第 2 部　CTD の概要

一般名：セルメチニブ硫酸塩

版番号：[redacted]

2.6.1　緒言
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 3
2.6.1.1　緒言 4
2.6.1.1.1　効能・効果（案）及び用法・用量（案） 5
2.6.1.1.1.1　効能又は効果（案） 5
2.6.1.1.1.2　用法及び用量（案） 6
2.6.1.2　参考文献 6

表目次

表 1　セルメチニブの分子量 5

図目次

図 1　セルメチニブ硫酸塩の化学構造式 5

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
ATP	Adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
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
GTP	Guanosine-5'-triphosphate：グアノシン-5'-三リン酸
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
NF1	Neurofibromatosis type 1：神経線維腫症 1 型
PN	Plexiform neurofibroma：叢状神経線維腫
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

2.6.1.1　緒言

セルメチニブ（旧名：AZD6244、ARRY-142886 及び AZ12252244）は、経口投与可能な、アデノシン三リン酸（ATP）と競合しない、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（MEK1/2）阻害薬である。本申請は、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）患者に対する経口治療薬としてセルメチニブの承認を求めるものである。

MEK1/2 は RAS により調節される RAF/MEK/ERK 経路の重要要素であり（Caunt et al 2015）、ヒト腫瘍において高い頻度で活性化されている。RAF/MEK/ERK 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、サイトカイン受容体等、種々のタイプの受容体により活性化される。MEK1/2 は二重特異的キナーゼであり、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、これらのキナーゼの保存スレオニン及びチロシン残基をリン酸化することで ERK1/2 を活性化する。MEK1 及び MEK2 は高いアミノ酸相同性（79%）を示し、どちらも等しくその基質である ERK1/2 をリン酸化し活性化できると考えられている（Zheng et al 1993、Ohren et al 2004）。MEK1/2 は ERK1/2 に対してのみ基質特異性を示すが、反対に数百種類のタンパク質が ERK の基質として同定されており、RAF/MEK/ERK 経路が腫瘍細胞の増殖や生存等、多くの細胞過程に影響を及ぼすのはこのためと考えられる（Caunt et al 2015）。したがって、MEK を阻害すれば、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可能である。

NF1 は常染色体優性遺伝疾患であり、腫瘍抑制遺伝子 *NF1*（17q11.2）の生殖細胞系列変異により生じるが、まれに 17q11 の微小欠失によっても生じる（症例の 5%のみ）。この原因遺伝子 *NF1* は腫瘍抑制タンパク質であるニューロフィブロミン 1 をコードする。NF1 患者は中枢及び末梢神経系に腫瘍が生じるリスクが高く、最も多いのは PN であり、患者の約 20%～50%に認められる（Korf 1999、Mautner et al 2008）。腫瘍抑制遺伝子 *NF1* にコードされるニューロフィブロミン 1 は GAP（GTPase 活性化タンパク質）関連領域（GAD）を含むが、この領域の正常な機能はその GTPase 活性を増強することで RAS の不活性化を促進することである（Bollag et al 1991、Ballester et al 1990、Martin et al 1990、Xu et al 1990）。全ての神経線維腫において、神経のシュワン細胞に *NF1* 遺伝子の両アレル変異が認められる（Serra et al 2000）。神経線維腫から急性的に培養した神経線維肉腫及びシュワン細胞は、Ras-GTP レベルの増加を示す（Basu et al 1992、Sherman et al 2000、Kim et al 1995）。ヒト神経線維腫及びマウス神経線維腫モデルから採取した組織切片では、正常な神経組織と比べて、神経線維腫における p-ERK が高値で検出される（Jessen et al 2013）。これらが意味するのは、NF1 機能が喪失すると、RAS が GTP と結合して活性型となり、その結果、RAF/MEK/ERK 経路が活性化され、良性腫瘍や悪性腫瘍等、種々のタイプの腫瘍の発生や成長持続の原因となるということである。RAF/MEK/ERK 経路を阻害するセルメチニブ等の MEK1/2 阻害薬は、NF1 機能の喪失により生じた RAF/MEK/ERK 経路の活性化により生じる腫瘍細胞の増殖及び成長を抑制すると期待される。したがって、MEK1/2 阻害は、RAF/MEK/ERK 経路のシグナル伝達が活性化されている PN 等の腫瘍において有望な治療法となる可能性がある。

セルメチニブは Array BioPharma 社により創製され、化学名は 5-[(4-bromo-2-chlorophenyl)amino]-4-fluoro-6-[(2-hydroxyethoxy)carbamoyl]-1-methyl-1*H*-benzimidazol-3-ium であり、硫酸塩として処方される。セルメチニブは ATP と競合しない強力かつ選択的な、MEK1 及び MEK2（MAP2K1 及び MAP2K2）の阻害薬である（Yeh et al 2007）。ヒト *NF1* の遺伝子型及び表現型を忠実に再現する神経線維腫が発生する遺伝子改変マウス NF1 モデルにおいて、セルメチニブの経口投与は ERK のリン酸化を阻害し、神経線維腫の腫瘍量、増殖、数及び成長を抑制した（Dombi et al 2016）。

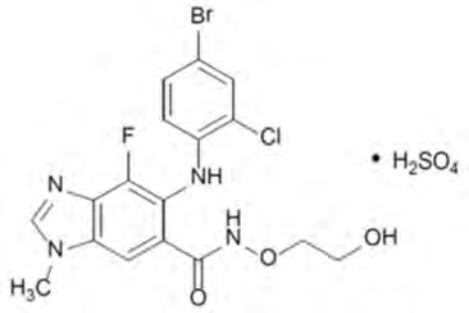
動物を用いた非臨床試験で、セルメチニブの 2 種類の微量代謝物（血漿中の総薬物濃度の 10%未満）、N-脱メチル体（AZ12442942）及びアミド体（AZ12791138）が検出された。N-脱メチル体の薬理活性はセルメチニブの約 3～5 倍高く、この代謝物はマウスで検出されたが（親化合物の最高約 14%の AUC）、ラット及びサルでは意味のある水準で検出されなかった。アミド体の薬理活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下であり、この代謝物はマウス、ラット及びサルで検出された。患者での N-脱メチル体濃度は当初不明で、活性代謝物でもあるため、非臨床安全性試験では N-脱メチル体の全身曝露量をモニタリングした。ヒト血漿中及び尿中に最も多く存在するセルメチニブの代謝物は、O-グルクロン酸抱合体である M2（別名 AZ14216282）であった。M2 は血漿中の総放射能の約 22%及び尿中の総放射能の約 10%を占めた。この主要代謝物 M2 が MEK に及ぼす阻害作用を生化学的アッセイ及び細胞アッセイで評価した。いずれのアッセイでも、M2 は 10 µmol/L までの濃度で MEK を阻害しなかった。

非臨床試験の概要文では、非臨床薬理試験、安全性薬理試験、毒性試験、薬物動態試験及び薬物代謝試験から得られた主要な結果について記載している（非臨床試験の概要文 2.6.2 項、2.6.4 項及び 2.6.6 項を参照）。

表 1　　セルメチニブの分子量

一般名 (JAN)	分子式	分子量
セルメチニブ硫酸塩（Selumetinib Sulfate）	$C_{17}H_{15}BrClFN_4O_3 \cdot H_2SO_4$	555.76

図 1　　セルメチニブ硫酸塩の化学構造式



2.6.1.1.1　効能・効果（案）及び用法・用量（案）

本剤の本邦での医薬品製造販売承認申請における効能・効果（案）及び用法・用量（案）は以下のとおりである。

2.6.1.1.1.1　効能又は効果（案）

叢状神経線維腫（plexiform neurofibromas）を伴う神経線維腫症 1 型

2.6.1.1.1.2 用法及び用量（案）

通常、セルメチニブとして 1 回 25 mg/m^2（体表面積）を、1 日 2 回、12 時間毎を目安として空腹時に経口投与する。用量は体表面積に応じて調整し、1 回量は 50 mg を上限とする。

2.6.1.2 参考文献

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.

Bollag et al 1991

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

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 2015;15(10):577-92.

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;375(26):2550-60.

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.

Martin et al 1990

Martin GA, Viskoohil 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.

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.

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 2005;12(3):278.

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.

Xu et al 1990

Xu G, 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.

Yeh et al 2007

Yeh TC, Marsh V, Bernat BA, Ballard J, Colwell H, Evans RJ, et al.　Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), 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.

第 2 部　CTD の概要

一般名：セルメチニブ硫酸塩

版番号：[redacted]

2.6.2　薬理試験の概要文
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 5
2.6.2.1　まとめ 7
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 10
2.6.2.2.1　背景 10
2.6.2.2.2　*In vitro* 試験 11
2.6.2.2.2.1　MEK1/2 の選択的阻害（試験 Pharmacology Report 01、45、46 及び 56） 11
2.6.2.2.2.2　培養細胞における MEK1/2 活性の選択的阻害（試験 Pharmacology Report 02） 12
2.6.2.2.2.3　腫瘍細胞の成長阻害（試験 Pharmacology Report 35） 13
2.6.2.2.2.4　セルメチニブの代謝物 N-脱メチル体の *in vitro* 評価（試験 Pharmacology Report 05、06 及び 07） 14
2.6.2.2.2.5　セルメチニブアミド体の *in vitro* 評価（試験 Pharmacology Report 08） 16
2.6.2.2.2.6　セルメチニブ及び代謝物 M2（AZ14216282）による MAP2K1 阻害（[γ-^{33}P]ATP を用いた放射測定アッセイ）（試験 Pharmacology Report 56） 16
2.6.2.2.2.7　セルメチニブ及び代謝物 M2 による腫瘍細胞株での ERK リン酸化阻害（試験 Pharmacology Report 57） 17
2.6.2.2.3　*In vivo* 試験 18
2.6.2.2.3.1　腫瘍増殖抑制作用：ヒト Calu-6 非小細胞肺癌異種移植モデルにおける用量反応関係（試験 Pharmacology Report 09 及び 10） 18
2.6.2.2.3.2　*In vivo* 薬力学試験（試験 Pharmacology Report Report 12 及び 47） 19
2.6.2.2.3.3　遺伝子改変マウス神経線維腫モデルを用いたセルメチニブの薬効評価 21
2.6.2.2.3.3.1　神経線維腫 *Nf1$^{fl/fl}$;DhhCre* マウスモデルを用いたセルメチニブの薬効評価（試験 Pharmacology Report 54） 21
2.6.2.2.3.3.2　神経線維腫 *Nf1$^{flox/flox}$;Postn Cre* マウスモデルを用いたセルメチニブの薬効評価（試験 Pharmacology Report 55） 24
2.6.2.3　副次的薬理試験 27
2.6.2.3.1　放射性リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイによる選択性スクリーニング（試験 0320SY） 27
2.6.2.4　安全性薬理試験 27
2.6.2.4.1　中枢神経系 31
2.6.2.4.1.1　ラットを用いた Irwin 法によるスクリーニング試験（試験 1758/ARR/03） 31
2.6.2.4.2　心血管系 31
2.6.2.4.2.1　hERG カリウムチャネルにおける活性（試験 030819.BCP 及び 0179SZ） 31
2.6.2.4.2.2　Göttingen ミニブタを用いたテレメトリー試験（試験 1759/ARR/03） 31
2.6.2.4.3　呼吸器系 32
2.6.2.4.3.1　ラットを用いた呼吸機能試験（試験 1760/ARR/03） 32
2.6.2.4.4　消化器系 32
2.6.2.4.4.1　ラットの消化管運動性（試験 1761/ARR/03） 32

2.6.2.4.4.2　ラットにおける胃の刺激性変化（試験 1762/ARR/03）..... 33
2.6.2.4.4.3　ラットの胃液分泌（試験 1763/ARR/03）..... 33
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験..... 33
2.6.2.6　考察及び結論..... 33
2.6.2.6.1　効力を裏付ける試験..... 33
2.6.2.6.2　副次的薬理試験及び安全性薬理試験..... 34
2.6.2.7　図表..... 35
2.6.2.8　参考文献..... 35

表目次

表 1　セルメチニブの薬理試験..... 8
表 2　セルメチニブ、N-脱メチル体及びアミド体の活性（ヒト MAP2K1-MAPK1 アッセイ）..... 11
表 3　セルメチニブによる MEK1 及び MEK2 の酵素活性の *in vitro* 阻害..... 12
表 4　腫瘍細胞株における ERK1 及び 2 のリン酸化に対するセルメチニブの阻害活性..... 13
表 5　腫瘍細胞株におけるセルメチニブ及び N-脱メチル体による ERK リン酸化阻害作用..... 15
表 6　セルメチニブ及び N-脱メチル体による細胞生存の抑制..... 15
表 7　全血法：セルメチニブ及び N-脱メチル体による TPA-刺激 ERK リン酸化阻害..... 15
表 8　セルメチニブ及びセルメチニブアミド体による ERK リン酸化の阻害（腫瘍細胞株を用いた細胞アッセイ）..... 16
表 9　腫瘍増殖の抑制：ヒト Calu-6 非小細胞肺癌異種移植モデルにおける用量反応関係..... 19
表 10　腫瘍容積変化に関する統計解析..... 23
表 11　安全性薬理評価項目を補足説明するために引用したセルメチニブの毒性試験一覧..... 29
表 12　Göttingen ミニブタを用いたテレメトリー試験での投与デザイン..... 32

図目次

図 1　数種のセルメチニブ濃度（nM: nmol/L）での ATP 濃度（μM: μmol/L）と速度（CPM/min）との関係..... 12
図 2　ヒト腫瘍由来細胞株パネルにおける細胞生存の抑制..... 14
図 3　セルメチニブ及び代謝物 M2 による MAP2K1 阻害..... 16

図 4　セルメチニブ又は代謝物 M2 で処理した腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害を示すウエスタンブロット 17
図 5　セルメチニブ又は代謝物 M2 で処理した腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害を示すウエスタンブロットの定量化 18
図 6　ヒト Calu-6 肺癌異種移植モデルにセルメチニブ a) 25 mg/kg 又は b) 0.75 mg/kg を単回投与したときの ERK リン酸化阻害作用 20
図 7　Calu-6 腫瘍モデルにセルメチニブを単回投与したときの用量及び時間依存的な ERK リン酸化阻害作用 21
図 8　*Nf1*$^{fl/fl}$*;DhhCre* マウスにおける神経線維腫の腫瘍容積の解析（セルメチニブ 10 mg/kg を 1 日 2 回、1 週間に 5 日間強制経口投与［5 日間投与+2 日間休薬］×8 週間） 22
図 9　神経線維腫組織における増殖マーカーKi67 及びアポトーシスマーカーcleaved caspase-3（CC3^{+}）の免疫組織化学染色による解析 23
図 10　セルメチニブ 10 mg/kg 単回経口投与後にみられた神経線維腫組織内における ERK リン酸化阻害作用 24
図 11　*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスにおける近位神経根の容積及び腫瘍数に対するセルメチニブの効果 25
図 12　*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスの神経線維腫組織における ERK リン酸化の阻害（ウエスタンブロット法）[1] 26
図 13　*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスの神経線維腫組織における ERK リン酸化の阻害（免疫組織化学染色法）[1] 26

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
ATP	Adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	Area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度－時間曲線下面積
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
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
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose：ヒドロキシプロピルメチルセルロース
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
IHC	Immunohistochemistry：免疫組織化学染色；
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
LDH	Lactate dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
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
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) Assay
M2	Metabolite 2（AZ14216282）：代謝物 M2（AZ14216282）
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
NOEL	No observable effect level：無作用量
p-ERK	Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase：リン酸化細胞外シグナル制御キナーゼ
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
QTc	補正 QT 間隔；Corrected QT interval
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

略語及び専門用語	用語の説明
SD	Standard deviation：標準偏差
SE	Standard error：標準誤差
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate：ホルボールエステル

2.6.2.1　まとめ

セルメチニブ（旧名：AZD6244、ARRY-142886 及び AZ12252244）は、経口投与可能な、アデノシン三リン酸（ATP）と競合しない、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（MEK1/2）阻害薬である。セルメチニブの薬効薬理、副次的薬理及び安全性薬理を特徴付けるようデザインした包括的な *in vitro* 及び *in vivo* 試験でセルメチニブを評価した。非臨床 *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験（特記しない限り、セルメチニブの遊離塩基を用いて実施）では、酵素阻害アッセイ及び腫瘍細胞株において、強力な MEK1/2 阻害作用が示された。*In vivo* ヒト腫瘍異種移植モデルでは、MEK 及び腫瘍増殖に対する用量依存的な阻害作用が示された。神経線維腫 1 型（NF1）の非臨床モデルでセルメチニブの効果が認められ、神経線維腫の腫瘍容積、増殖、数及び成長を抑制した。セルメチニブ遊離塩基の活性を一連の *in vivo* 安全性薬理試験で検討し、心血管系、呼吸器系、中枢神経系及び消化器系機能への影響を評価した。セルメチニブ及び N-脱メチル体（旧名：AZ12442942）についても、hERG 及び一連の副次的薬理標的に対する阻害作用を *in vitro* で評価した。非臨床薬理評価プログラムで明らかになった主な知見は以下のとおりである。

- 酵素アッセイにおいて、セルメチニブは強力な MEK1 阻害薬として作用し、ATP と競合しなかった。変異により活性化された MEK1 に対する IC_{50} 値は 15.3 nmol/L であった。野生型の活性化 MEK1 及び MEK2 を用いた場合には、セルメチニブは MEK の両アイソフォームに対しても同程度の阻害作用を示し、IC_{50} 値は 200～400 nmol/L の範囲であった。MEK に対する阻害作用とは対照的に、セルメチニブは濃度 10 µmol/L でのスクリーニング試験において、他のキナーゼに対し、全く阻害作用を示さないか、極微の阻害作用しか示さなかった。
- 作用機序を検討する細胞アッセイでは、セルメチニブは ERK1/2 のリン酸化を阻害し、評価した多くの腫瘍細胞において IC_{50} 値は 10 nmol/L 未満であったが、ERK5、mTOR、jnk 又は p38 キナーゼを介した他の細胞内シグナル伝達は阻害しなかった。
- 種々の腫瘍細胞株を用いた細胞増殖アッセイでは、セルメチニブは全てではないが多くの細胞株で、生存細胞数を減少させた。細胞生存阻害作用の IC_{50} 値は、10 nmol/L 未満から 10 µmol/L 超の範囲であった。感受性株（IC_{50} 値：1 µmol/L 未満）に分類された細胞株のほとんどは、*BRAF* 又は *KRAS* 遺伝子変異を保有していた。
- *In vivo* 薬理試験では、担癌動物においてセルメチニブの用量依存的な阻害作用が認められた。ヒト Calu-6 肺癌異種移植モデルにおいて、セルメチニブの最小有効投与量は 0.75 mg/kg の 1 日 2 回投与（BID）であった。
- ヒト Calu-6 肺癌異種移植モデルを用いた *in vivo* 薬力学試験では、患者で認められた曝露量範囲をカバーする用量範囲でセルメチニブを単回経口投与したとき、用量依存的かつ時間依存的な ERK1/2 リン酸化阻害作用が認められた。
- セルメチニブの活性代謝物として、N-脱メチル体（AZ12442942）及びアミド体（AZ12791138）の 2 種が同定された。酵素アッセイでは、変異により活性化された MEK1 に対するそれぞれの IC_{50} 値は、7 nmol/L 及び 272 nmol/L であった。薬理活性を細胞 ERK1/2 リン酸化阻害アッセイで評価したところ、N-脱メチル体はセルメチニブよりも 3～5 倍高い活性を示した。一方、アミド体の活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下であり、生物学的活性に意味のある寄与をしないと考えられた。セルメチニブを投与したマウスにおいて、N-脱メチル体の血漿中濃度は最高でも親化合物の 14%であった（試験 KPM017）。

- ヒト血漿中及び尿中に認められたセルメチニブの主要代謝物 M2（別名：AZ14216282）の MEK 阻害能を、生化学的アッセイ及び細胞アッセイにより評価した。いずれの試験でも AZ14216282 は 10 μmol/L までの濃度で活性を示さなかった。
- シュワン細胞特異的に *NF1* 遺伝子を欠失させた 2 種類の遺伝子改変 NF1 マウスモデルを用いてセルメチニブを評価した。これらのモデルは複数の神経線維腫を発症し、ヒトでの NF1 の遺伝子型と表現型を再現している。セルメチニブの経口投与により神経線維腫において MEK が阻害され、モデルによって腫瘍の数、成長、容積及び増殖が抑制されるが示された。
- 副次的薬理作用を検討する放射性リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイにおいて、セルメチニブ又は N-脱メチル体のヒトの治療における血漿中濃度に相当する濃度で薬理学的に意味のある標的は特定されなかった。両化合物とも、hERG に対して活性を示さなかった。
- ラットにセルメチニブ 30 mg/kg 又は 100 mg/kg を単回経口投与すると、胃に刺激性変化が認められた。呼吸器系への影響を評価するラット単回投与試験では、100 mg/kg の投与で気道抵抗の軽度の増加が認められた。
- ラットを用いた Irwin 法による評価及びミニブタを用いた心血管系試験では、セルメチニブによる影響は認められなかった。

これらの薬理試験の結果は、セルメチニブが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）患者の治療薬として使用可能であることを裏付けるものと考えられる。

実施した試験の一覧を表 1 に示した。

表 1　　セルメチニブの薬理試験

Type of study	Test system	Method of administration	Study Number	GLP
Primary pharmacodynamics				
Kinase selectivity in biochemical enzyme assays	AZD6244 tested against a panel of kinases deriving either an IC_{50} or single data point at 10 μmol/L AZD6244	*In vitro*	Pharmacology Report 01	No
Selective inhibition of MEK1/2 by selumetinib in cultured tumours cells by measurement of ERK phosphorylation	A panel of tumour cell lines, ERK phosphorylation measured by a PACE assay (Probe Assay - Chemiluminescence Enhanced). Pathway selectivity measure in cultured cells by western blot assays	*In vitro*	Pharmacology Report 02	No
Inhibition of MEK1/2 by the N-desmethyl metabolite of selumetinib in cultured tumours cells by measurement of ERK phosphorylation	A panel of tumour cell lines, ERK phosphorylation measured by a PACE assay (Probe Assay - Chemiluminescence Enhanced)	*In vitro*	Pharmacology Report 05	No
Inhibition of tumour cell viability by the N-desmethyl metabolite of selumetinib	A panel of tumour cell lines. Viable cell number was determined using the MTS proliferation assay	*In vitro*	Pharmacology Report 06	No

Type of study	Test system	Method of administration	Study Number	GLP
Inhibition of phorbol ester (TPA) stimulated Erk phosphorylation in whole blood *in vitro* by selumetinib and metabolite, N-desmethyl selumetinib	Human whole blood derived leucocytes. ERK phosphorylation measured by flow cytometry assay	*In vitro*	Pharmacology Report 07	No
Inhibition of MEK1/2 in tumour cell lines by selumetinib and the amide metabolite of Selumetinib by Erk phosphorylation	A panel of tumour cell lines, ERK phosphorylation measured by a PACE assay (Probe Assay — Chemiluminescence Enhanced)	*In vitro*	Pharmacology Report 08	No
In vitro inhibition of MEK1 (MAPK2K1) enzyme by the M2 metabolite of Selumetinib. ATP competition assessment	Human recombinant MEK1 enzyme [γ-33P] ATP -Based Radiometric Assay	*In vitro*	Pharmacology Report 56 amendment	No
Inhibition of MEK1/2 by the M2 metabolite of selumetinib in cultured tumours cells by measurement of ERK phosphorylation	Tumour cell lines. Quantitative western blotting	*In vitro*	Pharmacology Report 57	No
Inhibition of the growth of human lung Calu-6 xenograft tumours. Dose response	Calu-6 human tumour xenograft	*In vivo*	Pharmacology Report 09	No
Inhibition of the growth of human lung Calu-6 xenograft tumours. Dose response	Calu-6 human tumour xenograft	*In vivo*	Pharmacology Report 10	No
Inhibition of MEK1/2 *in vivo* in human lung Calu-6 xenograft tumours by measurement of ERK phosphorylation	Calu-6 human tumour xenograft. ERK phosphorylation measured by western blot and immunohistochemistry.　Plasma drug concentration determination	*In vivo*	Pharmacology Report 12	No
Inhibition of tumour cell viability by selumetinib	A panel of human tumour cell lines. Viable cell number was determined using the MTS Colorimetric Assay	*In vitro*	Pharmacology Report 35	No
In vitro inhibition of MEK1/2 enzyme by selumetinib	Recombinant MEK1/2 enzyme FRET-Based Z'-Lyte Kinase Activity Assays	*In vitro*	Pharmacology Report 45	No
In vitro inhibition of MEK1/2 enzyme by selumetinib	Recombinant MEK1/2 enzyme radiometric kinase assays	*In vitro*	Pharmacology Report 46	No
Inhibition of MEK1/2 *in vivo* in human lung Calu-6 xenograft tumours by measurement of ERK phosphorylation	Calu-6 human tumour xenograft. ERK phosphorylation measured by western blot.　Plasma drug concentration determination	*In vivo*	Pharmacology Report 47	No

Type of study	Test system	Method of administration	Study Number	GLP
Evaluation of the effects of Selumetinib in the *Nf1fl/fl;DhhCre* mouse model of neurofibroma. Assessment of the effect of selumetinib on tumour growth and MEK inhibition	Genetically modified model of NF1 related neurofibroma. ERK phosphorylation measured by western blot	*In vivo*	Pharmacology Report 54	No
Evaluation of the effects of Selumetinib in the *Nf1*$^{flox/flox}$;*Postn-Cre* mouse model of neurofibroma	Genetically modified model of NF1 related neurofibroma. ERK phosphorylation measured by western blot and immunohistochemistry	*In vivo*	Pharmacology Report 55	No
In vitro inhibition of MEK1 (MAPK2K1) enzyme by Selumetinib. ATP competition assessment	Human recombinant MEK1 enzyme [γ-^{33}P] ATP -Based Radiometric Assay	*In vitro*	Pharmacology Report 56	No
Secondary pharmacodynamics				
Radioligand binding and enzyme assays	Receptors, enzymes, ion channels and transporters	*In vitro*	0320SY**	No
Safety pharmacology				
Nervous System	Conscious rat	*In vivo*, oral	1758/ARR/03	Yes*
Cardiovascular System	hERG ion channel	*In vitro*	030819.BCP	Yes*
Cardiovascular System	hERG ion channel	*In vitro*	0179SZ***	No
Cardiovascular System	Conscious minipig telemetry	*In vivo*, oral	1759/ARR/03	Yes*
Respiratory System	Anaesthetised rat	*In vivo*, oral	1760/ARR/03	Yes*
Gastrointestinal System	Conscious and anaesthetised rat	*In vivo*, oral	1761/ARR/03, 1762/ARR/03, 1763/ARR/03	Yes*

*Pivotal nonclinical safety studies were conducted in OECD member countries and in accordance with OECD Test Guidelines and Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and relevant International Conference on Harmonisation guidelines.　**Study conducted with both selumetinib and N-desmethyl selumetinib.　***Study conducted with N-desmethyl selumetinib.

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　背景

セルメチニブは、経口投与可能な、ATP と競合しない、強力かつ選択的な MEK1/2 阻害薬である。MEK1/2 は *RAS* により調節される RAF/MEK/ERK 経路の重要要素であり（Caunt et al 2015）、ヒト腫瘍において高い頻度で活性化されている。RAF/MEK/ERK 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、サイトカイン受容体等、種々のタイプの受容体により活性化される。MEK1/2 は二重特異的キナーゼであり、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、これらのキナーゼが持つ保存スレオニン及びチロシン残基をリン酸化することで ERK1/2 を活性化する。MEK1 及び MEK2 は高いアミノ酸相同性（79%）を示し、どちらも等しくその基質である ERK1/2 をリン酸化し活性化できると考えられている（Zheng et al 1993、Ohren et al 2004）。MEK1/2 は ERK1/2 に対してのみ基質特異性を示すのに対して、ERK

の基質として数百種類のタンパク質が同定されており、RAF/MEK/ERK 経路が腫瘍細胞の増殖や生存等、多くの細胞過程に影響を及ぼすのはこのためと考えられる（Caunt et al 2015）。したがって、MEK を阻害すれば、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可能である。本申請に特に関連することとして、NF1 の原因となる遺伝子変異は、タンパク質ニューロフィブロミン 1 をコードしている腫瘍抑制遺伝子 *NF1* の変異又は微小欠失である。ニューロフィブロミン 1 は GAP（GTPase 活性化タンパク質）関連領域（GAD）を含み、この領域の正常な機能は、その GTPase 活性を増強することを介して RAS の不活性化を促進することである（Bollag et al 1991、Ballester et al 1990、Martin et al 1990、Xu et al 1990）。結果的に RAF/MEK/ERK 経路が活性化されることが、セルメチニブを申請適応症の治療に使用する根拠である。

2.6.2.2.2　*In vitro* 試験

2.6.2.2.2.1　MEK1/2 の選択的阻害（試験 Pharmacology Report 01、45、46 及び 56）

一連の生化学的試験で、MEK1/2 及び他のキナーゼパネルに対するセルメチニブの活性及び特異性について検討した。酵素アッセイでは、セルメチニブは単離された変異 MEK が ERK2 をリン酸化する活性を阻害し、IC_{50} 値は 15.3 nmol/L であった。この生化学的 MEK1 酵素アッセイでは、セルメチニブの 2 種類の代謝物である N-脱メチル体及びアミド体の IC_{50} 値は、それぞれ 7 nmol/L 及び 272 nmol/L であった（表 2）。このアッセイに用いた変異 MEK1 タンパク質は、野生型 MEK1 と異なり、制御ループにおける 218 位と 222 位のセリンはいずれもアスパラギン酸に置換されている。この酵素アッセイで観察されたセルメチニブの活性は、培養細胞中で観察された MEK シグナル阻害活性と非常に類似していた（表 4）。

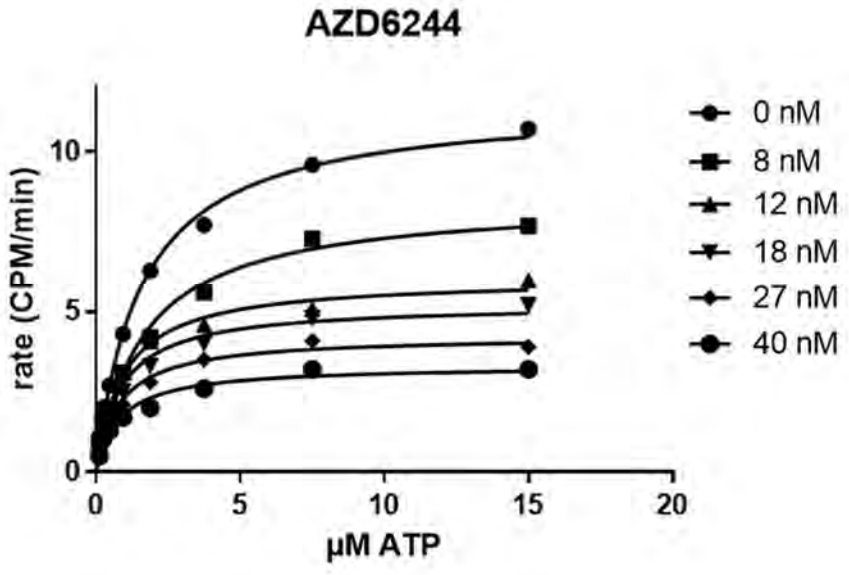
表 2　　セルメチニブ、N-脱メチル体及びアミド体の活性（ヒト MAP2K1-MAPK1 アッセイ）

Kinase Name	IC_{50}	ATP concentration (μmol/L)
MAP2K1 (human)	Selumetinib 15.3 nmol/L (SD 0.9 nmol/L)	10
MAP2K1 (human)	N-des methyl metabolite of selumetinib 6.7 nmol/L (SD 1.3 nmol/L)	10
MAP2K1 (human)	Amide metabolite of selumetinib 272 nmol/L (SD 88 nmol/L)	10

SD standard deviation
Number of replicates 6

ATP 競合試験（N = 6）において、V_{max} 値はセルメチニブ濃度が高くなるほど減少し、セルメチニブは ATP と競合しないことが示された。図 1 は、異なるセルメチニブ濃度（0～40 nmol/L）における ATP 濃度（0.12～15 μmol/L）と速度（CPM/min）の関係を示したものである。試験 Pharmacology Report 56 参照。また、*in vitro* 放射リガンド結合アッセイ及び *in vitro* 酵素アッセイでも、セルメチニブ及び N-脱メチル体について濃度 10 μmol/L で試験した。これらのアッセイでは、酵素、受容体、トランスポーター及びイオンチャネルを含む幅広い分子標的に対して評価した（試験 0320SY）。

図 1　　数種のセルメチニブ濃度（nM: nmol/L）での ATP 濃度（μM: μmol/L）と速度（CPM/min）との関係



活性化した野生型の MEK1 及び MEK2 を用いて不活性型 ERK2 をリン酸化する 2 種類の独立した試験で、セルメチニブの活性は MEK1 及び MEK2 の双方に対し同程度であることが明らかになった（表 3）。ATP と競合しないがアッセイ毎の MEK の活性化状態に依存するセルメチニブ等の MEK 阻害薬の活性は、使用するアッセイのフォーマットによって値が変化すると予想される。したがって 2.6.2.2.2.2 項で述べるように、細胞中の総 MEK 活性に対する阻害活性を検討することが重要である。

表 3　　セルメチニブによる MEK1 及び MEK2 の酵素活性の *in vitro* 阻害

Assay	MEK Isoform	IC_{50} (μmol/L)
1 [a]	MEK1	0.222
1 [a]	MEK2	0.389
2 [b]	MEK1	0.417
2 [b]	MEK2	0.402

[a] Invitrogen Z-LYTE® assay.　Number of replicates 2.　See Pharmacology Report 45
[b] Reaction Biology assays for MEK1 and MEK2.　Number of replicates 4.　See Pharmacology Report 46.

セルメチニブは MEK を阻害するが、このクラスの他の MEK 阻害薬と同じく ATP 結合部位ではなく隣接するアロステリック部位に結合する。このため、濃度 10 μmol/L で実施したスクリーニングでは、セルメチニブは他のキナーゼに対して意味のある阻害作用を示さなかった。試験 Pharmacology Report 01、45、46 及び 56、並びに Yeh et al 2007 参照。

2.6.2.2.2.2　培養細胞における MEK1/2 活性の選択的阻害（試験 Pharmacology Report 02）

細胞アッセイでは、セルメチニブ等の ATP 非競合的阻害薬による MEK1/2 阻害作用は、MEK1/2 の直接的基質である ERK1/2 のリン酸化を測定することにより検討される。MEK1 及び

MEK2 は等しくその基質である ERK1/2 をリン酸化できるため（Zheng et al 1993）、このアッセイでは、細胞中の総 MEK 活性に対する阻害活性を測定する。セルメチニブで 2 時間処理した後の ERK1/2 リン酸化阻害の IC_{50} 値を、様々な腫瘍細胞株を用いて、プレートアッセイにより求めた。この試験法では、細胞を固定し膜透過処理を行った後に抗リン酸化 ERK1/2 抗体、ペルオキシダーゼ標識二次抗体及び化学発光基質を用いて ERK1/2 のリン酸化を検出した。これらの結果から（表 4）、大部分の細胞株においてセルメチニブの IC_{50} 値は 10 nmol/L 未満であることが明らかとなった。細胞株 Calu-6 及び MDA-MB-231 は、それぞれコドン Q61K 及び G13D の *KRAS* 変異がある。細胞株 Colo 205 はコドン V600E に *BRAF* 変異がある。したがって、経路の阻害活性は様々な遺伝子型の癌で類似しているといえる。

表 4　　腫瘍細胞株における ERK1 及び 2 のリン酸化に対するセルメチニブの阻害活性

Cell line	Tumour type	IC_{50} (μmol/L)[a]	Cell line	Tumour type	IC_{50} (μmol/L)[a]
Calu-6	Lung	0.0036	Colo 205	Colorectal	0.0054
SKBR3	Breast	0.0038	MDA-MB-468	Breast	0.0099
MDA-MB-231	Breast	0.0074	Saos-2[b]	Osteosarcoma	0.0053
Calu-3	Lung	0.0018	DU-145	Prostate	0.0055
SKOV3	Ovarian	0.0408	BxPC3	Pancreatic	0.00653

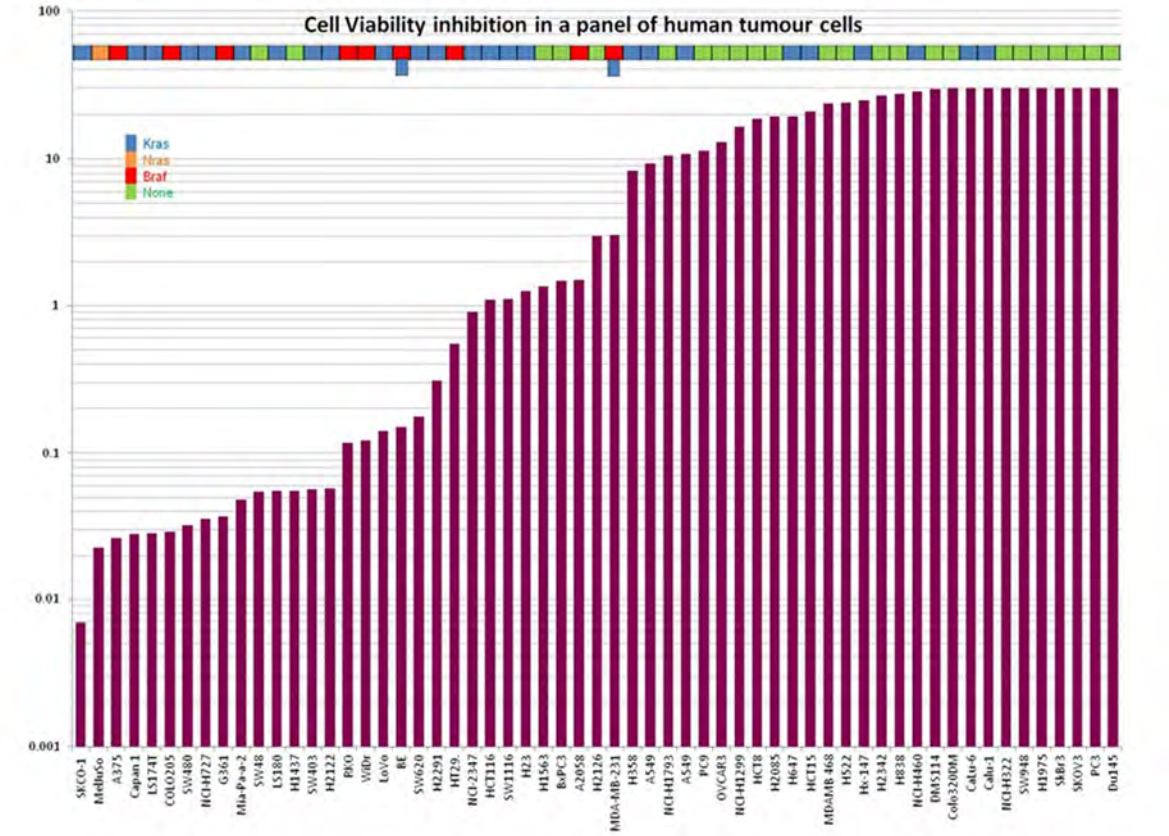
[a] Each IC_{50} represents the average of 2 or 3 separate experiments.
[b] Saos-2 cell line tested once.
ERK Extracellular signal-regulated kinase; IC_{50} 50% inhibitory concentration

細胞アッセイにおいて、セルメチニブは MEK/ERK 経路に選択性を示し、mTOR、jnk 又は p38 キナーゼを介する細胞内のその他のシグナル伝達に対しては、10 μmol/L 以上の濃度でも阻害作用を示さなかった（Lyssikatos 2006、Yeh et al 2007）。試験 Pharmacology Report 02 参照。

2.6.2.2.2.3　腫瘍細胞の成長阻害（試験 Pharmacology Report 35）

セルメチニブが生細胞数に及ぼす作用を検討するため、種々の濃度のセルメチニブを添加した培地で、様々な型の腫瘍を代表するヒト腫瘍由来細胞株を 3 日間培養し、MTS 法（Promega）により生細胞数を測定した。IC_{50} 値は 10 nmol/L 未満から 10 μmol/L 超の範囲に及んだ（図 2）。セルメチニブに感受性を示す（IC_{50} 値：1 μmol/L 未満）細胞株の大部分は *BRAF* 又は *KRAS* の遺伝子変異があるか、ない場合は RAF/MEK/ERK 経路が活性化していた（Davies et al 2007、Dry et al 2010）。試験した細胞株の少なからぬ割合がセルメチニブに非感受性で、これは MEK 阻害が細胞全般に毒性作用を及ぼすわけではないことと合致している。試験 Pharmacology Report 35 参照。

図 2　　ヒト腫瘍由来細胞株パネルにおける細胞生存の抑制



X axis: cell line name; Y axis: cell viability inhibition IC_{50} in µmol/L

2.6.2.2.2.4　セルメチニブの代謝物 N-脱メチル体の *in vitro* 評価（試験 Pharmacology Report 05、06 及び 07）

セルメチニブ及び N-脱メチル体の活性を、ERK リン酸化の阻害を指標とする細胞アッセイにより、7 種の腫瘍細胞株を用いて評価した。結果を表 5 に示す。N-脱メチル体はこれらの腫瘍細胞株において ERK リン酸化をセルメチニブよりも約 3～5 倍高い活性で阻害した（範囲：2.93～4.54 倍）。試験 Pharmacology Report 05 参照。

表 5　　腫瘍細胞株におけるセルメチニブ及び N-脱メチル体による ERK リン酸化阻害作用

Cell line	Selumetinib IC_{50} nmol/L [SE]	Selumetinib N-desmethyl metabolite IC_{50} nmol/L [SE]	Ratio
G361	8.980 [1.873]	2.643 [0.576]	3.40
A375	9.837 [0.620]	3.353 [0.333]	2.93
A2058	4.257 [0.540]	1.287 [0.142]	3.31
MelJuSo	4.397 [0.563]	1.075 [0.165]	4.09
MiaPaCa2	1.937 [0.557]	0.601 [0.295]	3.22
BxPC3	4.859 [3.276]	1.334 [0.737]	3.64
Panc-1	2.887 [0.592]	0.636 [0.240]	4.54

Number of replicates 3; SE standard error
The assay used was the same as described in Section 2.6.2.2.2.2.

セルメチニブ及び N-脱メチル体の相対的活性を、腫瘍細胞生存の抑制を指標とする細胞アッセイでも評価した。この試験では、N-脱メチル体の薬理活性はセルメチニブの 5 倍以上であった（表 6）。試験 Pharmacology Report 06 参照。

表 6　　セルメチニブ及び N-脱メチル体による細胞生存の抑制

Cell Line	Selumetinib IC_{50} (µmol/L) +/- SE	N-desmethyl selumetinib IC_{50} (µmol/L) +/- SE	Mean Ratio [a]
A375	0.01835 ± 0.0013	0.0034 ± 0.0007	5.39
A2058	0.5629 ± 0.1091	0.0799 ± 0.0265	7.04
MelJuso	1.3930 ± 0.2722	0.2459 ± 0.1065	5.67

[a] selumetinib: N-desmethyl selumetinib ratio
Viable cell number was determined using the MTS proliferation assay reagents according to manufacturer's instructions (Promega; G1111).
Number of replicates 3; SE standard error

次に、*ex vivo* の臨床薬理試験として、ホルボールエステル（TPA）で刺激した全血中の ERK リン酸化レベルを指標に、セルメチニブと N-脱メチル体の MEK 阻害作用を再検討した。本試験の結果、N-脱メチル体の阻害活性はセルメチニブより約 2 倍高かった（表 7）。この試験では、被験者から採取した血液にセルメチニブあるいは N-脱メチル体の濃度を変えてインキュベートした後、ERK のリン酸化を誘導するために TPA を 10 分間添加した時点で血液を固定し、白血球ゴーストを作製した。p-ERK 陽性白血球ゴーストの割合を FACS 法で定量し、各化合物の IC_{50} 値を算出した。試験 Pharmacology Report 07 参照。

表 7　　全血法：セルメチニブ及び N-脱メチル体による TPA-刺激 ERK リン酸化阻害

Compound	IC_{50} (nmol/L) +/- SE
Selumetinib	460 (+/- 137)
N-desmethyl selumetinib	266 (+/- 168)

SE standard error

2.6.2.2.2.5　セルメチニブアミド体の *in vitro* 評価（試験 Pharmacology Report 08）

セルメチニブ及びセルメチニブアミド体の活性を、ERK リン酸化の阻害を指標とする細胞アッセイにより、3 種の腫瘍細胞株を用いて評価した。結果を表 8 に示す。アミド体の活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下であり、本概要文で後述する *in vivo* 試験で観察された MEK 阻害への寄与はないと考えられる。試験 Pharmacology Report 08 参照。

表 8　　セルメチニブ及びセルメチニブアミド体による ERK リン酸化の阻害（腫瘍細胞株を用いた細胞アッセイ）

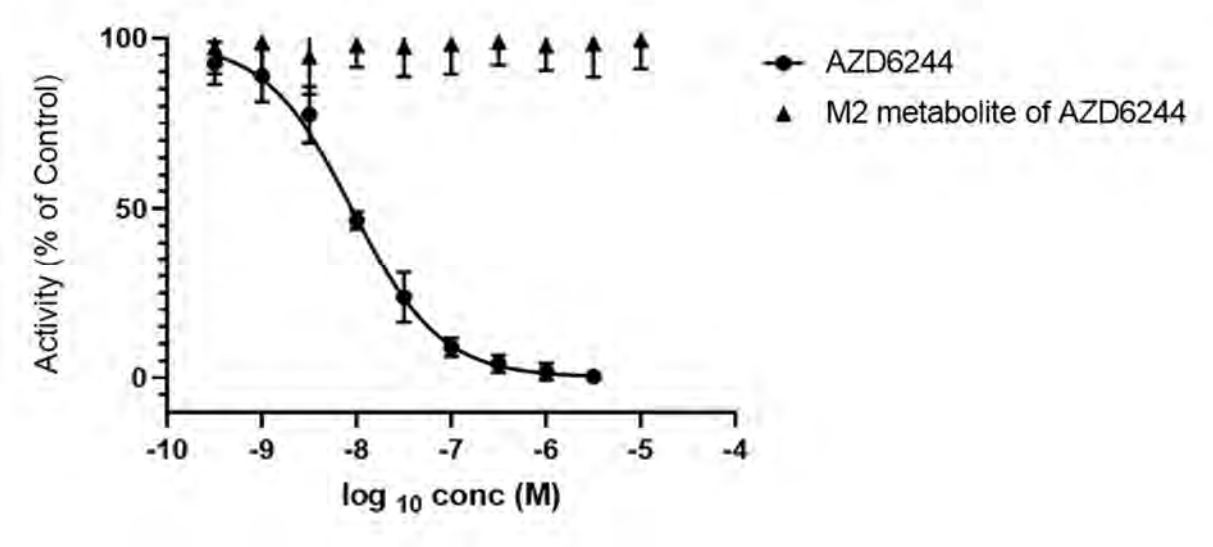
Cell Line	Selumetinib IC_{50} (nmol/L) [SE]	Selumetinib amide metabolite IC_{50} (nmol/L) [SE]	Ratio
A375	23.69 [2.73]	913.9 [43.2]	39
A2058	20.15 [1.21]	784.88 [49.67]	39
Calu-6	15.04 [0.16]	759.21 [38.53]	50

Number of replicates 4; SE standard error
The assay used was the same as described in Section 2.6.2.2.2.2.

2.6.2.2.2.6　セルメチニブ及び代謝物 M2（AZ14216282）による MAP2K1 阻害（[γ-^{33}P]ATP を用いた放射測定アッセイ）（試験 Pharmacology Report 56）

ヒト MAP2K1、ヒト MAPK1 及び[γ-^{33}P]-ATP を用いた放射測定アッセイにより、セルメチニブの代謝物 M2 の活性を最高 10 µmol/L までの濃度で検討した。この試験で代謝物 M2 に活性は認められず、したがって代謝物 M2 は MAP2K1（MEK1）を阻害しないと考えられた（図 3）

図 3　　セルメチニブ及び代謝物 M2 による MAP2K1 阻害

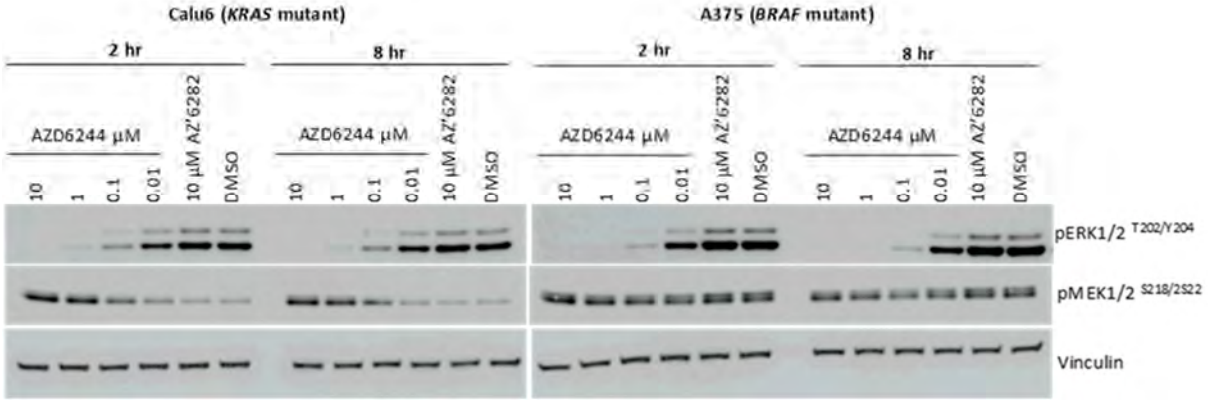


Results are expressed as the mean ± standard deviation (n = 4).

2.6.2.2.2.7　セルメチニブ及び代謝物 M2 による腫瘍細胞株での ERK リン酸化阻害（試験 Pharmacology Report 57）

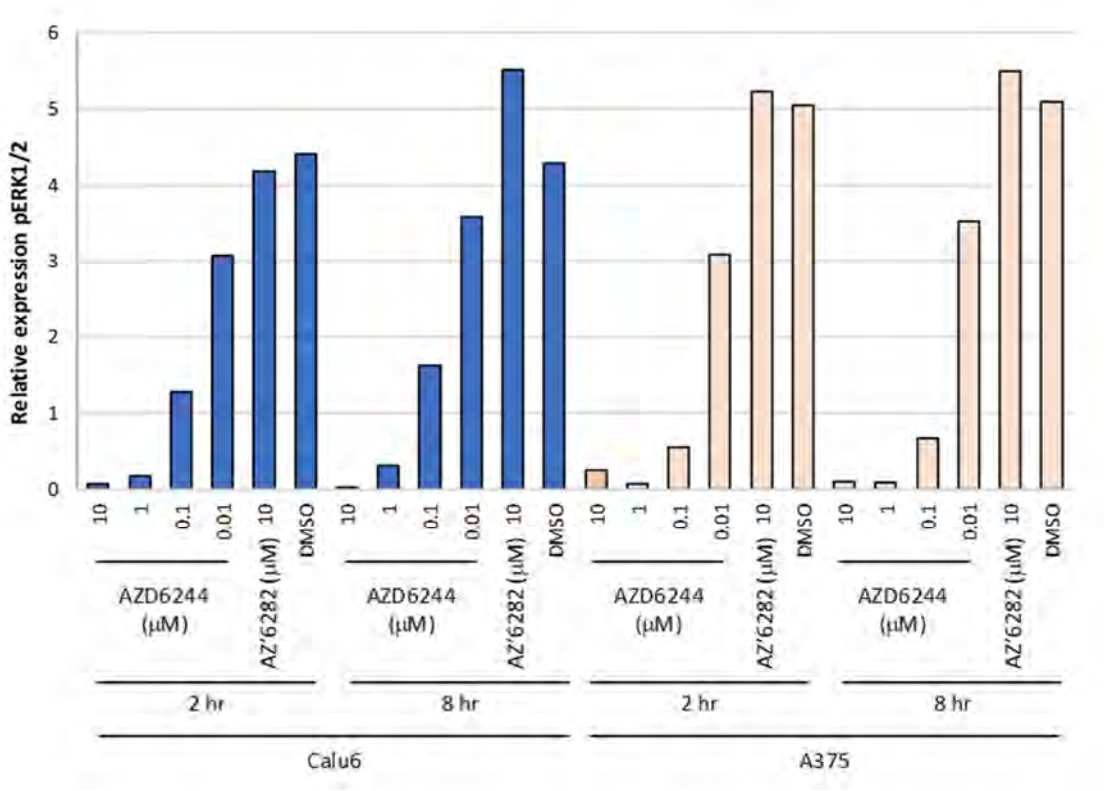
セルメチニブ及び代謝物 M2 の活性を、ERK リン酸化の阻害を指標とする細胞アッセイにより評価した。セルメチニブは Calu-6 と A375 のいずれの腫瘍細胞株でも濃度依存的に ERK のリン酸化を阻害したが、代謝物 M2 は濃度 10 μmol/L でもこれらの細胞株において ERK のリン酸化を阻害しなかった（図 4 及び図 5）。

図 4　セルメチニブ又は代謝物 M2 で処理した腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害を示すウエスタンブロット



AZ’6282 = AZ14216282 (M2 Metabolite)

図 5　　セルメチニブ又は代謝物 M2 で処理した腫瘍細胞株における ERK リン酸化阻害を示すウエスタンブロットの定量化



AZ’6282 = AZ14216282 (M2 Metabolite)
Results are expressed based on one experiment (N=1).

2.6.2.2.3　*In vivo* 試験

ヒト Calu-6 肺癌異種移植モデルにおいて、セルメチニブの前臨床での用量依存的な MEK1/2 阻害作用が示され、セルメチニブがヒト腫瘍の増殖を *in vivo* で顕著に抑制する最小用量を求めることができた。ヒト神経線維腫の遺伝子型と表現型を再現する 2 種類の遺伝子改変 NF1 マウスモデルにおいて、セルメチニブは神経線維腫の MEK 活性を阻害し、モデルによって腫瘍の数、成長、増大及び増殖を抑制することが示された。

2.6.2.2.3.1　腫瘍増殖抑制作用：ヒト Calu-6 非小細胞肺癌異種移植モデルにおける用量反応関係（試験 Pharmacology Report 09 及び 10）

セルメチニブの薬理作用を検討するため、*KRAS* 遺伝子の活性化変異を有するヒト Calu-6 非小細胞肺癌モデルを用いてセルメチニブの抗腫瘍活性を様々な用量で評価した。マウスに溶媒（1% カルボキシメチルセルロース／0.1% Tween 80）又はセルメチニブ（10、25 又は 100 mg/kg）を 25 日間、1 日 2 回（BID）経口投与した。投与期間中、全てのセルメチニブ投与群で腫瘍の増殖は抑制された。試験 Pharmacology Report 09 参照。その後の試験で、Calu-6 モデルを用いてセルメチニブの最小有効投与量を求めた。これは 3 mg/kg BID から 0.2 mg/kg BID のセルメチニブ用量タイトレーションにより行った。求められた最小有効投与量は 0.75 mg/kg BID で、対照群と比較

し 39.7%の増殖抑制が認められ、統計学的に有意であった（表 9）。試験 Pharmacology Report 10 参照。

表 9　　腫瘍増殖の抑制：ヒト Calu-6 非小細胞肺癌異種移植モデルにおける用量反応関係

Dose of selumetinib	% tumour growth inhibition	P value
100 mg/kg BID	91 %	<0.001
25 mg/kg BID	82 %	<0.001
10 mg/kg BID	79 %	<0.001
3.0 mg/kg BID	59.3 %	ns
1.5 mg/kg BID	43.2 %	ns
0.75 mg/kg BID	39.7 %	P <0.005
0.4 mg/kg BID	No effect	NA
0.2 mg/kg BID	No effect	NA

Tumour volumes were assessed by bilateral Vernier caliper measurement at least twice weekly and calculated using the formula (length × width) × √ (length × width) × (π/6), where length was taken to be the longest diameter across the tumour and width the corresponding perpendicular.　Growth inhibition was calculated from the start of treatment by comparison of the mean change in tumour volume for control and treated groups. Statistical evaluation used a one-tailed two-sample t test (P value of lower then 0.05 was considered to be statistically significant).

NA not applicable, BID twice daily.

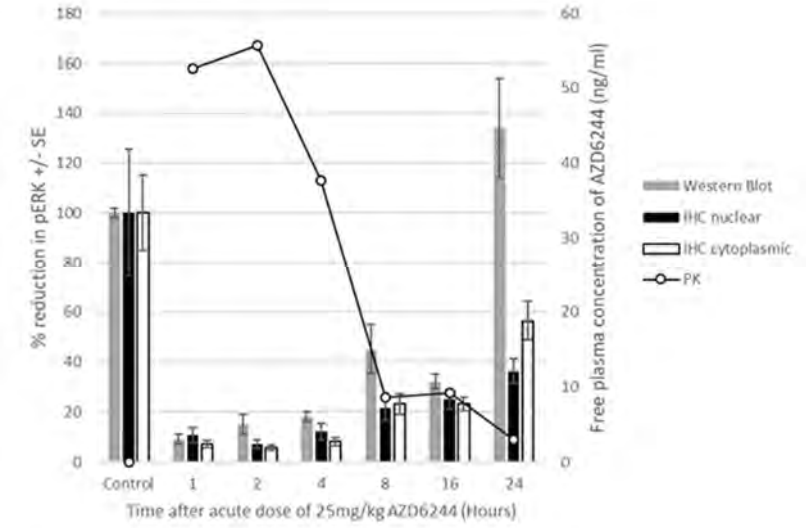
2.6.2.2.3.2　*In vivo* 薬力学試験（試験 Pharmacology Report Report 12 及び 47）

セルメチニブによる用量及び時間依存的な MEK 阻害作用について、ヒト Calu-6 腫瘍異種移植モデルを用いて経口投与により検討した。リン酸化 ERK（p-ERK）量の測定により、異種移植腫瘍中の MEK 活性を評価した。核中及び細胞質中の p-ERK 量を独立に、免疫組織化学染色（IHC）法及び定量的画像解析法により求めた。25 mg/kg を単回投与したとき、細胞質中の免疫染色は投与から 1、2 及び 4 時間の時点で約 90%減少し、24 時間の時点で対照群の 50%超まで回復した（図 6）。同様の傾向はウエスタンブロット法でも観察されたが、p-ERK シグナルは IHC 法による値より一貫してわずかに高かった。Calu-6 モデルを用いた試験で最小有効投与量とされた 0.75 mg/kg（表 9 参照）を投与したとき、IHC 法による p-ERK シグナルは投与から 1～6 時間の時点で最高 80%抑制されたが、8 時間の時点までに投与前対照群の 50%超まで回復した。ウエスタンブロット法で評価した p-ERK 量も同様の傾向を示したが、p-ERK シグナルは IHC 法による値より一貫して高く、阻害率は最初の評価時点で 60%近くでピークとなり、8 時間の時点で投与前の水準に回復した。これらのデータは、想定する抑制作用の維持に 1 日 2 回投与の使用が妥当であることと一貫している。試験 Pharmacology Report 12 参照。

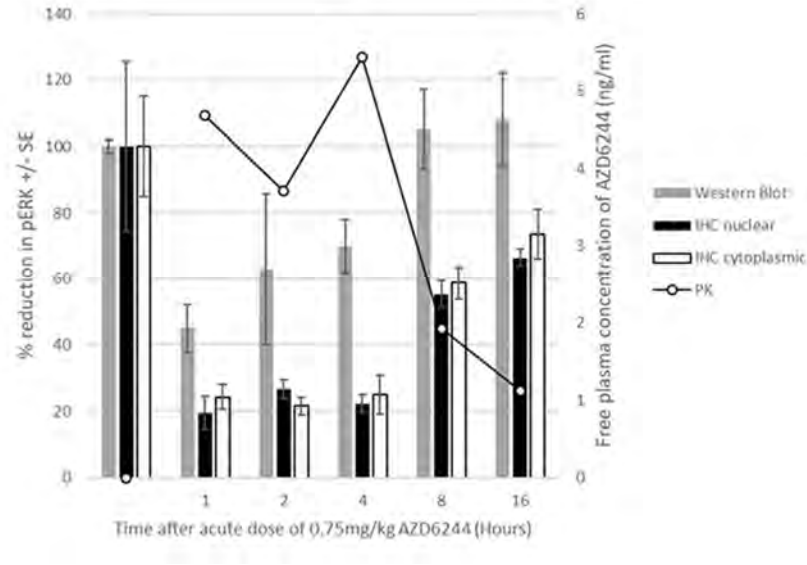
マウスにセルメチニブを経口投与した試験で、N-脱メチル体の AUC は最高で親化合物の約 14%であった（試験 KPM017）。サル及びラットを用いた試験では、N-脱メチル体の経口バイオアベイラビリティは非常に低く、サルで定量限界未満（試験 KKP023）、ラットで 4.5%であった（試験 KPR024）。そのため、N-脱メチル体が MEK 阻害に及ぼす影響を検討する独立した *in vivo* 試験は実施しなかったが、この代謝物は *in vivo* で MEK 阻害に寄与する可能性がある。

図 6　　ヒト Calu-6 肺癌異種移植モデルにセルメチニブ a) 25 mg/kg 又は b) 0.75 mg/kg を単回投与したときの ERK リン酸化阻害作用

a)



b)

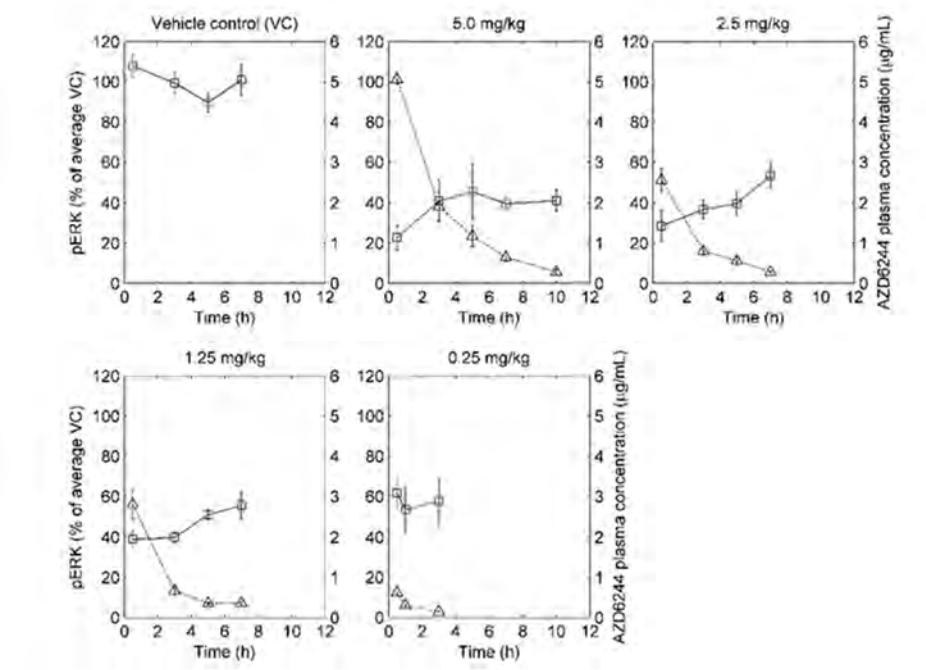


Phospho-ERK (p-ERK) left hand y-axis, expressed as percentage of untreated control +/- standard error (SE)

Calu-6 モデルを用いた別の試験で、成人患者への標準単剤療法で使用する用量である 75 mg のセルメチニブを投与した患者の曝露量範囲をカバーする用量でセルメチニブを単回投与した。この単回投与後の様々な時点で腫瘍及び血液検体を採取し、腫瘍の薬力学的反応（ウエスタンブロットによる p-ERK レベル測定）及び血漿中の薬物動態を検討した。その結果、用量及び時間依存的な ERK リン酸化阻害作用が認められ（図 7）、最高阻害率は用量によって約 40%～80%の範囲であった。これらの非臨床試験で認められたセルメチニブの曝露量を治療用量 25 mg/m^2 を投与した小児患者で認められたセルメチニブの曝露量（非結合形 C_{max}：11.69 ng/mL、AUC：

32.14 ng.hr/mL）と比較することにより、同等なマウス用量は 0.25 mg/kg と 1.25 mg/kg の間であることが明らかになった（臨床薬理の概要 2.7.2 項を参照）。試験 Pharmacology Report 47 参照。

図 7　　Calu-6 腫瘍モデルにセルメチニブを単回投与したときの用量及び時間依存的な ERK リン酸化阻害作用



Selumetinib PK-PD from Pharmacology Report 47.　Phosphorylated ERK (p-ERK % of mean vehicle control [VC] +/- standard error [SE]).　Western blot PD response (square data points, solid lines, left axes) and plasma PK (triangle data points, dashed lines, right axes), following single doses of 0.25 to 5.0 mg/kg selumetinib, in nude mice bearing Calu-6 xenografts.

2.6.2.2.3.3　遺伝子改変マウス神経線維腫モデルを用いたセルメチニブの薬効評価

セルメチニブによる MEK 阻害がマウス神経線維腫モデルで有効かどうかを検討するため、シュワン細胞特異的に *NF1* 遺伝子を欠失させた 2 種類の遺伝子改変マウス神経線維腫モデルを用いてセルメチニブの作用を評価した。

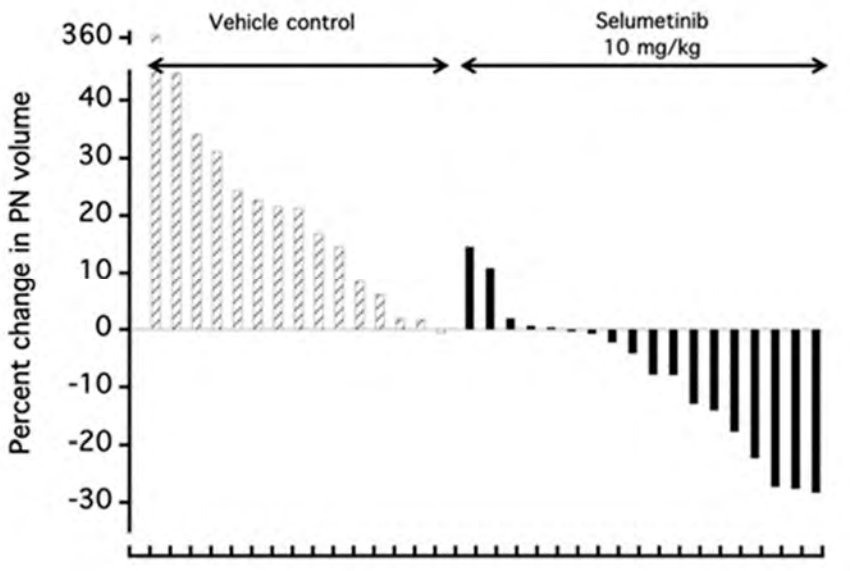
2.6.2.2.3.3.1　神経線維腫 *Nf1$^{fl/fl}$;DhhCre* マウスモデルを用いたセルメチニブの薬効評価（試験 Pharmacology Report 54）

本試験（Dombi et al 2016）でセルメチニブの薬効を検討するのに用いた *Nf1$^{flox/flox}$;DhhCre* マウスモデル（Wu et al 2008）は、*Desert Hedgehog*（*Dhh*）遺伝子の制御配列下で DNA 組換え酵素 Cre を発現させて、胎生 12.5 日のシュワン前駆細胞で特異的に *Nf1$^{flox/flox}$* 対立遺伝子の組換えを可能にした *DhhCre* マウスを利用したものである。このモデルでは、いずれのマウスも、ヒト神経線維腫と組織学的同一性を示す多発性神経線維腫を発症する。

2.6.2.2.3.3.1.1　　神経線維腫の増殖抑制

Nf1$^{fl/fl}$*;DhhCre* マウスにセルメチニブ 10 mg/kg を 5 日間経口投与し、2 日間休薬する投与サイクルを 8 週間実施したところ、ランダム係数モデル解析による評価で、溶媒投与対照群と比較して腫瘍の増殖が有意に抑制されたことが示された（p<0.0001）。更にこの投与法により、投与前の腫瘍サイズと比較してマウス 15 例中 13 例で腫瘍が退縮し、またベースライン前の腫瘍サイズと比較して 15 例中 2 例で腫瘍が退縮した。ただし、腫瘍がベースライン前のサイズにまで退縮したマウスの割合は対照群と比較して有意に高くはなかった（Fisher の直接確率検定による p=0.0559、2/15 vs 1/87）。しかし、投与前のサイズへの腫瘍の退縮を考えた場合、その割合は有意に高かった（p<0.0001、13/15 vs 14/88）（図 8 及び表 10）。

図 8　　*Nf1*$^{fl/fl}$*;DhhCre* マウスにおける神経線維腫の腫瘍容積の解析（セルメチニブ 10 mg/kg を 1 日 2 回、1 週間に 5 日間強制経口投与［5 日間投与+2 日間休薬］×8 週間）



The x-axis is mouse.　Each bar represents an individual mouse.
PN: Plexiform neurofibroma.

表 10　　腫瘍容積変化に関する統計解析

Treatment	Tumour Shrinkage from baseline value (month 5)		Tumour Shrinkage from last pre-treatment value (month 7)	
	number of mice with tumour shrinkage/total mice evaluated	p-value compared to control	number of mice with tumour shrinkage/total mice evaluated	p-value compared to control
Selumetinib	2/15	0.0559	13/15	<0.0001
Control	1/87 [1]	NA	14/88	NA

[1] One of four selumetinib control mice died and tumour volume at 9 months is not available.

Fisher's exact test: selumetinib shrank tumors in 2/15 mice to the pre-baseline size and in 13/15 mice to the pre-treatment size. Compared to the control, the percentage of mice with tumor shrinkage to the pre-baseline is not significantly higher (p = 0.0559; 2/15 vs 1/87). When tumor shrinkage to the pre-treatment size is concerned, the percentage is significantly higher (p <0.0001; 13/15 vs 14/88).

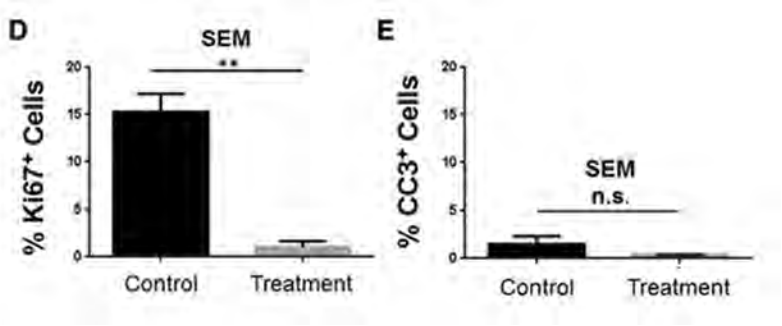
NA not applicable

2.6.2.2.3.3.1.2　　薬力学試験

Nf1$^{fl/fl}$*;DhhCre* マウスにセルメチニブ 10 mg/kg を 1 日 2 回、1 週間に 5 日間強制経口投与（5 日間投与、2 日間休薬）し、この投与を 8 週間実施した。この 8 週間投与試験の最終投与終了後、薬力学試験を実施した。神経線維腫について、増殖マーカーKi67 の発現及びアポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3（CC3）を免疫組織化学染色法にて分析した。神経線維腫における Ki67 の発現はセルメチニブの投与後、有意に減少したが、CC3 データからは、アポトーシスに有意な変化がないことが示された（図 9）。

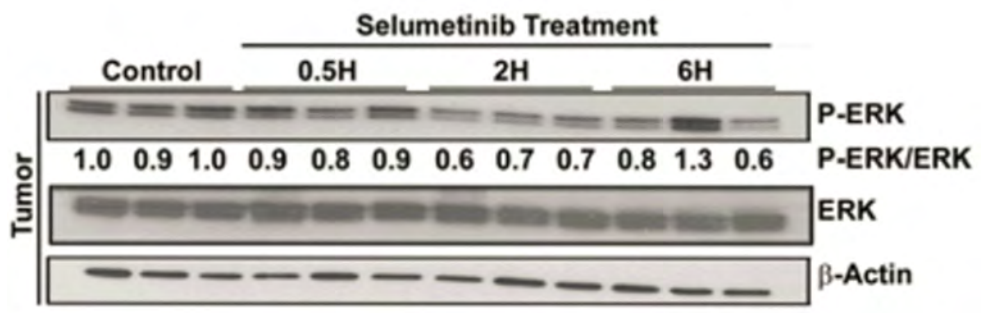
神経線維腫における MEK 阻害について検討するため、第 2 の薬力学試験を実施した。この試験では、*Nf1*$^{fl/fl}$*;DhhCre* 神経線維腫マウスにセルメチニブ 10 mg/kg を単回投与した。得られたデータを図 10 に示す。投与後 0.5 時間及び 2 時間にウエスタンブロット法により測定した神経線維腫組織内の p-ERK レベルに短時間の低下が認められた。図中の数値は 1 試料あたりの p-ERK/総 ERK 比を示している。

図 9　　神経線維腫組織における増殖マーカーKi67 及びアポトーシスマーカーcleaved caspase-3（CC3^{+}）の免疫組織化学染色による解析



SEM standard error of the mean

図 10　　セルメチニブ 10 mg/kg 単回経口投与後にみられた神経線維腫組織内における ERK リン酸化阻害作用



上記のデータから、8 週間にわたるセルメチニブの投与（10 mg/kg 5 日間経口投与、2 日間休薬）により、*Nf1*$^{fl/fl}$*;DhhCre* マウスの神経線維腫の腫瘍増殖が溶媒投与対照群と比較して有意に抑制されたことが示された。具体的には、マウス 15 例中 13 例で投与前の腫瘍サイズへ腫瘍が退縮し、15 例中 2 例でベースライン前の腫瘍サイズへ腫瘍が退縮した。神経線維腫の腫瘍組織について薬力学的解析を行った結果、セルメチニブは、単回投与及び反復投与後に ERK のリン酸化を阻害し、8 週間の投与期間終了後には神経線維腫の増殖を抑制することが示された。試験 Pharmacology Study Report 54 参照。

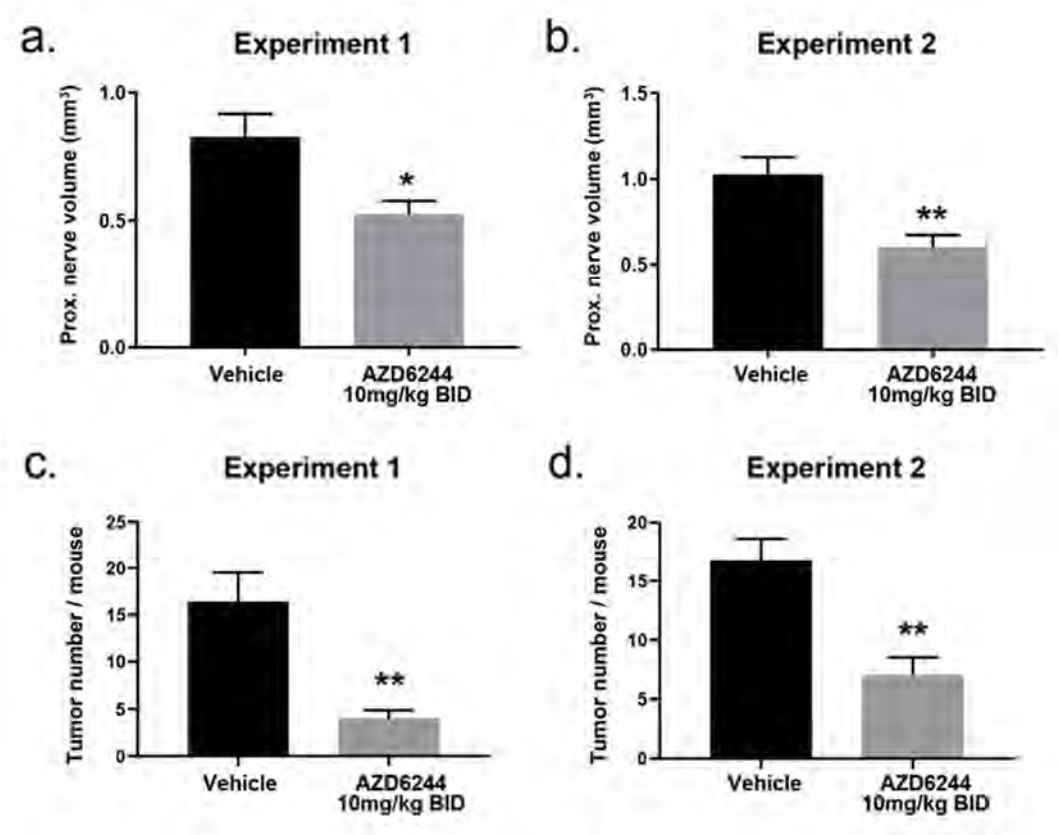
2.6.2.2.3.3.2　神経線維腫 *Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn Cre* マウスモデルを用いたセルメチニブの薬効評価（試験 Pharmacology Report 55）

このモデルは米国インディアナ大学の Clapp 研究室によって開発されたモデルであり、シュワン細胞におけるヘテロ接合性の消失を遺伝学的に再現するように遺伝子操作されたマウス NF1 モデルである（D. Wade Clapp 私信及び Hirbe et al 2016）。*NF1* 遺伝子のエクソン 31 のフランキング領域に loxP 配列（*Nf1*$^{flox/flox}$）を保有するマウスと *Postn-Cre* マウスとを交配させて、*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウス及びそれらの Cre 発現陰性同腹仔（対照マウス）を作製した。これらの *Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスは、4 カ月齢までにヒト腫瘍の表現型を浸透度 100%で精緻に再現した。以前の試験において、*Postn-Cre* は胎生 10 日よりシュワン前駆細胞において頑健なレポーター遺伝子の発現を誘導することが示されている（D. Wade Clapp 私信及び Hirbe et al 2016）。

2.6.2.2.3.3.2.1　神経線維腫の増殖抑制

4 カ月齢の *Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスにセルメチニブ 10 mg/kg 又は溶媒（0.5% HPMC plus 0.5% Tween 80）を 1 日 2 回経口投与し、スコアを記録する 2 つの実験で別々に評価した。実験 1：溶媒群（N = 5）及びセルメチニブ群（N = 5）。実験 2：溶媒群（N = 11）及びセルメチニブ群（N = 6）。12 週間の投与終了後、セルメチニブ群では近位神経根のサイズが溶媒投与対照群と比較して、実験 1 では約 37%（$p < 0.05$）、及び実験 2 では約 41%（$p < 0.01$）、それぞれ溶媒群よりも小さかった。更に、著明な腫瘍数の減少（実験 1 では 75%の減少、実験 2 では 58%の減少）も認められた（$p < 0.01$）。これらのデータを図 11 に示す。

図 11　　*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスにおける近位神経根の容積及び腫瘍数に対するセルメチニブの効果

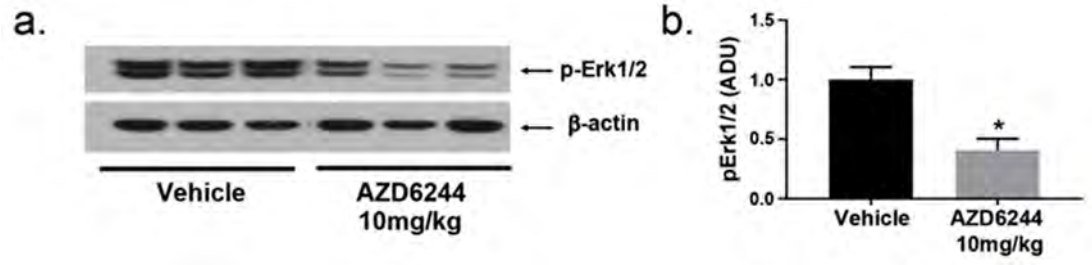


AZD6244: Selumetinib.

2.6.2.2.3.3.2.2　　薬力学的作用

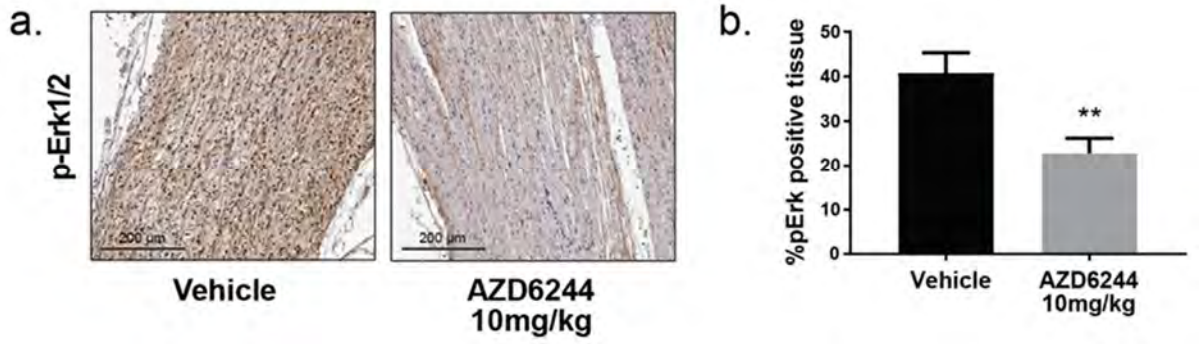
MEK 阻害の主要な生化学的標的が調節されていることを確認するため、セルメチニブ経口投与の 2 時間後にマウスを安楽死させ、ERK のリン酸化をウエスタンブロット法（図 12）及び免疫組織化学染色法（図 13）にて評価した。ウエスタンブロット法では、若干のばらつきが認められたものの、全体としては多くの腫瘍組織で ERK のリン酸化が約 60%阻害されたことが示された。また、免疫組織化学染色法によって ERK のリン酸化を評価した場合も、セルメチニブ投与群では ERK のリン酸化が対照群と比較して 44%、有意に低下したことが示された（p＝0.003）。

図 12　*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスの神経線維腫組織における ERK リン酸化の阻害（ウエスタンブロット法）[1]



[1] data from Experiment 1.　AZD6244: Selumetinib.

図 13　*Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスの神経線維腫組織における ERK リン酸化の阻害（免疫組織化学染色法）[1]



[1] data from Experiment 2.　AZD6244: Selumetinib.　See Pharmacology Study Report 55

本試験のデータから、神経線維腫の *Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn-Cre* マウスモデルにおいて、セルメチニブは神経線維腫組織での ERK リン酸化を阻害することが示された。この ERK リン酸化阻害の結果、セルメチニブを *Nf1*$^{flox/flox}$*;Postn Cre* マウスに 4 カ月齢から投与することにより、対照群と比較して神経線維腫のサイズが退縮し、腫瘍数が減少するものと考えられる。このモデルで観察された標的経路の阻害は 40～60%であったことから、マウスモデルで神経線維腫の形成及び成長を抑制するには、MEK 活性を完全に阻害する必要はないことが示唆された。

このように、ヒト神経線維腫の遺伝子型及び表現型を再現する 2 種類の独立したマウス神経線維腫モデルにおいて、セルメチニブの経口投与は神経線維腫組織における MEK 活性を阻害し、モデルによって腫瘍の数、成長、増大及び増殖を抑制することが示された。2.6.2.2.3.2 項（図 7）で述べたように、治療用量を小児患者に投与したときの非結合形 C_{max} は 11.7 ng/mL、非結合形 AUC は 32.14 ng.hr/mL、マウスで同程度の曝露量が達成される用量は 0.25 mg/kg と 1.25 mg/kg の間である。したがって、神経線維腫の非臨床モデルで有効性を示した 10 mg/kg の用量をマウスに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高い。そのため、非臨床及び臨床におる有効性は定性的に類似するが、有効性を示す曝露量の点で、ヒト神経線維腫は MEK 阻害への感受性が高い、と結論付けることができる（Dombi et al 2016）（臨床的有効性の概要 2.7.3 項参照）。

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　放射性リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイによる選択性スクリーニング（試験 0320SY）

セルメチニブ及び N-脱メチル体を対象に、酵素、受容体、トランスポーター及びイオンチャネルを含む幅広い分子標的について、*in vitro* 放射性リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイにより濃度 10 μmol/L で試験した。得られた知見の要約を薬理試験概要表 2.6.3.3 項に示した。

セルメチニブは実施した 305 種類のアッセイのうち、1 つで顕著な阻害活性（50%超の阻害と定義）を示した（10 μmol/L でタンパク質セリン／スレオニンキナーゼ PRKG1 を 53%阻害）。N-脱メチル体は実施した 336 種類のアッセイのうち、1 つで顕著な阻害作用を示した（10 μmol/L でタンパク質セリン／スレオニンキナーゼ MEK1 を 84%阻害）。

2.6.2.4　安全性薬理試験

セルメチニブ（遊離塩基）が中枢神経系、心血管系、呼吸器系及び消化器系に及ぼす影響を検討する一連の安全性薬理試験を実施した。これらの試験は GLP を適用し、安全性薬理試験に関する ICH ガイドライン（ICH S7A、ICH S7B）に従って実施した。実施した試験の一覧を表 1 に、また得られた所見の表形式の要約を薬理試験概要表 2.6.3.4 項にそれぞれ示した。*In vivo* 安全性薬理試験での溶媒は水溶性の 30% w/v Captisol®を使用した。

非臨床動物種におけるセルメチニブの代謝物プロファイルの詳細は薬物動態試験の概要文 2.6.4 項に示した。げっ歯類を用いた安全性試験（安全性薬理試験を含む）では、最初、ラットを使用した。ヒト代謝物の N-脱メチル体は第 1 相代謝で生成する活性代謝物（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項を参照）であるが、ラットでは意味のある量が生成されず、ミニブタでは代謝物プロファイルを評価していない。患者において、N-脱メチル体が血漿中の総セルメチニブ関連物質に占める割合は 10%未満であり（臨床薬理の概要 2.7.2 項を参照）、したがって、ICH M3(R2)ガイドライン（2009）に従い、この代謝物について非臨床試験による特徴付けは不要である。N-脱メチル体はマウスで生成されることから、毒性評価ではマウスを使用した。マウス毒性試験では一般状態を評価した（毒性試験の概要文 2.6.6 項を参照）。また、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。

中枢神経系、心血管系、呼吸器系及び消化器系に及ぼす影響を検討した安全性薬理試験は、モジュール 4 に添付した各検討の試験報告書（写）中の「STATEMENT OF GLP COMPLIANCE」により GLP 適用下で実施されたことが確認されている。しかしながら、これらの安全性薬理試験のうち [redacted] 社で実施した *in vivo* における検討（試験 1758/ARR/03、1759/ARR/03、1760/ARR/03、1761/ARR/03、1762/ARR/03 及び 1763/ARR/03）については、その根拠資料一式の所在が確認できず、参考資料として提出することとなった。

以下に、根拠資料一式の所在が確認できなかった経緯を説明した。

20[redacted]～20[redacted] 年に [redacted] 社で実施したセルメチニブに関する試験のスポンサーは [redacted] 社であった。AstraZeneca 社は、AstraZeneca 社と [redacted] 社との間で 2003 年に締結されたコラボレーション及び使用許諾契約（a 2003 Collaboration and License Agreement）の

[redacted]項に従って、要求された情報にアクセスし、使用する権利の独占権がある（その後、[redacted]社は[redacted]）。

20[redacted]年、[redacted]社は、[redacted]、[redacted]と発表した。[redacted]年後、[redacted]は[redacted]され、[redacted]は[redacted]（[redacted]）[redacted]された。

20[redacted]年、[redacted]は[redacted]、その後20[redacted]年に[redacted]された。様々な調査を行っているが、[redacted]できていない。[redacted]、[redacted]が、[redacted]（[redacted]）いない。

残る可能性としては、[redacted]、[redacted]が考えられ、[redacted]、[redacted]いる。

[redacted]については、[redacted]おらず、[redacted]（[redacted]）[redacted]ない。AstraZeneca社では試験報告書の電子コピーを保有しているが、[redacted]社が実施した試験の生データ、運営管理者、試験管理者の陳述書等の原本は保有しておらず、これらの保管場所は確認できていない。また、[redacted]いない。

なお、海外における本剤の承認申請時において根拠資料が確認できていない試験の取り扱いについて海外規制当局との議論は行われていない。

上記の理由から、[redacted]社によって実施された安全性薬理試験の結果は参考資料となった。

中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対するセルメチニブ（遊離塩基又は硫酸塩）の非臨床安全性は、安全性薬理試験だけでなく、これまでに実施された単回及び反復投与毒性試験においても包括的に評価されていると考えている。セルメチニブ（遊離塩基又は硫酸塩）を用いて実施した毒性試験では、単回及び反復投与後の症状観察及び一般状態の所見、心電図（サルのみ）、並びにこれらの臓器の病理組織学的検査を行った。心血管系、呼吸系及び中枢神経系への影響を評価した毒性試験（表11、毒性試験概要表2.6.7.1項を参照）の概略を以下に示した。

表 11　　安全性薬理評価項目を補足説明するために引用したセルメチニブの毒性試験一覧

Study type and duration	Route of admin.	Doses mg/kg[a]	Species/ strain	Study item	Study number	GLP compliant
Single dose toxicity (selumetinib free base):						
1 day	Oral	0, 30, 100, 300	Rat/ Crl:CD (SD)	Central nervous, cardiovascular and respiratory systems	223-001	Yes
1 day	Oral	0, 10, 30, 100 (BID)	Monkey/ Cynomolgus		1638-213	Yes
Repeat dose toxicity (selumetinib free base):						
29 days	Oral	0, 10, 30, 100	Rat/ Crl:CD (SD)	Central nervous, cardiovascular and respiratory systems	223-002	Yes
29 days	Oral	0, 3, 10, 30 (BID)	Monkey/ Cynomolgus		1639-213	Yes
Repeat dose toxicity (selumetinib hyd-sulfate):						
7 days	Oral	0, 50.4, 151, 241.7, 342.4 (BID)	Mouse/ Alpk:ApfCD-1	Central nervous, cardiovascular and respiratory systems	0354DM	Yes
1-month	Oral	0, 11.5, 34.5, 103/68.5 (BID)	Mouse/ Alpk:ApfCD-1		0355AM	Yes
26 weeks	Oral	0, 1, 5, 20 (BID)	Mouse/ Crl:CD1		VKS/0211	Yes
MTD and 28 day	Oral	MTD 0.92 (7d), 3 (6d), 7.5 (7d), 15 (14d) (BID) then 1.5, 5, 10/5, 10/7.5 (BID)	Monkey/ Cynomolgus		VKS/0153	Yes
26 weeks	Oral	0, 0.5, 1.5, 4 (BID)	Monkey/ Cynomolgus		VKS/0210	Yes
9-month	Oral	0, 0.5, 1.5, 2.5 (BID)	Monkey/ Cynomolgus		512415	Yes

[a] Unless otherwise specified, for repeat dose studies, the highest NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) or NOEL (No Observed Effect Level), if determined, is underlined.

CD-1 マウスを用いた 7 日間、1 カ月間及び 6 カ月間の GLP 適用反復投与試験で、セルメチニブ硫酸塩の評価が行われた。マウスの 7 日間試験では、セルメチニブ硫酸塩 0、50、151、242 及び 342 mg/kg BID の投与を行った。242 mg/kg BID 以上の投与群では忍容性が不良であった。試験 2～5 日に、全動物は、活動性低下、半眼、蒼白、軟便／液状便／暗色便、腹部膨満、並びに呼吸深度増加及び／又は呼吸数減少等の一般状態悪化のため死亡又は予定より早期屠殺された。摂餌量減少及び／又は体重増加も認められた。これらの一般状態変化は健康状態不良の動物で一般に報告される所見と一致しており、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への特異的な影響によるものではないことは、これらの臓器で病理組織学的所見は報告されていないことから確認されている。151 mg/kg BID 投与群の雄 1 例も同様の症状が認められたため動物愛護の観点から試験 7 日

に屠殺された。これらの動物の死亡原因は、消化管（胃及び大腸）のびらん性・炎症性所見によるものであった。151 mg/kg BID 以上の群では、顕著な貧血及び臨床病理学的変化も認められた。50 又は 151 mg/kg BID 群の生存動物では忍容性が良好であった。本試験では、いずれの用量でも、セルメチニブ硫酸塩による中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響を示唆する一般状態の変化や病理組織学的所見は報告されていない。1 カ月試験では、セルメチニブ硫酸塩 0、11、34 及び 103/69 mg/kg BID の投与を行った。103 mg/kg BID は忍容性が不良であったため、数匹の動物が予定より早期に屠殺された。その後、1 群を追加してセルメチニブ 69 mg/kg BID の投与を行った。セルメチニブ硫酸塩 103 mg/kg BID を投与した動物で報告された一般状態変化は、健康状態不良の動物で一般に報告される所見と一致しており、蒼白、立毛、円背位、腹部膨満、活動性低下、半眼［眼漏及び眼乾燥を伴う］及び泌尿・肛門生殖器領域周囲の着色、脱毛、痂皮形成）が認められた。これら 103 mg/kg BID 群の動物の死因は、消化管のびらん性・炎症性所見と関連していた。本試験では、103/69 mg/kg BID 又はその他の用量で、呼吸器系、心血管系、中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化や病理組織学的所見は認められなかった。6 カ月試験では、雌雄マウスに 0、1、5 及び 20 mg/kg BID でセルメチニブ硫酸塩を投与したが、20 mg/kg BID を投与した雄マウスで忍容性が不良であった。これらの雄マウスで認められた一般状態の変化は動物の健康状態の悪化とも関連しており、活動性低下／無反応、立毛、円背位、呼吸異常、蒼白化等が認められた。これらの動物の主な死因は下部尿路の変化であった。本試験では、いずれの用量でも、セルメチニブ硫酸塩による中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響を示唆する一般状態の変化や病理組織学的所見は報告されていない。

ラットを用いた GLP 適用試験では、0、30、100 及び 300 mg/kg のセルメチニブ遊離塩基の単回投与の評価が行われた。いずれの用量でも忍容性は良好であった。本試験では、セルメチニブに関連した一般状態や呼吸器系の異常はみられなかった。同様に、29 日間反復投与試験でも、ラットに 0、10、30 及び 100 mg/kg/日でセルメチニブを 1 日 1 回投与したときに、行動や呼吸器系の変化は報告されなかった。これらの試験で、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に関連する病理組織学的所見は報告されておらず、セルメチニブはこれらの器官系に影響を及ぼさないことがさらに裏付けられた。また、2 年間のラットがん原性試験の用量選択のために実施された 3 カ月間の用量設定試験でも、セルメチニブ硫酸塩の評価が行われた。本試験では、セルメチニブ硫酸塩を 0、5、10、20 mg/kg/日（雄）及び 0、12.5、25、50 mg/kg/日（雌）で 1 日 1 回投与した。雄では 20 mg/kg/日、雌では 25 mg/kg/日又は 50 mg/kg/日で忍容性が認められず、数匹の動物が予定より早期に屠殺された。本試験では追加の用量群として、1 又は 2.5 mg/kg/日（雄）及び 2.5 又は 5 mg/kg/日（雌）の投与を 3 カ月間行った。本試験での主な所見は、皮膚潰瘍形成、大腿骨の骨端軟骨異形成、大腿骨髄の細胞充実性減少、及び様々な組織における鉱質化であった。本試験では、いずれの用量でも、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系にセルメチニブ硫酸塩の投与に関連する変化は認められなかった。また、ラットを用いた 2 年間のがん原性試験では、雄で 2.5 mg/kg/日、雌で 1 mg/kg/日までの用量のセルメチニブ硫酸塩の評価が行われた。本試験では、セルメチニブの投与に関連した中枢神経系、心血管系及び呼吸器系への影響を示唆する一般状態変化や病理組織学的所見は報告されなかった。

カニクイザルを用いた単回投与試験及び反復投与試験からは、セルメチニブ（遊離塩基又は硫酸塩）による心血管系への影響はないことを示すさらなるエビデンスが得られた。セルメチニブ遊離塩基の評価は、カニクイザルを用いた GLP 適用単回投与試験及び GLP 適用反復投与試験で行われた。単回投与試験では、100 mg/kg BID まで良好な忍容性が認められ、心電図、心血管生化学（トロポニン I 及び T）又は心臓の病理組織学的変化は認められなかった。反復投与試験では、サルに 30 mg/kg BID までの用量でセルメチニブ遊離塩基を 29 日間投与した。本試験での主な所見は胃腸障害であった。本試験では、いずれの用量でもセルメチニブの投与に関連する心電図の変化や心臓の病理組織学的所見は認められなかった。セルメチニブ硫酸塩の評価は、サルを

用いた 1、6 及び 9 カ月の反復投与毒性試験で行われた。これらの試験で認められた主な所見は、軟便／液状便等であった。これらの試験では、いずれの用量でも、セルメチニブに関連した心電図又は心臓の病理組織学所見は認められなかった。

小児 NF1 及び成人末期癌患者におけるセルメチニブの臨床安全性プロファイルは十分に明らかにされており、臨床試験において呼吸器系及び中枢神経系のリスクは確認されていない。左心室機能不全を誘発する可能性は、セルメチニブを投与した小児及び成人患者にみられるクラスエフェクトである。セルメチニブを投与した患者では、左心室機能不全をモニタリングし、休薬、減量又は投与中止によりリスクを管理する。

以上のように、げっ歯類及びカニクイザルを用いて実施されたセルメチニブ（遊離塩基又は硫酸塩）の GLP 適用単回投与試験及び反復投与試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するリスクは確認されていない。これらの試験成績はセルメチニブの安全薬理試験で得られた結果を裏付けるものである。左心室機能不全の臨床的リスクは既知のクラスエフェクトであり、適切なモニタリング及び対応策が実施されている。

2.6.2.4.1　中枢神経系

2.6.2.4.1.1　ラットを用いた Irwin 法によるスクリーニング試験（試験 1758/ARR/03）

一般行動、自律神経機能、神経筋機能、感覚運動機能及び体温に及ぼすセルメチニブの影響を Irwin 法によるスクリーニング試験により評価した。この試験では、覚醒した雄ラットにセルメチニブ 0（溶媒［30% w/v Captisol 注射液］）、10、30 又は 100 mg/kg を単回経口投与し、24 時間観察した。

その結果、体温への影響は認められず、セルメチニブ投与と関連すると考えられる観察所見も認められなかった。したがって、無作用量（NOEL）は 100 mg/kg であった。

2.6.2.4.2　心血管系

2.6.2.4.2.1　hERG カリウムチャネルにおける活性（試験 030819.BCP 及び 0179SZ）

セルメチニブが hERG カリウムチャネルに及ぼす影響を 0.1～10 µmol/L の設定濃度で検討した。処方液試料の分析から、被験濃度は設定値に近いことが示された。セルメチニブは hERG 電流に対して注目に値する阻害活性を示さなかった（10 µmol/L での阻害率の平均値 ± 標準誤差：8.2% ± 0.8%）。

N-脱メチル体が hERG カリウムチャネルに及ぼす影響についても 0.03～100 µmol/L の設定濃度で検討した。N-脱メチル体はこの濃度範囲で hERG 電流を阻害しなかった。

2.6.2.4.2.2　Göttingen ミニブタを用いたテレメトリー試験（試験 1759/ARR/03）

セルメチニブが動脈血圧、心拍数及び第 II 誘導心電図（QT 間隔、心拍数で補正した QTc 間隔及び PR 間隔）に及ぼす影響を、覚醒した雄 Göttingen ミニブタ 4 例にテレメトリー装置を装着し、心血管パラメータをモニタリングすることにより検討した。モニタリングは、各用量につい

て投与日の 1 回目の投与から 1 回目投与の 24 時間後まで行った。各用量は 12 時間以上の間隔を空けて 1 日 2 回経口投与した。試験した経口用量は 0（溶媒対照［30% w/v Captisol 注射液］）、3、10 及び 30 mg/kg を 1 日 2 回で、これらをクロスオーバーデザインを用いて投与し、次の用量による投与までは 2 日以上空けた（表 12 参照）。

表 12　　Göttingen ミニブタを用いたテレメトリー試験での投与デザイン

Animal number	Administration 1	Administration 2	Administration 3	Administration 4
1	3 mg/kg BID	10 mg/kg BID	30 mg/kg BID	Vehicle BID
2	10 mg/kg BID	30 mg/kg BID	Vehicle BID	3 mg/kg BID
3	30 mg/kg BID	Vehicle BID	3 mg/kg BID	10 mg/kg BID
4	Vehicle BID	3 mg/kg BID	10 mg/kg BID	30 mg/kg BID

BID: twice daily

3、10 及び 30 mg/kg BID 投与群におけるセルメチニブの血漿中 C_{max} の平均値は、それぞれ 92（5.80）、126（7.94）及び 408（25.7） ng/mL であった（値は総濃度、括弧内はミニブタでのタンパク結合率 93.7%に基づく非結合形濃度）。

セルメチニブに関連すると考えられる心血管パラメータの変化は認められなかった。したがって、NOEL は 30 mg/kg BID であった。

2.6.2.4.3　　呼吸器系

2.6.2.4.3.1　　ラットを用いた呼吸機能試験（試験 1760/ARR/03）

セルメチニブが呼吸数、1 回換気量、分時換気量、動肺コンプライアンス及び気道抵抗に及ぼす影響を、麻酔した雄ラットにセルメチニブ 0（溶媒［30% w/v Captisol 注射液］）、10、30 又は 100 mg/kg を単回強制経口投与することにより、投与 2 時間後まで検討した。これらの呼吸器系パラメータは自発呼吸しているラットにおいて、気管及び胸膜腔に外科的に留置した圧力トランスデューサーにより測定した。

最高 100 mg/kg までの単回経口投与で、1 回換気量、分時換気量、呼吸数及び動肺コンプライアンスに影響はみられなかった。なお、100 mg/kg 群では、投与 2 時間後に限って気道抵抗の軽度の上昇（溶媒群と比べて 18%高値）が認められた。NOEL は 30 mg/kg であった。

2.6.2.4.4　　消化器系

2.6.2.4.4.1　　ラットの消化管運動性（試験 1761/ARR/03）

セルメチニブが消化管の運動性に及ぼす影響をラットを用いて検討した。雄ラットにセルメチニブ 0（溶媒［30% w/v Captisol 注射液］）、10、30 又は 100 mg/kg を単回経口投与してから 30 分後、炭末懸濁液を経口投与し、炭末が 20 分間に腸管に沿って移動した距離を測定した。

セルメチニブはいずれの用量でも炭末移動距離をわずかに延長した。しかし、この影響は溶媒群と比べて統計学的に有意ではなかったため、セルメチニブ投与との関連はないと考えられる。したがって、NOEL は 100 mg/kg と考えられた。

2.6.2.4.4.2　ラットにおける胃の刺激性変化（試験 1762/ARR/03）

セルメチニブが胃に刺激性変化を引き起こすかどうかを、雄ラットにセルメチニブ 0（溶媒［30% w/v Captisol 注射液］）、10、30 又は 100 mg/kg を単回経口投与し、約 4 時間後の剖検で胃の病変を調べることにより検討した。

いずれの用量でも胃粘膜に病変が認められた。病変の発現頻度と重症度は溶媒群と 10 mg/kg 群で同程度であった。30 mg/kg 群及び 100 mg/kg 群では、発現頻度と重症度の増加が認められ、特に 100 mg/kg 群では、陽性対照群（アスピリン 20 mg/kg 投与後に 0.4 mol 濃度の塩酸 1 mL/kg を投与）と同程度であった。したがって、NOEL は 10 mg/kg と考えられた。

2.6.2.4.4.3　ラットの胃液分泌（試験 1763/ARR/03）

セルメチニブが胃液分泌に及ぼす影響を、麻酔下の雄ラットにセルメチニブ 0（溶媒［30% w/v Captisol 注射液］）、10、30 又は 100 mg/kg を単回経口投与して検討した。投与 60 分後、ラットを麻酔して評価の準備を行い、その 4 時間後、胃液の量、pH 及び酸性度を測定することにより、胃液分泌を評価した。

セルメチニブは胃液分泌パラメータに影響を及ぼさなかった。したがって、NOEL は 100 mg/kg であった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6　考察及び結論

2.6.2.6.1　効力を裏付ける試験

セルメチニブは、経口投与可能な、ATP と競合しない、強力かつ選択的な MEK1/2 阻害薬である。これらの特性は、*in vitro* 酵素アッセイ、腫瘍細胞株、ヒト腫瘍異種移植モデル及びマウス NF1 モデル（ヒト NF1 の遺伝子型及び表現型を忠実に再現する神経線維腫が発生する遺伝子改変マウスモデル）により示されている。2 種類のマウス神経線維腫モデルでは、セルメチニブは ERK のリン酸化を阻害し、神経線維腫の腫瘍容積、増殖、数及び成長を抑制した。腫瘍異種移植モデルでは、セルメチニブを一定の用量範囲（臨床的に意味のある血漿中濃度を達成する用量を含む）で単回経口投与した後、腫瘍組織で ERK のリン酸化が時間依存的及び用量依存的に抑制されることが示された。臨床的に意味のある曝露量を達成する用量を投与したとき、ERK リン酸化の最大阻害率は 40%～80%であった。マウス神経線維腫モデルにおいて標的経路の阻害は 40%～60%の範囲であったことから、マウスモデルで神経線維腫の形成及び成長を抑制するためには、MEK 活性を完全に阻害する必要はないことが示唆された。

動物を用いた非臨床試験で、セルメチニブの 2 種類の微量代謝物、N-脱メチル体及びアミド体が検出された。アミド体の薬理活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下であり、この代謝物はマウスで検出された。N-脱メチル体の薬理活性はセルメチニブの 3～5 倍であり、この代謝物はマウスで検出された。したがって、N-脱メチル体はセルメチニブ投与後に達成される血漿中曝露量次第では、観察された RAF/MEK/ERK 経路のシグナル伝達阻害及び非臨床薬理試験で観察された抗腫瘍効果に寄与する可能性があるが、アミド体については、この可能性はないと考えられる。主

要代謝物であるセルメチニブの O-グルクロン酸抱合体は、生化学的アッセイと細胞アッセイのいずれでも、10 µmol/L までの濃度で、MEK に対して阻害活性を示さなかった。

2.6.2.6.2　副次的薬理試験及び安全性薬理試験

副次的薬理試験及び安全性薬理試験から得られた所見について考察する際は、セルメチニブを推奨臨床用量 25 mg/m^2 1 日 2 回で投与したときのセルメチニブの非結合形 C_{max} が 11.69 ng/mL（0.026 µmol/L）、N-脱メチル体の非結合形 C_{max} が 1.13 ng/mL（0.003 µmol/L）であることを踏まえる必要がある（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項を参照）。以下の考察で示した非結合形曝露量に関する倍数は、セルメチニブの血漿タンパク結合率が動物種により異なる（ラットで 99.7%、Göttingen ミニブタで 93.7%、ヒトで 98.4%）ことを考慮している（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項を参照）。

副次的薬理試験では、セルメチニブ及び N-脱メチル体は、10 µmol/L までの濃度で試験したとき、それぞれ PRKG1 及び MEK1 の活性を 50%超阻害することが示された。これらの試験データから、予定しているヒト最大用量では、PRKG1 の占有（したがって薬理作用）は無視できると考えられる。本概要文の効力を裏付ける試験の項（2.6.2.2 項を参照）で述べたように、セルメチニブと N-脱メチル体は MEK1 阻害活性を有する。副次的薬理試験で N-脱メチル体の MEK1 阻害活性が低かったのは、使用するアッセイフォーマットの違いによるものと考えられる。

ラットにセルメチニブ 30 及び 100 mg/kg を投与すると、胃に刺激性変化が認められた。しかし、セルメチニブの遊離塩基を最高 100 mg/kg/日の用量でラットに 29 日間投与した毒性試験では、胃に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（毒性試験の概要文 2.6.6.3.1.2 項を参照）。非臨床毒性試験で検討したセルメチニブが消化管に及ぼす影響については、毒性試験の概要文 2.6.6.9.4 項で詳しく考察する。

ラットを用いた呼吸器系試験では、100 mg/kg を単回投与後、気道抵抗のわずかな増加が認められた。ラットを用いた 29 日間の毒性試験では、セルメチニブ遊離塩基 100 mg/kg/日の投与は忍容性良好で、一般状態の評価で呼吸器系に所見は認められず、病理組織学的検査でもこの用量で肺にセルメチニブと関連する所見は認められなかった。

ラットを用いた安全性薬理試験では、セルメチニブの血漿中濃度は測定しなかった。同じ被験物質（セルメチニブ遊離塩基）と処方を用いて実施した 29 日間のラット毒性試験（試験 223-002、毒性試験の概要文 2.6.6 項を参照）の 1 日目のトキシコキネティクスデータから、ラット安全性薬理試験でセルメチニブ 10、30 及び 100 mg/kg を投与したときのセルメチニブの非結合形 C_{max} 値は、それぞれ約 43、55 及び 72 ng/mL であった。これらは、推奨臨床用量 25 mg/m^2 BID を投与したときの非結合形 C_{max} 値（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項を参照）のそれぞれ 4、5 及び 6 倍の曝露に相当する。

ミニブタテレメトリー試験では、セルメチニブは試験した最高用量（30 mg/kg BID）まで心血管系パラメータに影響を及ぼさなかった。この試験で達成されたセルメチニブの非結合形 C_{max} 値は、推奨臨床用量 25 mg/m^2 BID を投与したときの非結合形 C_{max} 値と同程度であった。

げっ歯類及びカニクイザルを用いて実施されたセルメチニブ（遊離塩基又は硫酸塩）の GLP 適用単回投与試験及び反復投与試験において、中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対するリスクは確認されなかった。これらの試験成績はセルメチニブの安全薬理試験で得られた結果を裏付けるものであった。

セルメチニブ硫酸塩を 2.5 mg/kg BID 及び 20 mg/kg BID（9 カ月間及び 26 週間反復投与毒性試験での最高用量）投与したときの曝露量は、臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）を患者に投与したときの臨床曝露量の最高 1.4 倍（サル）又は 28 倍（マウス）であった（毒性試験の概要文 2.6.6.9.1 項を参照）。サルを用いた 28 日間での無毒性量及び 26 週間試験での最小毒性量はいずれも 1.5 mg/kg BID であり、マウスを用いた 26 週間試験では最小毒性量が 1 mg/kg BID であったが、これらを投与したときの曝露量（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［$AUC_{(0\text{-}12)}$］）は、小児患者に 25 mg/m^2 BID を投与したときの曝露量と同程度であった（毒性試験の概要文 2.6.6.9.1 項を参照）。

このように、*in vitro* 及び *in vivo* の効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験で認められたセルメチニブの特性は、申請適応症の治療で本剤を患者に投与する上で許容可能と考えられる。

2.6.2.7　図表

図表は、本文中の適切な場所に記載した。

2.6.2.8　参考文献

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.

Bollag et al 1991

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

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 2015;15(10):577-92.

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;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.　doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1577.　Epub 2010 Mar 9. PMID: 20215513.

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. doi: 10.18632/oncotarget.7232.

ICH M3(R2)

ICH M3(R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals; June 2009.　Available from: https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2__Guideline.pdf

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

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.

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.

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.

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.

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.

第 2 部　CTD の概要

一般名：セルメチニブ硫酸塩

版番号：[redacted]

2.6.3　薬理試験概要表
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
2.6.3.1　薬理試験：一覧表..... 3
2.6.3.2　効力を裏付ける試験..... 7
2.6.3.3　副次的薬理試験..... 7
2.6.3.4　安全性薬理試験..... 8
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験..... 9

2.6.3.1　　薬理試験：一覧表

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	CTD Module No.
1.1 Primary pharmacodynamics					
Kinase selectivity in biochemical enzyme assays	AZD6244 tested against a panel of kinases deriving either an IC_{50} or single data point at 10 μM AZD6244	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 01	4.2.1.1.1
Selective inhibition of MEK1/2 by selumetinib in cultured tumours cells by measurement of ERK phosphorylation	A panel of tumour cell lines, ERK phosphorylation measured by a PACE assay (Probe Assay—Chemiluminescence Enhanced). Pathway selectivity measure in cultured cells by western blot assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 02	4.2.1.1.2
Inhibition of MEK1/2 by the N-desmethyl metabolite of selumetinib in cultured tumours cells by measurement of ERK phosphorylation	A panel of tumour cell lines, ERK phosphorylation measured by a PACE assay (Probe Assay—Chemiluminescence Enhanced)	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 05	4.2.1.1.3
Inhibition of tumour cell viability by the N-desmethyl metabolite of selumetinib	A panel of tumour cell lines. Viable cell number was determined using the MTS proliferation assay	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 06	4.2.1.1.4
Inhibition of phorbol ester (TPA) stimulated ERK phosphorylation in whole blood *in vitro* by selumetinib and metabolite, N-desmethyl selumetinib	Human whole blood derived leucocytes. ERK phosphorylation measured by flow cytometry assay	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 07	4.2.1.1.5

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	CTD Module No.
Inhibition of MEK1/2 in tumour cell lines by selumetinib and the amide metabolite of Selumetinib by ERK phosphorylation	A panel of tumour cell lines, ERK phosphorylation measured by a PACE assay (Probe Assay—Chemiluminescence Enhanced)	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 08	4.2.1.1.6
Inhibition of the growth of human lung Calu-6 xenograft tumours. Dose response	Calu-6 human tumour xenograft	*In vivo*	AstraZeneca UK	Pharmacology report 09	4.2.1.1.7
Inhibition of the growth of human lung Calu-6 xenograft tumours. Dose response	Calu-6 human tumour xenograft	*In vivo*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 10	4.2.1.1.8
Inhibition of MEK1/2 *in vivo* in human lung Calu-6 xenograft tumours by measurement of ERK phosphorylation	Calu-6 human tumour xenograft. ERK phosphorylation measured by western blot and immunohistochemistry. Plasma drug concentration determination	*In vivo*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 12	4.2.1.1.9
Inhibition of tumour cell viability by selumetinib	A panel of human tumour cell lines. Viable cell number was determined using the MTS Colorimetric Assay	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 35	4.2.1.1.10
In vitro inhibition of MEK1/2 enzyme by selumetinib	Recombinant MEK1/2 enzyme FRET-Based Z'-Lyte Kinase Activity Assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], UK	Pharmacology Report 45	4.2.1.1.11
In vitro inhibition of MEK1/2 enzyme by selumetinib	Recombinant MEK1/2 enzyme radiometric kinase assays	*In vitro*	AstraZeneca, UK [redacted], USA	Pharmacology Report 46	4.2.1.1.12

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	CTD Module No.
Inhibition of MEK1/2 *in vivo* in human lung Calu-6 xenograft tumours by measurement of ERK phosphorylation	Calu-6 human tumour xenograft. ERK phosphorylation measured by western blot. Plasma drug concentration determination	*In vivo*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 47	4.2.1.1.13
Evaluation of the effects of Selumetinib in the *Nf1fl/fl;DhhCre* mouse model of neurofibroma. Assessment of the effect of selumetinib on tumour growth and MEK inhibition	Genetically modified model of NF1 related neurofibroma. ERK phosphorylation measured by western blot	*In vivo*	[redacted], USA [redacted], USA AstraZeneca, USA	Pharmacology Report 54	4.2.1.1.14
Evaluation of the effects of Selumetinib in the *Nf1*$^{flox/flox}$;*Postn-Cre* mouse model of neurofibroma	Genetically modified model of NF1 related neurofibroma. ERK phosphorylation measured by western blot and immunohistochemistry	*In vivo*	[redacted], USA	Pharmacology Report 55	4.2.1.1.15
In vitro inhibition of MEK1 (MAPK2K1) enzyme by Selumetinib. ATP competition assessment	Human recombinant MEK1 enzyme [γ-^{33}P] ATP -Based Radiometric Assay	*In vitro*	AstraZeneca, Sweden	Pharmacology Report 56	4.2.1.1.16
Inhibition of MEK1/2 by the M2 metabolite of selumetinib in cultured tumours cells by measurement of ERK phosphorylation	Tumour cell lines. Quantitative western blotting	*In vitro*	AstraZeneca, UK	Pharmacology Report 57	4.2.1.1.17

Type of Study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	CTD Module No.
1.2 Secondary pharmacodynamics					
Selumetinib and N-desmethyl selumetinib: Selectivity Screening in Radioligand Binding and Enzyme Assays *In vitro*	Receptors, enzymes, ion channels and transporters	*In vitro*	[redacted] Ltd, Taiwan	0320SY	4.2.1.2.1
1.3 Safety pharmacology					
Selumetinib: Central nervous system (Modified Irwin screen)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	[redacted], Switzerland	1758/ARR/03	4.2.1.3.1
Selumetinib: Cardiovascular (hERG channel)	hERG expressing HEK-293 cells	*In vitro*	[redacted], Inc., USA	030819.BCP	4.2.1.3.2
N-desmethyl selumetinib: Cardiovascular (hERG channel)	hERG expressing CHO cells	*In vitro*	AstraZeneca, UK	0179SZ	4.2.1.3.3
Selumetinib: Cardiovascular (conscious telemetered minipig)	Göttingen Minipig	Oral (gavage)	[redacted], Switzerland	1759/ARR/03	4.2.1.3.4
Selumetinib: Respiratory (anaesthetised rat)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	[redacted], Switzerland	1760/ARR/03	4.2.1.3.5
Selumetinib: Gastrointestinal (Charcoal propulsion)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	[redacted], Switzerland	1761/ARR/03	4.2.1.3.6
Selumetinib: Gastrointestinal (Gastric irritation)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	[redacted], Switzerland	1762/ARR/03	4.2.1.3.7
Selumetinib: Gastrointestinal (Gastric secretion)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	[redacted], Switzerland	1763/ARR/03	4.2.1.3.8
1.4 Pharmacodynamic drug interactions					
No studies conducted.					

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験で得られた成績は、薬理試験の概要文 2.6.2 項に要約を示している。

2.6.3.3　副次的薬理試験

Assay	Species/ strain	Method of administration	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Selumetinib and N-desmethyl selumetinib: Selectivity Screening in Radioligand Binding and Enzyme Assays *In vitro*	Not applicable	In vitro	10 µM	Not applicable	Selumetinib had significant (defined as >50% inhibition) activity in 1 out of 305 *in vitro* radioligand binding and enzyme assays when tested at a concentration of 10 µM. This was the Protein Serine/Threonine kinase PRKG1 assay in which selumetinib demonstrated 53% inhibition. N-desmethyl selumetinib had significant (defined as >50% inhibition) activity in 1 out of 336 *in vitro* radioligand binding and enzyme assays when tested at a concentration of 10 µM. This was the Protein Serine/Threonine kinase MEK1 assay in which N-desmethyl selumetinib demonstrated 84% inhibition.	[redacted] Ltd, Taiwan	0320SY

Study 0320SY is not GLP-compliant.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses (mg/kg)[a]	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	GLP compliance	Study number
Central nervous system	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	0, 10, 30, 100 mg/kg	5 M	Single oral administration of selumetinib at dose levels of up to 100 mg/kg produced no effects on behavioural indices or body temperature for up to 24 hours post-dose.	[redacted], Switzerland	Yes	1758/ARR/03
Cardio-vascular system	hERG-expressing HEK-293 cells	*In vitro*	Selumetinib: 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM	Not applicable	Selumetinib produced no noteworthy effects on hERG current at concentrations of up to 10 µM.	[redacted], Inc., USA	Yes	030819.BCP
Cardio-vascular system	hERG-expressing CHO cells	*In vitro*	N-desmethyl selumetinib: 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µM	Not applicable	N-desmethyl selumetinib produced no effects on hERG current at concentrations of up to 100 µM.	AstraZeneca, UK	No	0179SZ
Cardio-vascular system	Conscious telemetered Göttingen Minipig	Oral (gavage)	0, 3, 10, 30 mg/kg BID. Cross over design.[b]	4 M	Oral administration of selumetinib at dose levels of up to 30 mg/kg BD produced no effects on heart rate, blood pressure or Lead II ECG intervals.	[redacted], Switzerland	Yes	1759/ARR/03
Respiratory	Rat / Sprague-Dawley (anaesthetised)	Oral (gavage)	0, 10, 30, 100 mg/kg	8 - 12 M (to give 8 valid animals per group)	Single oral administration of selumetinib at dose levels of up to 100 mg/kg produced no effects on tidal volume, respiratory rate, lung dynamic compliance, or minute volume for up to 2 hours post-dose. Airway resistance was slightly increased (by 18% above vehicle) at 2 hour following 100 mg/kg only.	[redacted], Switzerland	Yes	1760/ARR/03
GI (motility; charcoal propulsion)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	0, 10, 30, 100 mg/kg	10 M	Single oral administration of selumetinib at dose levels of up to 100 mg/kg, 30 minutes prior to a charcoal meal, produced no effects on gastric motility.	[redacted], Switzerland	Yes	1761/ARR/03

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses (mg/kg)[a]	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	GLP compliance	Study number
GI (gastric irritation)	Rat / Sprague-Dawley	Oral (gavage)	0, 10, 30, 100 mg/kg	10 M	An increased the incidence and severity of stomach mucosal lesions was observed at 4 hours after single oral administration of 100 mg/kg selumetinib.	[redacted], Switzerland	Yes	1762/ARR/03
GI (gastric secretion)	Rat / Sprague-Dawley (anaesthetised)	Oral (gavage)	0, 10, 30, 100 mg/kg	10 M	Single oral administration of selumetinib at dose levels of up to 100 mg/kg produced no effects on gastric secretion in anaesthetised rats.	[redacted], Switzerland	Yes	1763/ARR/03

M - male.

a　Single dose unless specified otherwise.

b　Twice daily administration, with 2 doses given a minimum of 12 hours apart on each day of dosing.

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。