性薬理試験で、心血管系、呼吸器系、中枢神経系及び消化器系の機能に影響を及ぼす可能性を評価した。hERG アッセイ及び副次的薬理試験の標的パネルにおいても、セルメチニブ及び N-脱メチル体の *in vitro* 評価を行った。これらの試験及びアッセイにおいて毒性学的に意義のある所見は認められなかった。

2.4.5.3　薬物動態の主な結果

セルメチニブには 2 種類の微量の活性代謝物 N-脱メチル体（M8、薬理活性はセルメチニブの約 3～5 倍）及びアミド体（M14、薬理活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下）が確認されている。ヒト血漿中の M8 及び M14 は、[^{14}C]-セルメチニブ 75 mg を単回経口投与したヒトマスバランス試験でそれぞれ血漿中総放射能の約 2.9%及び 1.6%未満であった。ヒト血漿中及び尿中の主代謝物は、O-グルクロン酸抱合体 M2（血漿中及び尿中総放射能のそれぞれ約 22%及び 10%）であった。

非臨床試験ではセルメチニブ遊離塩基及びセルメチニブ硫酸塩の 2 種類を用いた。セルメチニブ遊離塩基の吸収は低用量では良好であったが、用量増加に伴いバイオアベイラビリティは低下した。セルメチニブ硫酸塩投与時の曝露量は、マウス、ラット及びサルで遊離塩基投与時より高い曝露量が得られ、また概ね用量比例的に増加した。N-脱メチル体（M8）はラット又はサルで明らかな量の生成はなかったが、マウス（6 カ月間がん原性試験）では雄及び雌で C_{max} はそれぞれセルメチニブの 30%及び 13%、AUC はそれぞれセルメチニブの 30%及び 18%まで生成した。

In vitro 試験より、セルメチニブは CYP を介した第一相の酸化的代謝を受け、また広範な UGT を介した第二相の抱合化により種々のグルクロン酸抱合体を生成することが示された。セルメチニブの酸化的代謝に関与する主な CYP 分子種は CYP3A4 及び 2C19 であり、セルメチニブの直接的なグルクロン酸抱合には UGT1A1 及び 1A3 が関与すると考えられた。N-脱メチル体の生成には CYP1A2、2C9 及び 2C19 を含む多くの代謝酵素が関与し、N-脱メチル体はセルメチニブと同じ経路で代謝されると考えられた。マウス、ラット及びサルのマスバランス試験より、主排泄経路はいずれの動物種でも糞中であった。セルメチニブは CYP2C9、2D6 及び 3A4/5 に時間依存的阻害作用を示さなかったが、CYP1A2、2B6 及び 2C19 には濃度 50 μM でわずかな時間依存的阻害作用を示した（それぞれ 31%、26%及び 47%阻害）。これら CYP 分子種に対する時間依存的阻害作用により臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

セルメチニブは CYP2B6、2C9 及び 2D6 に弱い阻害作用を示すが、臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。また、CYP 誘導により臨床的に意味のある薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。しかしながら、肝細胞、ヒト肝ミクロソーム及び CYP 発現系を用いた *in vitro* 試験から、セルメチニブの代謝に関与する主な CYP 分子種は CYP3A4 及び 2C19 であり、強い CYP3A 及び 2C19 の阻害薬又は誘導薬の併用によりセルメチニブの消失は影響を受ける可能性が示唆された。

ヒト肝細胞を用いた検討で、セルメチニブは CYP1A、2C9 及び 3A に弱い誘導作用を示した。臨床におけるセルメチニブの C_{max} は 2 μM 未満と予測され、この濃度では検討した CYP 分子種に対するセルメチニブの最大誘導効果は典型的な酵素誘導剤の 10%未満と推定され、*in vivo* でセルメチニブが CYP1A、2C9 及び 3A を誘導する可能性は低いと考えられた。セルメチニブは MDR1（P-gp）及び BCRP の基質であり、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OCT2、OAT1、OAT3、MATE1 及び MATE2-K を阻害したが、MHLW ガイドラインの基準に従い、これらトランスポーター阻害による臨床的に問題となる薬物相互作用が生じるリスクは低いと考えられた。

2.4.5.4　　毒性試験の主な所見

セルメチニブの非臨床安全性プロファイルは、総合的な毒性試験パッケージに評価され、化合物の薬理作用を概ね反映しており、トラメチニブ（Trametinib (Mekinist®) 2013）、コビメチニブ（Cobimetinib (Cotellic®) 2015）及びビニメチニブ（Binimetinib (Mektovi®) 2018）等、上市されている他の MEK 1/2 阻害薬で報告されているプロファイルと類似していた。反復投与試験における主な標的臓器は皮膚、骨及び消化管であった。また、げっ歯類のいくつかの器官において軟組織の鉱質化が認められた。軟組織の鉱質化を除き、すべての所見は休薬により回復性を示した。

非臨床試験で認められた主要所見の考察には、最小毒性量（LOAEL）及び／又は無毒性量（確認可能な場合）における曝露量比を用いた。考察において最も慎重な曝露量比を設定するため、最小毒性量又は無毒性量でセルメチニブを投与したときの非結合形曝露量（げっ歯類における血漿蛋白結合率で補正、薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）及び総曝露量（サル）と、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の各々の曝露量とを比較した。最低毒性量及び無毒性量/無影響量での定常状態における非結合形曝露量（げっ歯類）及び総曝露量（サル）の AUC を表 3 に示す。非臨床安全性に関する考察では、非結合形曝露量と総曝露量の区別を示さず、最も小さい曝露量比の値を示した。なお、日本人小児の曝露量（$AUC_{0\text{-}12h}$）は外国人小児と比較し 1.26 倍高かったため（臨床薬理試験 2.7.2.3.4.1.2 項参照）、日本人小児における曝露比は以降に示した値の約 0.8 倍となる。

表 3　　主要毒性試験の最低毒性量及び無毒性量における曝露量

Target organ of toxicity	Species [c]	Study duration	Exposure [a] at NOAEL or NOEL, Mean $AUC_{0\text{-}12}$ (ng.h/mL)		Exposure [a] at LOAEL Mean $AUC_{0\text{-}12}$ (ng.h/mL)	
			Male	Female	Male	Female
Skin [d]	Rat	3 months	94.1 (2.5 mg/kg)	NA	196.3 (5 mg/kg)	129.1 (2.5mg/kg)
		2 years	10.3 (0.25 mg/kg)	19.8 (0.3 mg/kg)	33.3 (0.8 mg/kg)	92.7 (1.0 mg/kg)
Bone	Rat	3 months	196.3 (5 mg/kg)	368.7 (12.5 mg/kg)	374.8 (10 mg/kg)	553.3 [g] (25 mg/kg)
Tissue mineralisation	Mouse	1-month	NA	NA	568.9 (11 mg/kg)	684.7 (11 mg/kg)
		26 weeks	247.5 (5 mg/kg)	283.8 (5 mg/kg)	715.0 (20 mg/kg)	1087.9 (20 mg/kg)
	Rat	29 days [b]	NA	73.5 (10 mg/kg)	82.5 (10 mg/kg)	195 (30 mg/kg)
		3 months	94.1 (2.5 mg/kg)	277.4 (5 mg/kg)	196.3 (5 mg/kg)	368.7 (12.5 mg/kg)
GI [e]	Mouse	1-month	NA	NA	568.9 (11 mg/kg)	684.7 (11 mg/kg)
		26 weeks	NA	NA	43.2 (1 mg/kg)	55.9 (1 mg/kg)
	Rat	29 days [b]	NA	73 (10 mg/kg)	82 (10 mg/kg)	194 (30 mg/kg)
	Monkey	28 days	3100 (1.5 mg/kg)	3100 (1.5 mg/kg)	4200 (5 mg/kg)	4200 (5 mg/kg)
		26 weeks	2660 (1.5 mg/kg)	905 (0.5 mg/kg)	9790 (4 mg/kg)	2450 (1.5 mg/kg)

表 3　主要毒性試験の最低毒性量及び無毒性量における曝露量

Target organ of toxicity	Species [c]	Study duration	Exposure [a] at NOAEL or NOEL, Mean AUC_{0-12} (ng.h/mL)		Exposure [a] at LOAEL Mean AUC_{0-12} (ng.h/mL)	
			Male	Female	Male	Female
		9 months	3210 (2.5 mg/kg)	2530 (2.5 mg/kg)	NA	NA
Carcinogenicity studies						
Absence of neoplastic or pre-neoplastic findings	Rat	2 year	240.3 (2.5 mg/kg)	185.4 (1 mg/kg)	NA	NA
	CByB6F1/Tg rasH2 mouse	6 months	128 (15 mg/kg)	780 (15 mg/kg)	NA	NA
Fertility and Embryofetal Developmental study [f]						
NOEL for male fertility	Mouse	10 weeks	715.0 (20 mg/kg)	NA	NA	NA
NOAEL for maternal toxicity and female reproductive performance	Mouse	14 days prior to pairing-GD6	NA	113.8 (2.5 mg/kg)	NA	719.9 (12.5 mg/kg)
NOAEL fetal survival and development	Mouse	GD 6 to GD 16	NA	9790 (2.5 mg/kg)	NA	719.9 (12.5 mg/kg)
Clinical exposure at the maximum recommended clinical dose of 25 mg/m^2 BID				Mean total AUC_{0-12}		2009 (ng.h/mL)
				Mean unbound AUC_{0-12}		32.14 (ng.h/mL)

BID = twice daily; F = female; M = Male; LOAEL = lowest observed adverse effect level; LOEL = lowest observed effect level; GD Gestation day; NA = not available; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observed effect level

AUC_{0-12} for rat obtained by dividing AUC_{0-24} by 2 (BID dosing in monkey, mouse and human)

Units for dose levels in some studies were converted from μmol/kg/day to mg/kg/day using the molecular weight of selumetinib of 457.7 g/mole and rounding the values to the nearest whole number.

[a] Unbound $AUC_{(0-12)}$ is determined by adjusting the total $AUC_{(0-12)}$ for plasma protein binding in rodents (Module 2.6.4.4).

[b] 1-month rat study conducted with selumetinib free base

[c] Twice daily dosing in monkey, mouse and human; once daily dosing in rat

[d] The LOAEL value for skin refer to the dose at which histopathological changes were seen at higher severity or incidence compared to the control group. The NOAEL/NOEL for skin corresponds to the clinical sign and histopathology changes were comparable to those in the control group.

[e] GI findings correspond to histopathology findings (mice) and in-life findings (rats and monkeys).

[f] The peri and post-natal development studies only evaluated maternal and offspring exposure at the predicted maternal C_{max} and C_{min} timepoints, a NOAEL was not established therefore data are not presented here.

[g] Exposure at 25 mg/kg/day in the 3 month study was measured on Study Day 28 prior to termination of the animals in this dose group.

Han Wistar ラットにセルメチニブ硫酸塩を投与した 3 カ月間反復投与試験及び 2 年間がん原性試験において、潰瘍性及び炎症性皮膚所見が認められた。ラットの 2 年間がん原性試験（生涯曝露）で皮膚所見が認められた最低用量における全身曝露量は、臨床での 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量と比較して 2.9 倍（雌）及び 1.0 倍（雄）であった。皮膚は、MEK 阻害剤を投与したげっ歯類、及び RAS により制御される RAF-MEK-ERK 経路の阻害剤を投与した患者において、毒性標的臓器であることが知られている（Brown 2010；Welsh et al 2015）。したがって、皮膚への影響はセルメチニブの薬理作用に起因する可能性が高い。発疹は、MEK 1/2 阻害薬（Binimetinib (Mektovi®) 2018、Cobimetinib (Cotellic®) 2015 及び Trametinib (Mekinist®) 2013）で多く報告されている既知の皮膚有害事象である。セルメチニブの投与を受けた小児患者において、皮膚への影響をモニタリングしており、発疹が報告され管理されている（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

ラット、マウス及びサルにセルメチニブを投与したとき、胃腸に障害が認められた。ラットにセルメチニブを連日経口投与したとき、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量の約 2.6 倍（雄）及び 6 倍（雌）の曝露量で、軟便が認められた。マウスにセルメチニブを最長 26 週間投与したとき、臨床において 25 mg/m^2 BID を投与したときの曝露量と同程度（1.5 倍）の曝露量で、消化管に潰瘍性及び炎症性の変化が認められた。サルを用いた反復投与試験において、セルメチニブを最長 26 週間投与したとき、下痢がみられた。持続性の下痢により、脱水、血液生化学的検査値異常及び腎尿細管の病理組織学的変化など、いくつかの二次性の変化が認められた。サル（26 週間）の消化器所見に対する最低毒性量での全身曝露量は、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量の 1.2 倍（雌）及び 4.9 倍（雄）であった。散発的な軟便／液状便がサル 9 カ月試験の試験 5 週目までに 1.5 mg/kg BID（臨床曝露量の 1.4 倍）以上で認められた。セルメチニブを投与されたげっ歯類及びサルで観察された消化器所見は、このクラスの薬剤の作用機序に関連していると考えられる（Osaki et al 2013）。これらの消化器所見は臨床的に問題となると考えられ、セルメチニブの投与を受けた患者で認められているが、臨床的に管理可能である（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

マウスを用いた反復投与試験では、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量の 28 倍以上の曝露量で、骨髄の細胞充実性低下とそれに伴う血中赤血球パラメータの低下、並びにリンパ節の反応性過形成が認められた。これらの変化は網状赤血球及び脾臓の髄外造血を伴っており、腸の炎症、並びに腸の潰瘍性及びびらん性病変からの失血に対する骨髄及び末梢組織の生理的反応を示している。マウス消化管のびらん性及び炎症性変化に関連して、肝障害の指標となる血漿中バイオマーカーの変化を伴わない、肝門脈域の炎症性細胞浸潤（臨床曝露量の 28 倍）も認められた。病理組織学的変化を伴わない鼠径リンパ節の腫脹、軽微で一過性の白血球、好中球、好酸球及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの増加が、サル 9 カ月間試験の 1.5 mg/kg BID（臨床曝露量の 1 倍）以上で認められた。セルメチニブの投与を受けた小児患者において、血液学的バイオマーカー及び肝バイオマーカーのモニタリングを行っている（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

Han Wistar ラット用いた 3 カ月間投与試験では、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量の 11 倍以上の曝露量で、雌雄の大腿脛骨関節に病理組織学的所見が認められた。認められた変化は、雄（10 mg/kg/日以上）の大腿骨における軽微な骨端軟骨異形成及び雌（25 mg/kg/日以上）の骨端軟骨近傍の大腿骨髄における細胞充実性低下であった。ラット 2 年間がん原性試験では、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量の約 3 倍（雌）及び約 4 倍（雄）の曝露量で、骨端軟骨異形成は観察されなかった。肥大軟骨細胞の帯域拡大及び長骨における一次骨化中心形成遅延に MEK 阻害が関与していることが、遺伝子改変マウスモデルを用いた研究で示されている（Matsushita et al 2012）。したがって、セルメチニブを投与したラットで認められた骨端軟骨への影響は、セルメチニブの薬理作用によるものと考えられる。ラットにおける骨端軟骨異形成

は、ビニメチニブなどの他の MEK1/2 阻害剤でも報告されている。ビニメチニブを用いた 28 日間のラット試験で骨端軟骨異形成が観察されたが、4 週間の休薬期間後に回復することが示された（Mektovi® (Binimetinib) 2018）。セルメチニブの 3 カ月間投与試験では回復性を評価しなかったが、ビニメチニブ及び血管新生阻害薬に関する文献情報から、骨端軟骨異形成は回復可能であると考えられる（Bender et al 2011；Hall et al 2006；Ryan et al 1999；Patyna et al 2008；Wedge et al 2005）。げっ歯類では概して、長骨の成長とリモデリングが速いため、成長板への影響は、他の非臨床動物種と比較してげっ歯類においてより高頻度に認められる。したがって、セルメチニブ投与時に若くて未成熟であり、成長板閉鎖前であったサルにおいて、骨端軟骨異形成がみられなかったことは、予期されないことではない。ラットで骨端軟骨異形成がみられたときの曝露量は、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量を 11 倍以上上回っていたが、骨格が未成熟な患者では、セルメチニブの投与によって成長板に影響が生じる可能性がある。よって、骨端軟骨異形成の徴候及び骨成長の変化について、患者のモニタリングを実施した。現在までに、セルメチニブの投与を受けた小児 NF1 患者において、骨成長に関連した変化や骨端軟骨異形成の徴候は報告されていない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

げっ歯類では、セルメチニブを投与したとき、さまざまな器官に軟組織の鉱質化が認められた。ラットでは、鉱質化に伴って血漿中の無機リン酸、アルブミン及び／又はカルシウムに変化がみられた。ラット及びマウスの軟組織鉱質化に対する最低毒性量での全身曝露量は、臨床での 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量に対し、それぞれ 6 倍及び 19.5 倍であった。サルにセルメチニブを最長 26 週間投与したとき、組織の鉱質化は認められなかった。げっ歯類における軟組織の鉱質化は他の MEK 阻害薬でも報告されており、動物種特異的な反応である可能性がある（Brown et al 2005）。ラットで軟組織鉱質化、リン及び／又はカルシウム増加、並びにアルブミン減少の所見がみられたことから、セルメチニブを投与した患者でこれらのパラメータをモニタリングしたが、現在まで、セルメチニブを投与した小児患者で、血清中のカルシウム又はリン酸の顕著な変化は報告されていない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

雄 CD-1 マウスでは、20 mg/kg BID（臨床曝露量の 28 倍）を 8 週間超～15 週間投与したとき、球海綿体筋の海綿体のうっ血がみられ、数例では尿路閉塞及び逆流圧の影響で早期死亡に至った。マウスにおける陰茎変化の発生機序は不明である。カニクイザルにセルメチニブを 26 週間投与したときには、同様の変化はみられなかった。セルメチニブを投与した患者では、陰茎機能への影響は報告されていない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

セルメチニブは、細菌又は哺乳類細胞を用いた *in vitro* 遺伝毒性試験で陰性であったが、マウスの *in vivo* 試験で骨髄に小核を誘発した。これは染色体数的異常誘発作用によるものであり、セルメチニブの薬理作用と一致している（Horne et al 2003）。染色体数的異常誘発性に関する無影響量（24 mg/kg）での曝露量は（C_{max}）、臨床曝露量の 28 倍に相当することが確認された。小児 NF1 患者ではセルメチニブを生涯にわたり長期間使用する可能性が高いことから、rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間投与試験及び Han Wistar ラットを用いた 2 年間投与試験において、セルメチニブのがん原性を評価した。全身曝露量で評価したとき、rasH2 Tg マウスでは臨床曝露量の 16 倍（雄）～24 倍（雌）、ラットでは臨床曝露量の約 2.9 倍（雌）～3.7 倍（雄）において、セルメチニブはがん原性を示さなかった。

セルメチニブは、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量のそれぞれ約 22 倍又は 3.5 倍の曝露量で、雄又は雌マウスの受胎能に影響を及ぼさなかった。マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験において、セルメチニブは母体毒性を誘発しない用量で胚・胎児の発生及び生存に有害作用を及ぼす可能性が示された。器官形成期にセルメチニブを投与すると、生存胎児数の減少（着床後死亡の増加による）、胎児及び出生児の平均体重の減少、開眼及び口蓋裂の増加が認められた。マウスの胚・胎児所見に対する無毒性量での全身曝露量は、臨床での 25 mg/m^2 BID 投

与時の曝露量の 3.5 倍であった。妊娠マウスにセルメチニブを妊娠 6 日目～授乳 20 日目まで投与したとき、出生児の体重抑制が認められ、授乳 21 日目の時点で瞳孔収斂基準を満たした出生児の数が少なかった。奇形の発生は、母体の平均血漿中濃度（C_{max}）が、臨床における 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量の 0.4 倍で認められた。生殖発生毒性試験の結果から、セルメチニブを妊娠中又は授乳中の患者に投与すると、胚・胎児の生存及び発生に有害作用を及ぼす可能性が示された。

セルメチニブは、ICH S10 ガイドラインの最高推奨濃度である 100 µg/mL（臨床 C_{max} の 8000 倍超）で光毒性のリスクを示さなかった。

薬理活性を有する微量代謝物である N-脱メチル体への曝露は、マウスを用いた主要毒性試験で確認されている。反復投与毒性試験において、関連するすべての不純物の安全性を確認した。変異原性又は変異原性の可能性を有する不純物の濃度は、ICH M7(R1)ガイドラインに従って、製造工程において管理される（品質に関する概括資料 2.3.S.3.2 項参照）。

セルメチニブの非臨床毒性プロファイルは、予定する適応症に対して許容可能であると考えられる。

2.4.6　結論

本非臨床試験プログラムは、申請適応におけるセルメチニブの使用を支持するものである。

2.4.7　参考文献

Allen et al 2003

Allen LF, Sebolt-Leopold J, Meyer MB. CI-1040 (PD184352). A targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). Semin Oncol 2003;30(5 Suppl 16):105-16.

Ballester et al 1990

Ballester R, Marchuk D, Boguski M, Saulino A, Letcher R, Wigler M, et al. The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. Cell 1990;63:851-9.

Basu et al 1992

Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. Nature 1992;356(6371):713-5.

Bender et al 2011

Bender JG, Yamashiro DJ, Fox E. Clinical development of VEGF signalling pathway inhibitors in childhood solid tumors. The Oncologist. 2011; 16: 1614-1625.

Binimetinib (Mektovi®) 2018

Pharmacology review section of the FDA Approval Package for binimetinib (Mektovi). NDA 21-0498. June 2018.

Bollag et al 1991

Bollag G, McCormick F. Differential regulation of rasGAP and neurofibromatosis gene product activities. Nature 1991;351: 576-9.

Brown et al 2005

Brown AP, Courtney CL, King LM, Groom SC, Graziano MJ. Cartilage dysplasia tissue mineralization in the rat following administration of a FGF receptor tyrosine kinase inhibitor. Toxicology Pathology 2005; 33: 449-55.

Brown 2010

Brown AP. Development of serum calcium and phosphorous as clinical biomarkers for drug-induced systemic mineralization: Case study with a MEK inhibitor. Biomarkers in Drug Development, 1st ed; 301-22.

Caunt et al 2015

Caunt CJ, Sale MJ, Smith PD, Cook SJ. MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. Nat Rev Cancer Oct 2015;15(10):577-92.

Cobimetinib (Cotellic®) 2015

Pharmacology review section of the FDA Approval Package for cobimetinib (Cotellic). NDA 20-6192 October. 2015.

Davies et al 2007

Davies B, Logie A, McKay J, Martin P, Steele S, Jenkins R, et al. AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-related kinase kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. Mol Cancer Ther 2007; 6:2209-19.

Dombi et al 2016

Dombi E, Baldwin A, Marcus LJ, Fisher MJ, Weiss B, Kim A, et al. Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1-Related Plexiform Neurofibromas. N Engl J Med 2016 Dec 29;375(26):2550-60.

Dry et al 2010

Dry JR, Pavey S, Pratilas CA, Harbron C, Runswick S, Hodgson D, et al. Transcriptional pathway signatures predict MEK addiction and response to selumetinib (AZD6244). Cancer Res 2010;70(6):2264-73. Epub 2010 Mar 9. PMID: 20215513.

EMA 2012

Guideline on the investigation of drug interactions (CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr.*) 2012.

FDA 2017

Guidance for industry. Drug interaction studies – study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations 2017.

Hall et al 2006

Hall, AP, Westwood R, and Wadsworth PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. Toxicologic Pathology (2006); 34: 131-147.

Hirbe et al 2016

Hirbe AC, Dahiya S, Friedmann-Morvinski D, Verma IM, Clapp DW, Gutmann DH. Spatially- and temporally-controlled postnatal p53 knockdown cooperates with embryonic Schwann cell precursor Nf1 gene loss to promote malignant peripheral nerve sheath tumor formation. Oncotarget 2016;7(7):7403-14.

Horne et al 2003

Horne MM, Guadagno TM. A requirement for MAP Kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. J Cell Biology 2003; 161: 1021-28.

ICH S7A

ICH Harmonised Tripartite Guideline S7A. Guideline on Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals. 2001. Available from: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf

ICH S7B

ICH Harmonised Tripartite Guideline S7B. The Non-Clinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarisation (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals. 2005. Available from: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf

Jessen et al 2013

Jessen WJ, Miller SJ, Jousma E, Wu J, Rizvi TA, Brundage ME, et al. MEK inhibition exhibits efficacy in human and mouse neurofibromatosis tumors. J Clin Invest 2013;123(1):340-7.

Kim et al 1995

Kim HA, Rosenbaum T, Marchionni MA, Ratner N, DeClue JE. Schwann cells from neurofibromin deficient mice exhibit activation of p21ras, inhibition of cell proliferation and morphological changes. Oncogene 1995;11(2):325-35.

Korf 1999

Korf BR. Plexiform neurofibromas. Am J Med Genet 1999;89(1):31-7.

Luffer-Atlas et al 2017

Luffer-Atlas D, Atrakchi A, A decade of drug metabolite safety testing, industry and regulatory shared learning, Expert opinion on drug metabolism & toxicology; 2017; 13(9):897-900.

Lyssikatos 2006

Lyssikatos J. AZD6244 (ARRY-142886), A Novel and Highly Selective MEK Inhibitior in Clinical Trials. American Association of Cancer Research, 97th Annual Meeting 2006, New Drugs on the Horizon Special Symposium.

Martin et al 1990

Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Crosier WJ, Haubruck H, et al. The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. Cell 1990;63:843-9.

Matsushita et al 2012

Matsushita T, and Murakami S. The ERK MAPK Pathway in Bone and Cartilage Formation. In Protein Kinases, (Gabriela Da Silva Xavier, Eds.), pp.380-400. InTech, Rijeka, Croatia. 2012.

Mautner et al 2008

Mautner VF, Asuagbor FA, Dombi E, Fünsterer C, Kluwe L, Wenzel R, et al. Assessment of benign tumor burden by whole-body MRI in patients with neurofibromatosis 1. Neuro Oncol 2008;10(4):593-8.

Mektovi® (Binimetinib) 2018

Nonclinical assessment report. Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP). EMA assessment report, 2018; EMA Procedure No. EMEA/H/C/004579/0000; EMA/CHMP/554701/2018. July 2018

MHLW 2018

「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」厚生労働省医薬食品局審査管理課（薬生薬審発 0723 第 4 号、平成 30 年 7 月 23 日）Available from: https://www.pmda.go.jp/files/000225191.pdf

Ohren et al 2004

Ohren JF, Chen H, Pavlovsky A, Whitehead C, Zhang E, Kuffa P, et al. Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. Nat Struct Mol Biol 2004;11(12):1192-7. Epub 2004 Nov 14. Erratum in: Nat Struct Mol Biol Mar 2005;12(3):278.

Osaki et al 2013

Osaki L, Gama P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 10143-61.

Patyna et al 2008

Patyna S, Arrigoni G, Terron A, Kim T, Heward J, Vonderfecht S, et al. Nonclinical safety evaluation of sunitinib: A potent inhibitor of VEGF, PDGF, KIT, FLT3 and RET receptors. Toxicol Pathol. 2008; 36: 905-16.

Pemov et al 2017

Pemov A, Li H, Patidar R, Hansen NF, Sindiri S, Hartley SW, et al. The primacy of NF1 loss as the driver of tumorigenesis in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. Oncogene 2017;36(22):3168-77.

Robertson et al 2012

Robertson KA, Nalepa G, Yang FC, Bowers DC, Ho CY, Hutchins GD, et al. Imatinib mesylate for plexiform neurofibromas in patients with neurofibromatosis type 1: a phase2 trial. Lancet Oncol 2012;13(12):1218-24.

Ryan et al 1999

Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicologic Pathology. 1999; 27: 78-86.

Serra et al 2000

Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, et al. Schwann cells harbor the somatic *NF1* mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell populations. Human Molecular Genetics 2000;9,3055-64.

Sherman et al 2000

Sherman LS, Atit R, Rosenbaum T, Cox AD, Ratner N. Single cell Ras-GTP analysis reveals altered Ras activity in a subpopulation of neurofibroma Schwann cells but not fibroblasts. J Biol Chem 2000;275(39):30740-5.

Skett 1988

Skett P. Bioschemical basis of sex differences in drug metabolism. Pharma Ther 1988; 38(3): 269-304.

Stella et al 2008

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. Toxicologic Pathology. 2008; 36: 30-42.

Takahashi et al 2015

Takahashi RH, Ma S, Robinson SJ, Yue Q, Choo EF, Khojasteh SC. Elucidating the mechanisms of formation of two unusual cytochrome P450-mediated fused ring metabolites of GDC-0623, a MAPK/ERK kinase inhibitor. Drug Metab Dispos 2015; 43(12): 1929-33.

Trametinib (Mekinist®) 2013

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for trametinib NDA 20-4114. May 2013.

U.S. Patent No. 7,425,637 B2

N3 alkylated benzimidazole derivatives as MEK inhibitors. U.S. Patent No. 7,425,637 B2

Wallace et al 2005

Wallace EM, Lyssikatos JP, Yeh T, Winkler JD, Koch K. Progress towards therapeutic small molecule MEK inhibitors for use in cancer therapy. Curr Top Med Chem 2005;5(2):215-29.

Waxman and Holloway 2009

Waxman DJ and Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. Mol Pharmacol. 2009; 76(2): 215-28.

Wedge et al 2005

Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. AZD2171: A highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. Cancer Res. 2005; 65 (10): 4389-400.

Weiss et al 2014

Weiss B, Widemann BC, Wolters P, Dombi E, Vinks A, Cantor A, et al. Sirolimus for progressive neurofibromatosis type 1–associated plexiform neurofibromas: a Neurofibromatosis Clinical Trials Consortium phase II study. Pediatr Blood Cancer 2014;61(6):982-6.

Weiss et al 2015

Weiss B, Widemann BC, Wolters P, Dombi E, Vinks A, Cantor A, et al. Sirolimus for progressive neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas: a neurofibromatosis Clinical Trials Consortium phase II study. Neuro Oncol 2015;17(4):596-603.

Welsh et al 2015

Welsh SJ, Corrie PG. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma Ther Adv Med Oncol 2015; 7(2): 122-36.

Wu et al 2008

Wu J, Williams JP, Rizvi TA, Kordich JJ, Wittle D, Meijer D, et al. Plexiform and dermal neurofibromas and pigmentation are caused by Nf1 loss in Desert hedgehog-expressing cells. Cancer Cell 2008;13(2):105-16.

Wu et al 2012

Wu J, Dombi E, Jousma E, Soctt Dunn R, Lindquist D, Schnell BM, et al. Preclinical testing of sorafenib and RAD001 in the Nf(flox/flox);DhhCre mouse model of plexiform neurofibroma using magnetic resonance imaging. Pediatr Blood Cancer 2012 Feb;58(2):173-80.

Xu et al 1990

Xu GF, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, et al. The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. Cell 1990;62,599-608.

Yamada et al 1997

Yamada M, Espinosa-Aguirre J, Watanabe M, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T. Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. Mutat Res. 1997; 375: 9-17.

Yang et al 2008

Yang FC, Ingram DA, Chen S, Zhu Y, Yuan J, Li X, et al. NF1-dependent tumours require a microenvironment containing NF1+/- and c-kit-dependent bone marrow. Cell 2008;135(3):437-48.

Yeh et al 2007

Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, et al. Biological characterization of ARRY-142886 (selumetinib), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. Clin Cancer Res 2007;13(5):1576-83.

Zheng et al 1993

Zheng CF, Guan KL. Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. J Biol Chem 1993;268(15):11435-9.