用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
ALK	anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
FAK	focal adhesion kinase	－
JAK2	Janus kinase 2	ヤヌスキナーゼ 2
NTRK	neurotrophic receptor kinase	神経栄養因子キナーゼ受容体
ROS1	receptor tyrosine kinase encoded by the ROS1 gene	－
SRC	tyrosine kinase first identified in avian sarcoma virus	－
TKI	tyrosine kinase inhibitor	チロシンキナーゼ阻害剤
TRK	tropomyosin receptor kinase	トロポミオシン受容体キナーゼ

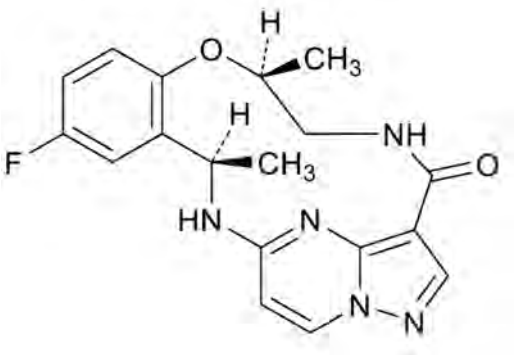
1 緒言

Repotrectinib（別名：TPX-0005、BMS-986472）は、受容体型チロシンキナーゼの ROS1、トロポミオシン受容体キナーゼ（TRK）及び未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）に対するアデノシン三リン酸（ATP）競合型の経口投与可能な低分子阻害剤である。

ROS1 遺伝子、NTRK1、NTRK2 及び NTRK3 遺伝子（それぞれ TRKA、TRKB 及び TRKC をコードする）又は ALK 遺伝子の再構成に由来する融合タンパク質は、発がんドライバーとして同定されている。ROS1、TRK 及び ALK の融合タンパク質を標的とする臨床的ベネフィットは数多く報告されており、これらの遺伝子再構成を有する患者に対して複数のチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）が承認されている。既存の TKI の多くは、高い結合親和性を得るために分子サイズが大きく、ATP 結合ポケットの外でもキナーゼドメインと相互作用するため、solvent front 変異のような薬剤結合を立体的に遮断する獲得耐性変異に対して脆弱である。TKI に対して生じるこのような耐性を克服するため、Repotrectinib は標的キナーゼの ATP 結合ポケット内に結合するコンパクト（低分子量）で強固な三次元大環状構造を有する TKI として設計された。Repotrectinib は ATP 結合ポケットの内側に完全に収まる形で結合することにより、従来の TKI との結合を立体的に遮断する solvent front 変異型にも結合することが可能である。

効力を裏付ける薬理試験において、Repotrectinib は、in vitro 及び in vivo でキナーゼドメインが野生型並びに solvent front 変異などの変異型の ROS1、TRKA、TRKB、TRKC 及び ALK を強力に阻害した。Repotrectinib は、これらの標的キナーゼに加え、SRC、FAK 及び JAK2 のキナーゼ活性も低ナノモル濃度の 50%阻害濃度で阻害した。

Repotrectinib の分子式は $C_{18}H_{18}FN_5O_2$、分子量は 355.37 である。化学構造を以下に示す。



本申請における効能又は効果、用法及び用量の案を以下に示す。

【効能又は効果】

ROS1 融合遺伝子陽性の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌

【用法及び用量】

通常、成人には Repotrectinib として 1 回 160 mg を 1 日 1 回 14 日間経口投与する。その後、1 回 160 mg を 1 日 2 回経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

Table of Contents

1 まとめ 10
2 効力を裏付ける試験 14
2.1 WT 及び変異型の ROS1、ALK 及び TRK ファミリーキナーゼのキナーゼ活性に対する Repotrectinib の阻害活性 14
2.2 セルベースアッセイにおける Repotrectinib による細胞増殖抑制並びにキナーゼ自己リン酸化及び下流のシグナル伝達分子リン酸化の阻害 15
2.2.1 ROS1 融合タンパク質及びその変異型を発現する細胞株における Repotrectinib の活性 15
2.2.1.1 SDC4-ROS1 及び CD74-ROS1 融合タンパク質並びにそれらの変異型を遺伝子導入した Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性 15
2.2.1.2 CD74-ROS1 融合タンパク質並びにその変異型 G2032R、L2026M 及び D2033N を遺伝子導入した NIH3T3 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化の阻害 16
2.2.2 TRK 融合タンパク質及びその変異型を発現する細胞株における Repotrectinib の活性 17
2.2.2.1 TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現する KM12 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性並びに TPM3-TRKA 自己リン酸化及びその下流のシグナル伝達分子リン酸化の阻害活性 17
2.2.2.2 TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を遺伝子導入した Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性 19
2.2.2.3 WT 並びに変異型の LMNA-TRKA 及び TEL-TRKB を遺伝子導入した NIH3T3 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化の阻害 19
2.2.3 ALK 融合タンパク質及びその変異型を発現する細胞株における Repotrectinib の活性 21
2.2.3.1 NPM-ALK 融合遺伝子を内因性に発現する Karpas299 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性 21
2.2.3.2 Karpas299 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化及び ALK 下流のシグナル伝達分子のリン酸化の阻害 22
2.2.3.3 EML4-ALK v1 融合タンパク質（WT 及び変異型）を遺伝子導入した Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性 23
2.2.3.4 EML4-ALK v1 融合タンパク質又はその変異型 G1202R を遺伝子導入した Ba/F3 細胞及び NIH3T3 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化の阻害 24
2.3 マウス担がんモデルにおける Repotrectinib の in vivo 抗腫瘍効果 26
2.3.1 ROS1 融合タンパク質（WT 及び変異型）発現細胞移植マウスにおける評価 26
2.3.1.1 雌性胸腺欠損ヌードマウスの SDC4-ROS1 WT 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 26
2.3.1.2 雌性胸腺欠損ヌードマウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 27

2.3.1.3 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 又は CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 28
2.3.1.4 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib 単回及び反復投与時の血漿中薬物濃度及び薬力学作用 30
2.3.2 TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）発現細胞移植マウスにおける評価 32
2.3.2.1 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果（高用量投与） 32
2.3.2.2 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果及び薬物動態（用量反応性） 33
2.3.2.3 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA WT 又は LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果及び薬物動態 35
2.3.2.4 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時の血漿中薬物濃度及び PD 作用 39
2.3.3 ALK 融合タンパク質（WT 及び変異型）発現細胞移植マウスにおける評価 40
2.3.3.1 雌性 SCID/Beige マウスの NPM-ALK 発現 Karpas299 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果、血漿中薬物濃度及び PD 作用 40
2.3.3.2 雌性胸腺欠損ヌードマウスの EML4-ALK v1 WT 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 42
2.3.3.3 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 WT 又は EML4-ALK v1 G1202R 発現 Ba/F3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 44
2.3.3.4 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1（WT 若しくは G1202R）又は CD74-ROS1（WT 若しくは G2032R）発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib BID 反復投与時の薬物動態 45
2.4 Repotrectinib のキナーゼ選択性 47
2.4.1 キナーゼ選択性スクリーニング評価 47
2.4.2 Repotrectinib のキナーゼ阻害活性（副次的標的） 48
2.4.3 H2228 及び HT1080 細胞株における SRC/FAK 及びそれらの関連シグナル経路に対する Repotrectinib の活性 50
2.4.3.1 H2228 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性並びにキナーゼ自己リン酸化及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化の阻害活性 50
2.4.3.2 HT1080 及び H2228 細胞における細胞遊走の阻害 51
2.4.4 SET2 細胞における Repotrectinib の JAK2 V617F に対する活性 54
3 副次的薬理試験 55
3.1 安全性スクリーニングパネルを用いた評価 55
4 安全性薬理試験 56
4.1 hERG、hNav1.5 及び hCav1.2 チャネル阻害 56
5 薬力学的薬物相互作用試験 57
6 考察及び結論 57

7 参考文献 60

List of Tables

Table 2.1-1: ROS1、ALK 及び TRK ファミリーキナーゼ並びにそれらの変異型に対する Repotrectinib の阻害活性 14

Table 2.2.1.1-1: SDC4-ROS1 及び CD74-ROS1 融合タンパク質並びにそれらの変異型を発現する Ba/F3 細胞における Repotrectinib 及び他の ROS1 阻害剤の細胞増殖抑制活性 16

Table 2.2.2.1-1: TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現する KM12 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性 18

Table 2.2.2.2-1: TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を遺伝子導入した Ba/F3 細胞に対する Repotrectinib 及び他の TRK 阻害剤の細胞増殖抑制作用 19

Table 2.2.3.1-1: NPM-ALK 融合遺伝子を内因性に発現する Karpas299 細胞における Repotrectinib 及び他の ALK 阻害剤の細胞増殖抑制作用の比較 22

Table 2.2.3.3-1: EML4-ALK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を発現する Ba/F3 細胞に対する Repotrectinib 及び ALK 阻害剤の細胞増殖抑制作用 24

Table 2.3.1.4-1: 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルの腫瘍組織における CD74-ROS1 の自己リン酸化に対する Repotrectinib 単回及び反復投与の効果 31

Table 2.3.1.4-2: 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 単回及び反復投与時の血漿中濃度 32

Table 2.3.2.2-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与後の薬物動態パラメータ 35

Table 2.3.2.3-1: 胸腺欠損ヌードマウス LMNA-TRKA NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時（Day 12）の血漿中 PK パラメータ 38

Table 2.3.2.4-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時の PD 作用及び血漿中薬物濃度 39

Table 2.3.3.1-1: 雌性 SCID/Beige マウスの Karpas299 腫瘍担がんモデルにおける NPM-ALK、STAT3、AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対する Repotrectinib 7 日間 BID 投与時の PD 作用 42

Table 2.3.3.1-2: 雌性 SCID/Beige マウスの Karpas299 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 7 日間 BID 投与時の血漿中薬物濃度 42

Table 2.3.3.4-1: SCID/Beige マウス皮下移植担がんモデルに 75 mg/kg BID 反復経口投与時の Repotrectinib の血漿中 PK パラメータ 46

Table 2.4.1-1: Repotrectinib に対する結合シグナル（%Ctrl）が 10%未満のヒトキナーゼ 47

Table 2.4.1-2: Repotrectinib の ROS1、ALK 並びに TRKA、TRKB 及び TRKC に対する解離定数 48

Table 2.4.2-1: Repotrectinib のキナーゼ阻害活性（副次的標的） 49

Table 2.4.3.2-1: トランスウェル遊走アッセイにおける Repotrectinib 及び Saracatinib による H2228 細胞の遊走阻害 54

Table 3.1-1: アデノシン A_{2A}受容体、Ca^{2+}チャネルのリガンド結合並びに LCK のキナーゼ活性に対する Repotrectinib の阻害活性 56

Table 4.1-1: hERG カリウムチャネルに対する Repotrectinib の阻害作用 57

List of Figures

Figure 2.2.1.2-1: CD74-ROS1 の WT 及び変異型融合タンパク質の自己リン酸化に対する Repotrectinib 及びクリゾチニブの阻害作用 17

Figure 2.2.2.1-1: KM12 細胞における TPM3-TRKA の自己リン酸化及びその下流のシグナル伝達分子 AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対する Repotrectinib の作用 18

Figure 2.2.2.3-1: 遺伝子導入 NIH3T3 細胞における WT 及び変異型 TRK の自己リン酸化に対する Repotrectinib の作用 20

Figure 2.2.3.2-1: Karpas299 細胞における NPM-ALK 及び下流のシグナル伝達分子 STAT3、AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対する Repotrectinib の作用 23

Figure 2.2.3.4-1: 遺伝子導入 Ba/F3 細胞における EML4-ALK WT 及び変異型タンパク質の自己リン酸化に対する Repotrectinib の作用 25

Figure 2.2.3.4-2: 遺伝子導入 NIH3T3 細胞における EML4-ALK WT 及び変異型タンパク質の自己リン酸化に対する Repotrectinib の作用 25

Figure 2.3.1.1-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの SDC4-ROS1 WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 27

Figure 2.3.1.2-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 28

Figure 2.3.1.3-1: 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 WT 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 29

Figure 2.3.1.3-2: 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 30

Figure 2.3.2.1-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現ヒト KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 33

Figure 2.3.2.2-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果（用量反応性） 34

Figure 2.3.2.2-2: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与後の血漿中薬物濃度推移 35

Figure 2.3.2.3-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 及びエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 36

Figure 2.3.2.3-2: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 及びエヌトレクチニブの抗腫瘍効果 37

Figure 2.3.2.3-3: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA（WT 及び G595R）発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時の血漿中薬物濃度推移..... 38

Figure 2.3.3.1-1: 雌性 SCID/Beige マウスの NPM-ALK 発現 Karpas299 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 41

Figure 2.3.3.2-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの EML4-ALK v1 WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 43

Figure 2.3.3.3-1: 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 WT 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 44

Figure 2.3.3.3-2: 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 G1202R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果 45

Figure 2.3.3.4-1: 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1（WT 若しくは G1202R）又は CD74-ROS1（WT 若しくは G2032R）発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib（75 mg/kg/dose）BID 反復経口投与時の血漿中薬物濃度推移..... 46

Figure 2.4.1-1: Repotrectinib とヒトキノーム並びに非定型、脂質、病原体及び変異型キノームとの相互作用マップ..... 48

Figure 2.4.3.1-1: Repotrectinib の ALK、SRC、FAK 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する阻害活性並びに ALK 及び SRC ファミリー阻害剤との比較 51

Figure 2.4.3.2-1: 創傷治癒アッセイにおける Repotrectinib 及び他の ALK 阻害剤の HT1080 細胞の遊走に対する作用..... 52

Figure 2.4.3.2-2: 創傷治癒アッセイにおける HT1080 細胞の遊走に対する Repotrectinib 及び Saracatinib の濃度依存的作用 53

Figure 2.4.3.2-3: トランスウェル遊走アッセイにおける H2228 細胞の遊走に対する Repotrectinib と Saracatinib の作用 53

Figure 2.4.4-1: SET2 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性 54

Figure 2.4.4-2: SET2 細胞の STAT5 リン酸化に対する Repotrectinib の作用..... 55

用語及び略号一覧

略号	英語	日本語
ALK	anaplastic lymphoma kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ANOVA	analysis of variance	分散分析
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
$AUC_{(0\text{-}12h)}$	area under curve from 0 to 12 hour	0 時間から 12 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
BID	twice daily	1 日 2 回
$C_{average}$	average plasma concentration	平均血漿中濃度
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CMC	sodium carboxymethylcellulose	カルボキシメチルセルロースナトリウム
$C_{ss, max}$	maximum plasma concentration at steady state	定常状態の最高血漿中濃度
C_{trough}	plasma concentration at the end of a dosing interval	血漿中トラフ濃度
DMSO	dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
ERK	extracellular signal–regulated kinase	―
FAK	focal adhesion kinase	―
fu	unbound fraction	非結合形分率
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
hCav1.2	human voltage-gated calcium channel 1.2	ヒト電位依存性カルシウムチャネル 1.2
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
hNav1.5	human voltage-gated sodium channel 1.5	ヒト電位依存性ナトリウムチャネル 1.5
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
JAK	Janus kinase	ヤヌスキナーゼ
Kd	dissociation constant	解離定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
MET	mesenchymal-epithelial transition	―

略号	英語	日本語
NA	not applicable	該当せず
NSCLC	non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
NT	not tested	測定せず
NTRK	neurotrophic receptor kinase	神経栄養因子キナーゼ受容体
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetics	薬物動態
ROS1	receptor tyrosine kinase encoded by the ROS1 gene	－
SCID	severe combined immunodeficiency	重症複合型免疫不全
SEM	standard error of mean	標準誤差
SRC	tyrosine kinase first identified in avian sarcoma virus	－
STAT	signal transducer and activator of transcription	－
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TGI	tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制率
T_{max}	time to C_{max}	最高血漿中濃度到達時間
TRK	tropomyosin receptor kinase	トロポミオシン受容体キナーゼ
v1	variant 1	バリアント 1
WT	wild type	野生型

1 まとめ

Repotrectinib（別名：TPX-0005、BMS-986472）は、受容体型チロシンキナーゼの ROS1、トロポミオシン受容体キナーゼ（TRK）及び未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）の活性化型キナーゼ構造を標的とする、アデノシン三リン酸（ATP）競合型の経口投与可能な低分子阻害剤である。Repotrectinib は、分子量が小さく（分子量：355.37）、強固な三次元大環状構造を有しており、既存のキナーゼ阻害剤に対し臨床で生じる様々な耐性変異、特に solvent front 変異による立体障害を回避する[1,2]。

ROS1 遺伝子、NTRK1、NTRK2 及び NTRK3 遺伝子（それぞれ TRKA、TRKB 及び TRKC をコードする）又は ALK 遺伝子の再構成を有する進行固形癌患者を対象とした Repotrectinib の臨床開発の妥当性を裏付けるため、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からなる広範な非臨床薬理評価を実施した。Repotrectinib の効力を裏付ける試験として、チロシンキナーゼ ROS1、TRKA、TRKB、TRKC 及び ALK 並びに臨床で生じるそれらの耐性変異型のキナーゼ活性に対する阻害作用を評価する in vitro 試験を実施した。ヒトがん細胞株及び標的がん遺伝子を安定的に発現する遺伝子導入細胞株を用いて、Repotrectinib の標的である発がん性の融合タンパク質及びそれらのシグナル経路下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する阻害作用並びに細胞増殖抑制作用を評価した。また、マウス担がんモデルにおける in vivo 試験を実施し、Repotrectinib の腫瘍増殖抑制効果を評価すると共に、標的分子の自己リン酸化及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化の阻害並びに Repotrectinib の血漿中曝露量との関係性を評価した。456 種類のヒトキナーゼパネルを用いて、Repotrectinib のキナーゼ選択性を広範に評価し、さらに細胞アッセイを実施して他の潜在的な標的の有無について評価した。副次的薬理試験では、重要な生理活性に関与する 44 種類のタンパク質からなるパネルを用いて Repotrectinib の選択性を評価した。安全性薬理試験では、独立した in vivo 安全性薬理試験は実施しなかったが、医薬品規制調和国際会議（ICH）S9 のガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）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）適合の反復投与毒性試験に組み込んで実施した心電図評価（サル）並びに呼吸系又は中枢神経系への影響を示唆する症状の有無について詳細な症状観察（ラット及びサル）を実施した。また、ヒトイオンチャネル［ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）、ヒト電位依存性ナトリウムチャネル 1.5（hNav1.5）及びヒト電位依存性カルシウムチャネル 1.2（hCav1.2）］に対する Repotrectinib の影響をパッチクランプ法による電気生理学的手法を用いて in vitro で評価した。

<u>ROS1 融合タンパク質及びその変異型に対する Repotrectinib の活性</u>：

ROS1 遺伝子再構成は非小細胞肺癌（NSCLC）における発がんドライバー遺伝子変異として同定されており[3,4]、ALK/ROS1/MET 阻害剤のクリゾチニブは ROS1 再構成を有する NSCLC 患者の治療において顕著な有効性を示している[5]。しかし、クリゾチニブ耐性患者において ROS1 の solvent front 変異（キナーゼドメインの solvent front と呼ばれる部位に生じる変異）型である G2032R 及び D2033N が報告されている[6,7]。

In vitro において、Repotrectinib はキナーゼドメインが野生型（WT）の ROS1 及びその solvent front 変異型 ROS1 G2032R のキナーゼ活性を強力に阻害した［各 50%阻害濃度（IC_{50}）：0.0706 及び 0.456 nM］。遺伝子導入 NIH3T3 細胞株を用いたセルベースアッセイにおいて、Repotrectinib はキナーゼドメインが WT の CD74-ROS1 融合タンパク質の自己リン酸化を阻害し（IC_{50}：< 1 nM）、そのキナーゼドメインの変異型 G2032R、L2026M 及び D2033N の自己リン酸化も阻害した（各 IC_{50}：3、10 及び 1 nM）。また、Repotrectinib は WT の SDC4-ROS1 及びその変異型の G2032R 並びに WT の CD74-ROS1、その変異型の G2032R、L2026M 及び D2033N を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞株の細胞増殖を抑制した（各 IC_{50}：< 0.2、3、< 0.2、8.4、10 及び 0.15 nM）。

In vivo マウス担がんモデルにおいて、Repotrectinib は、SDC4-ROS1 若しくは CD74-ROS1 WT 又はそれらの G2032R 変異型を発現する腫瘍の増殖及びこれらのキナーゼの自己リン酸化を顕著に阻害した。CD74-ROS1 WT を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞を皮下移植したマウス担がんモデルに、Repotrectinib を 15 mg/kg/dose の用量で 1 日 2 回（BID）経口投与した結果、完全な腫瘍退縮が認められた。Repotrectinib は同じ用量で、CD74-ROS1 G2032R を発現する Ba/F3 細胞を皮下移植した担がんモデルにおいても 99%の腫瘍増殖抑制率（TGI）を示し、同モデルで Repotrectinib を 15 mg/kg/dose で反復投与（BID で 3 回）後 12 時間における CD74-ROS1 G2032R の自己リン酸化は 97%阻害された。また、同じ CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおいて、75 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で経口投与した際には、完全な腫瘍退縮が認められた。

以上の結果から、Repotrectinib は WT の ROS1 融合タンパク質及び臨床でみられるそれらの耐性変異型に対する阻害剤であり、solvent front 変異型 G2032R に対しても高い阻害作用を有することが示された。

<u>TRK 融合タンパク質及びその変異型に対する Repotrectinib の活性</u>：

多くの種類の固形癌で NTRK ファミリー遺伝子の再構成が確認されており[8]、TRK 阻害剤であるラロトレクチニブとエヌトレクチニブは、NTRK 融合遺伝子陽性の進行・再発の固形癌患者に対する治療薬として上市されている。しかし、これらの薬剤は、大腸癌における TRKA G595R 及び乳腺相似分泌癌における TRKC G623R などの solvent front 変異を有する TRK キナーゼファミリーには効果を示さないことが報告されている[9,10]。

Repotrectinib は、TRKA、TRKB 及び TRKC のキナーゼ活性を強力に阻害し（各 IC_{50}：0.826、0.0517 及び 0.0956 nM）、TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現する KM12 細胞及び遺伝子導入 NIH3T3 細胞において、0.01～3 nM の濃度で TRK 融合タンパク質及びそれらの solvent front 変異型の自己リン酸化を約 50%阻害した。また、Repotrectinib は、KM12 細胞の細胞増殖を抑制し（IC_{50}：0.2 nM）、solvent front 変異を有する TRK 融合タンパク質である LMNA-TRKA G595R、TEL-TRKB G639R 及び TEL-TRKC G623R を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞の細胞増殖を抑制した（各 IC_{50}：0.4、0.6 及び 0.39 nM）。

KM12 細胞を移植した担がんモデルマウスにおいて、Repotrectinib を 1、3 及び 15 mg/kg/dose の用量で BID 投与したところ、TGI がそれぞれ 77%、91%及び 101%で、用量依存的な腫瘍増殖抑制が示された。また、LMNA-TRKA WT 及び G595R 変異型を発現する NIH3T3 腫瘍担がんモデルに Repotrectinib を 15 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、それぞれ TGI は 128%及び 97%であった。さらに、LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルに Repotrectinib 60 mg/kg/dose を BID 投与した結果、腫瘍退縮が認められた。

以上より、Repotrectinib は、TRKA、TRKB 及び TRKC に対する pan-TRK 阻害剤であり、in vitro 細胞アッセイ及び in vivo 担がんモデルにおいて solvent front 変異を有する TRK キナーゼファミリーを顕著に阻害することが示された。

ALK 融合タンパク質及びその変異型に対する Repotrectinib の活性：

臨床で ALK 遺伝子再構成が、多くのがん、特に NSCLC で認められている[11]。ALK 再構成を有する多くの NSCLC 患者では、クリゾチニブ及びその他の第二世代 ALK 阻害剤の投与により大きなベネフィットが得られているが、分子標的薬療法に対する耐性、特に ALK G1202R 変異に起因するクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ及びブリグチニブに対する耐性は、依然として共通の臨床上の課題となっている[12]。

Repotrectinib は ALK の WT 及びほとんどの変異型に対して同様に阻害作用を有しており、遺伝子組換え ALK（IC_{50}：1.04 nM）並びにその変異型である ALK L1196M、G1202R、F1174L、F1174S、C1156Y、S1206R、L1152R、R1275Q、1151T Ins、T1151M 及び G1269A の活性を阻害した（各 IC_{50}：1.08、1.21、1.46、1.02、0.932、0.525、1.23、2.79、2.16、0.491 及び 5.50 nM）。

Karpas299 細胞を用いたセルベースアッセイにおいて、Repotrectinib は内因性に発現する NPM-ALK の自己リン酸化を阻害し（IC_{50}：< 3 nM）、さらにその下流のシグナル伝達分子である STAT3、AKT 及び ERK のリン酸化も阻害し、細胞増殖抑制作用を示した（IC_{50}：23.7 nM）。In vivo でも in vitro アッセイの結果と一致して、Karpas299 細胞を移植した担がんモデルにおいて Repotrectinib を 50 mg/kg/dose BID で経口投与した結果、TGI は 94%で顕著な腫瘍増殖抑制が認められ、その際の非結合型薬物血漿中トラフ濃度は 19 nM で、腫瘍内の ALK 自己リン酸化阻害は約 90%であった。

また、Repotrectinib は、EML4-ALK v1 WT 又は EML4-ALK v1 G1202R を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞及び Ba/F3 細胞を用いた in vitro アッセイにおいて、30 nM の濃度で ALK 自己リン酸化を約 50%阻害した。さらに、Repotrectinib は EML4-ALK v1 WT（IC_{50}：21.1 nM）又はその変異型である EML4-ALK v1 G1202R、L1196M、F1174C、C1156Y 及び L1152P を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞の細胞増殖を抑制した（各 IC_{50}：20.5、74、54.2、24 及び 60.1 nM）。

EML4-ALK v1 WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルマウスに Repotrectinib を 50 mg/kg/dose BID で経口投与したところ、顕著な腫瘍増殖抑制が認められ、TGI は 141%であった。また、EML4-ALK v1 WT

及び G1202R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルでも、Repotrectinib を 75 mg/kg/dose BID で経口投与した結果、TGI はそれぞれ 154%及び 99%で、顕著な腫瘍増殖抑制がみられた。

以上より、Repotrectinib は in vitro アッセイ及び in vivo マウス担がんモデルにおいて、WT 及び変異型 ALK の両方、特に solvent front 変異型である ALK G1202R を顕著に阻害することが示された。

キナーゼ選択性：

456 種類のヒトキナーゼ（WT 及び変異型）からなる評価パネルを用いて、Repotrectinib のキナーゼ選択性を広範に評価した。Repotrectinib は、その主要標的キナーゼ（ROS1、TRKA、TRKB、TRKC 及び ALK）の阻害に加えて、低ナノモル濃度の IC_{50} で複数の非受容体型チロシンキナーゼも阻害した。また、Repotrectinib は、H2228 細胞を用いたアッセイで SRC 及び FAK 並びに関連する経路のシグナル分子のリン酸化を阻害し、SET2 細胞を用いたアッセイでは JAK2 のキナーゼ活性を阻害した。さらに、H2228 細胞及び HT1080 細胞を用いたアッセイでは細胞遊走を阻害した。

副次的薬理試験：

Repotrectinib の標的外結合プロファイルは、過去に副作用の可能性と関連付けられている 44 種類のタンパク質からなる in vitro の広範なプロファイリングパネル[13]を用いて評価した。Repotrectinib 10 μM の濃度条件下で一次スクリーニングを行い、阻害率が 50%を超えるヒット分子について二次評価として IC_{50} を算出した。その結果、アデノシン A_{2A} 受容体、L 型 Ca^{2+}チャネル及び SRC ファミリーキナーゼの lymphocyte kinase（LCK）の 3 種類の分子のみに、弱い標的外結合が認められた（各 IC_{50}：6.3、3.5 及び 0.11 μM）。

安全性薬理試験：

Repotrectinib の in vitro 安全性薬理試験では、イオンチャネルの hERG［チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞］、hNav1.5［ヒト胎児腎（HEK）293 細胞］及び hCav1.2（HEK293 細胞）に対する影響を評価した。Repotrectinib の各イオンチャネルに対する阻害作用は弱く（各 IC_{50}：18、> 30 及び > 30 μM）、これらのヒトイオンチャネルに対する Repotrectinib の影響は軽微であると考えられた。心血管系の評価としてカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において心電図測定を実施し、呼吸系及び中枢神経系の評価としてラット及びサルを用いた反復投与毒性試験で詳細な一般状態の観察を行った（【M2.6.6、9 項】参照）。

以上の結果を総合して、Repotrectinib は ROS1、TRKA、TRKB、TRKC 及び ALK の WT 並びにそれらの solvent front 変異型に対し選択的で強力な阻害を示し、現在上市されている又は臨床開発中の阻害剤に抵抗性を示すがん患者に対する有効な治療選択肢となることが示唆された。

2 効力を裏付ける試験

2.1 WT 及び変異型の ROS1、ALK 及び TRK ファミリーキナーゼのキナーゼ活性に対する Repotrectinib の阻害活性

遺伝子組換えヒト ROS1、ALK 及び TRK ファミリーキナーゼ（TRKA、TRKB 及び TRKC）並びにそれらの変異型に対する Repotrectinib の阻害活性を放射性標識[^{33}P]-ATP を用いたキナーゼアッセイ（HotSpot™ assay）により評価した（試験番号 00111）。

Repotrectinib は、ROS1、ALK 及び TRK ファミリーキナーゼ並びにそれらの変異型に対して強力なキナーゼ阻害活性を示した（Table 2.1-1）。

Table 2.1-1: ROS1、ALK 及び TRK ファミリーキナーゼ並びにそれらの変異型に対する Repotrectinib の阻害活性

Target	TPX-0005 IC_{50} (nM) at 10 µM ATP
ROS1	0.0706
ROS1 (G2032R)	0.456
TPM3-ROS1	0.113
ALK	1.04
ALK (L1196M)	1.08
ALK (G1202R)	1.21
ALK (F1174L)	1.46
ALK (F1174S)	1.02
ALK (C1156Y)	0.932
ALK (S1206R)	0.525
ALK (L1152R)	1.23
ALK (R1275Q)	2.79
ALK (1151T Ins)	2.16
ALK (T1151M)	0.491
ALK (G1269A)	5.50
ALK (G1269S)	14.1
ALK-NPM1	1.23
TRKA	0.826
TRKB	0.0517
TRKC	0.0956

Source: Study 00111
Abbreviations: ALK = anaplastic lymphoma kinase; ATP = adenosine triphosphate; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; ROS1 = receptor tyrosine kinase encoded by the ROS1 gene; TRK = tropomyosin receptor kinase;

TRKA = tropomyosin receptor kinase A; TRKB = tropomyosin receptor kinase B; TRKC = tropomyosin receptor kinase C.
Notes: All the reactions were carried out in the presence of 10 μM ATP concentration.

2.2 セルベースアッセイにおける Repotrectinib による細胞増殖抑制並びにキナーゼ自己リン酸化及び下流のシグナル伝達分子リン酸化の阻害

Repotrectinib の細胞増殖抑制作用を、ルシフェラーゼを用いた ATP 定量アッセイ（CellTiter-Glo®）で生細胞数を測定し評価した。

また、Repotrectinib による標的キナーゼ及び下流経路のシグナル伝達分子のリン酸化阻害を、ウエスタンブロット法により評価した。タンパク質・抗体複合体は化学発光基質で検出し、画像解析装置で定量評価した。

2.2.1 ROS1 融合タンパク質及びその変異型を発現する細胞株における Repotrectinib の活性

WT の ROS1 融合タンパク質及びその変異型を安定的に発現させた遺伝子導入 Ba/F3 細胞（マウス pro-B 細胞株）を用いて、Repotrectinib 及び臨床で使用されている他の ROS1 阻害剤の増殖抑制活性を評価した（試験番号 00114）。また、ROS1 融合タンパク質を安定的に発現させた遺伝子導入 NIH3T3 細胞（マウス線維芽細胞株）を用いて、ROS1 の WT 及び G2032R 変異型の自己リン酸化に対する Repotrectinib の阻害活性をクリゾチニブと比較評価した（試験番号 00115）。

2.2.1.1 SDC4-ROS1 及び CD74-ROS1 融合タンパク質並びにそれらの変異型を遺伝子導入した Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性

Repotrectinib は、WT の SDC4-ROS1 又は CD74-ROS1 融合タンパク質を発現する Ba/F3 細胞に対して、強力な増殖抑制活性を示した（IC_{50}：いずれも< 0.2 nM）（試験番号 00114）（Table 2.2.1.1-1）。ROS1 阻害剤のクリゾチニブ、ロルラチニブ、カボザンチニブ及びエヌトレクチニブは、WT ROS1 融合タンパク質を発現する Ba/F3 細胞の細胞増殖を強力に抑制し、クリゾチニブの SDC4-ROS1 及び CD74-ROS1 発現細胞の増殖に対する IC_{50} はそれぞれ 20 及び 9.7 nM であった。

ROS1 陽性 NSCLC 患者では、solvent front 変異型の ROS1 G2032R（ALK の G1202R 変異に相当）により、ALK/ROS1/MET 阻害剤であるクリゾチニブに対する耐性がみられる。Repotrectinib は、SDC4-ROS1 G2032R 又は CD74-ROS1 G2032R を発現する Ba/F3 細胞の増殖を、それぞれ 3 及び 8.4 nM の IC_{50} で強力に阻害した。クリゾチニブ及びエヌトレクチニブはいずれも ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞に対してはわずかな増殖抑制作用を示すのみであった（IC_{50}：いずれも> 1000 nM）。ロルラチニブ及びカボザンチニブは、SDC4-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞において中程度の増殖抑制活性を示し（IC_{50}：352.9 及び 30.3 nM）、CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞においても同等の増殖抑制活性を示した（IC_{50}：262.4 及び 60.7 nM）。

CD74-ROS1 D2033N はクリゾチニブに耐性を示す別の solvent front 変異型である。Repotrectinib、ロルラチニブ及びカボザンチニブは、CD74-ROS1 D2033N 発現 Ba/F3 細胞においてそれぞれ 0.15 nM、

2.4 nM 及び 0.1 nM 未満の IC_{50} で細胞増殖を抑制したが、クリゾチニブ及びエヌトレクチニブはいずれも IC_{50} が約 140 nM で活性はより低かった。

Repotrectinib 及びカボザンチニブは、ROS1 キナーゼドメインに生じる gatekeeper 変異型である CD74-ROS1 L2026M を発現する Ba/F3 細胞の増殖をそれぞれ 10 及び 29.1 nM の IC_{50} で強力に阻害したが、クリゾチニブ、ロルラチニブ及びエヌトレクチニブなどの他の ROS1 阻害剤は、いずれも IC_{50} は 600 nM 超で活性は低かった。

以上の結果から、WT の ROS1 融合遺伝子 SDC4-ROS1 及び CD74-ROS1 を発現する Ba/F3 細胞と同様に、それらの solvent front 変異型 G2032R 及び D2033N 並びに gatekeeper 変異型 L2026M を発現する Ba/F3 細胞においても Repotrectinib が強力な増殖抑制活性を有することが示された。

Table 2.2.1.1-1: SDC4-ROS1 及び CD74-ROS1 融合タンパク質並びにそれらの変異型を発現する Ba/F3 細胞における Repotrectinib 及び他の ROS1 阻害剤の細胞増殖抑制活性

Test Articles	IC_{50} (nM) Ba/F3 SDC4-ROS1		IC_{50} (nM) Ba/F3 CD74-ROS1			
	WT	G2032R	WT	G2032R	D2033N	L2026M
TPX-0005	< 0.2	3	< 0.2	8.4	0.15	10
Crizotinib	20	4661	9.7	1402	139	606.4
Alectinib	2181	> 10000	1786	> 5000	NT	NT
Lorlatinib	< 0.2	352.9	0.5	262.4	2.4	930.6
Cabozantinib	8.3	30.3	1.0	60.7	< 0.1	29.1
Entrectinib	NT	NT	23.5	2549	137.4	2056

Source: Study 00114
Abbreviations: IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; NT = not tested; WT = wild type.

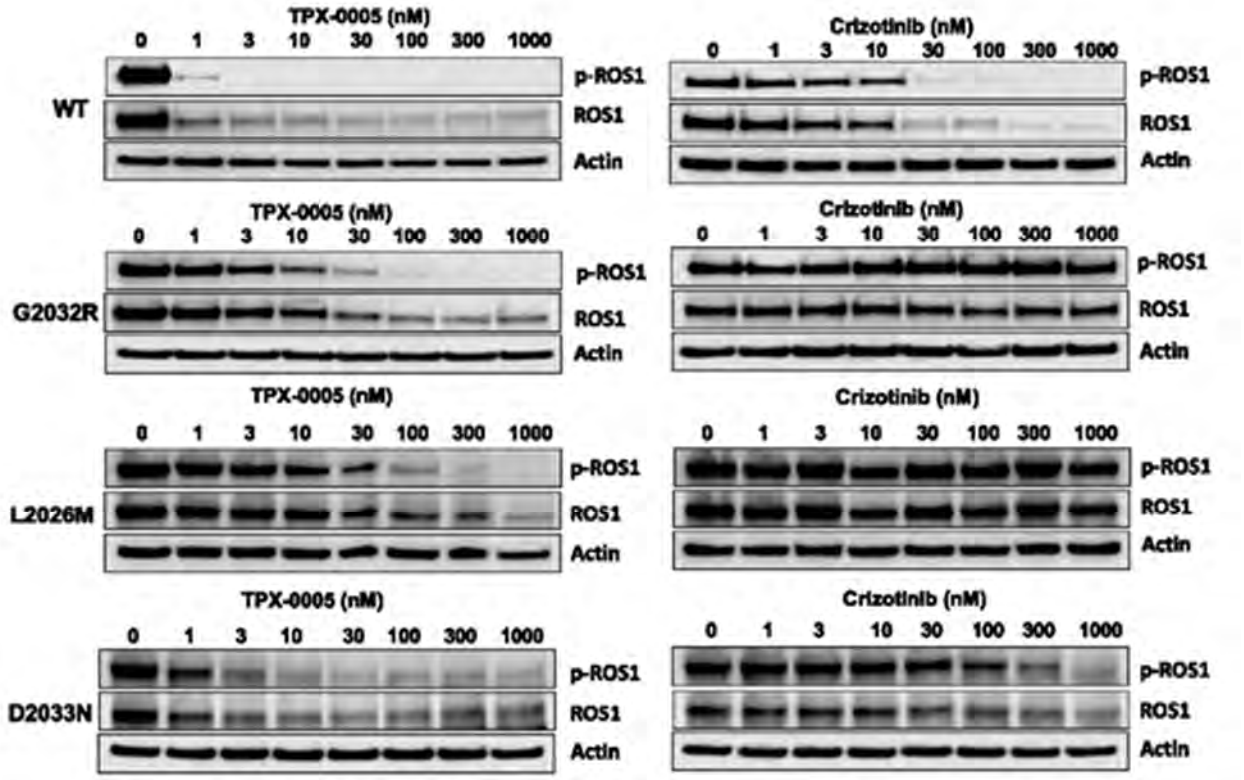
2.2.1.2 CD74-ROS1 融合タンパク質並びにその変異型 G2032R、L2026M 及び D2033N を遺伝子導入した NIH3T3 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化の阻害

WT の CD74-ROS1 を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞において、Repotrectinib は ROS1 の自己リン酸化を 1 nM 未満の IC_{50} で阻害したが、クリゾチニブの IC_{50} は約 10 nM であった（試験番号 00115）。

変異型 CD74-ROS1 融合タンパク質 G2032R、L2026M 又は D2033N を発現する NIH3T3 細胞においても、Repotrectinib は変異型 ROS1 の自己リン酸化を阻害し、IC_{50} はそれぞれ約 3、10 及び 1 nM であった（Figure 2.2.1.2-1）。一方、クリゾチニブは 1000 nM までの濃度で CD74-ROS1 G2032R 及び L2026M の自己リン酸化を阻害せず、CD74-ROS1 D2033N に対しては中程度の阻害で、IC_{50} は約 100 nM であった。

以上より、Repotrectinib はクリゾチニブよりも ROS1 融合タンパク質の自己リン酸化に対する阻害活性が高く、特に臨床でみられる耐性変異の solvent front 変異型 G2032R 及び D2033N 並びに gatekeeper 変異型 L2026M において、より大きな活性の差が認められたことから、Repotrectinib は臨床でクリゾチニブに対する耐性変異型においても有効性を示すことが期待される。

Figure 2.2.1.2-1: CD74-ROS1 の WT 及び変異型融合タンパク質の自己リン酸化に対する Repotrectinib 及びクリゾチニブの阻害作用



Source: Study 00115
Abbreviations: WT = wild type.

2.2.2 TRK 融合タンパク質及びその変異型を発現する細胞株における Repotrectinib の活性

TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現するヒト大腸癌細胞株 KM12 並びに TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を安定的に発現する遺伝子導入 Ba/F3 及び NIH3T3 細胞を用いて、Repotrectinib の細胞増殖及び TRK 自己リン酸化に対する阻害作用を評価した（試験番号 00116 及び 00218）。

2.2.2.1 TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現する KM12 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性並びに TPM3-TRKA 自己リン酸化及びその下流のシグナル伝達分子リン酸化の阻害活性

Repotrectinib の細胞増殖抑制作用を他の TRK 阻害剤と比較した（試験番号 00116）。

Repotrectinib は KM12 細胞の増殖を強力に抑制し、IC_{50} は 0.2 nM であった（Table 2.2.2.1-1）。エヌトレクチニブ、ラロトレクチニブ（LOXO-101）、クリゾチニブ及び Lestaurtinib は活性がより低く、IC_{50} はそれぞれ 9.2、12.3、70 及び 22 nM であった。

Table 2.2.2.1-1: **TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現する KM12 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性**

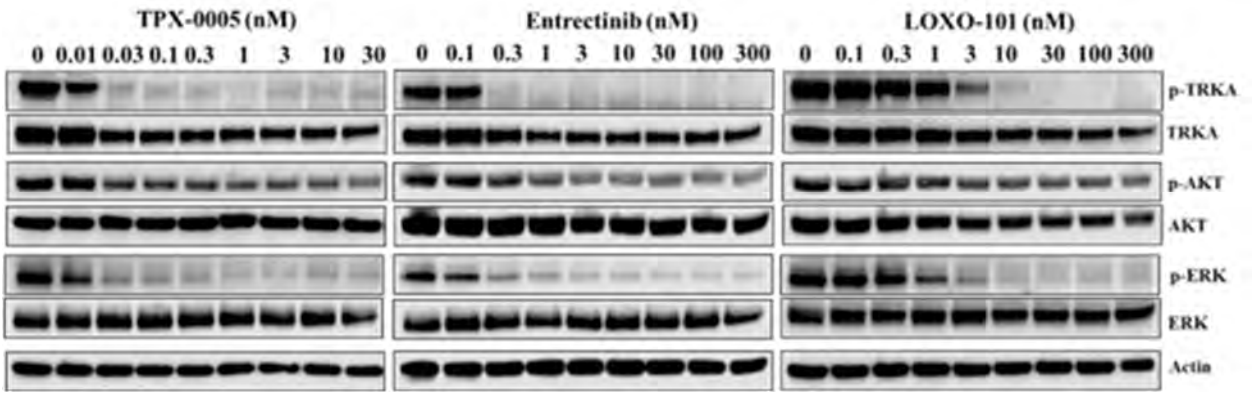
Test Articles	IC_{50} (nM) KM12 TPM3-TRKA
TPX-0005	0.2
Entrectinib	9.2
LOXO-101	12.3
Crizotinib	70
Lestaurtinib	22

Source: Study 00116
Abbreviations: IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; LOXO-101 = Larotrectinib.

KM12 細胞における TPM3-TRKA 自己リン酸化及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する Repotrectinib の阻害作用を Figure 2.2.2.1-1 に示す。Repotrectinib は 0.01 nM の濃度で TPM3-TRKA 自己リン酸化を約 50%阻害し、下流のシグナル伝達分子である AKT 及び ERK のリン酸化も阻害した。

エヌトレクチニブ及びラロトレクチニブも同一アッセイで評価し、エヌトレクチニブは 0.1～0.3 nM の濃度で、ラロトレクチニブは 3 nM の濃度で TPM3-TRKA の自己リン酸化を約 50%阻害した。また、いずれも下流シグナル伝達分子の AKT 及び ERK のリン酸化に対しても阻害活性を示した。

Figure 2.2.2.1-1: **KM12 細胞における TPM3-TRKA の自己リン酸化及びその下流のシグナル伝達分子 AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対する Repotrectinib の作用**



Source: Study 00116
Abbreviations: LOXO-101 = Larotrectinib.

2.2.2.2 TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を遺伝子導入した Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性

WT の LMNA-TRKA、TEL-TRKB 及び TEL-TRKC 並びにそれらの solvent front 変異を含む TRK 融合タンパク質を遺伝子導入した Ba/F3 細胞において、Repotrectinib 及び他の TRK 阻害剤の細胞増殖抑制活性を評価した（試験番号 00218）。

Repotrectinib は、WT の TRK 融合タンパク質を発現する細胞に対して、強力な増殖抑制作用を示した（IC_{50}：< 0.2 nM）（Table 2.2.2.2-1）。また、Repotrectinib は solvent front 変異型 TRKA G595R、TRKB G639R 及び TRKC G623R を発現する細胞に対しても、それぞれ 0.4、0.6 及び 0.39 nM の IC_{50} で増殖を抑制した。

TRKA G595R 及び TRKC G623R はエヌトレクチニブ耐性患者において報告されている耐性変異である [9,10]。エヌトレクチニブ及びラロトレクチニブはいずれも TRKA G595R 及び TRKC G623R に対しては作用が弱く、IC_{50} は 700 nM 超であった。

Table 2.2.2.2-1: TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を遺伝子導入した Ba/F3 細胞に対する Repotrectinib 及び他の TRK 阻害剤の細胞増殖抑制作用

Test Articles	IC_{50} (nM) Ba/F3 LMNA-TRKA		IC_{50} (nM) Ba/F3 TEL-TRKB		IC_{50} (nM) Ba/F3 TEL-TRKC	
	WT	G595R	WT	G639R	WT	G623R
TPX-0005	< 0.2	0.4	< 0.2	0.6	< 0.2	0.39
Entrectinib	0.5	705	< 0.5	1834	0.6	1623
LOXO-101	4	1024	10.9	3000	10.2	3239

Source: Study 00218
Abbreviations: IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; LOXO-101 = Larotrectinib; WT = wild type.

2.2.2.3 WT 並びに変異型の LMNA-TRKA 及び TEL-TRKB を遺伝子導入した NIH3T3 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化の阻害

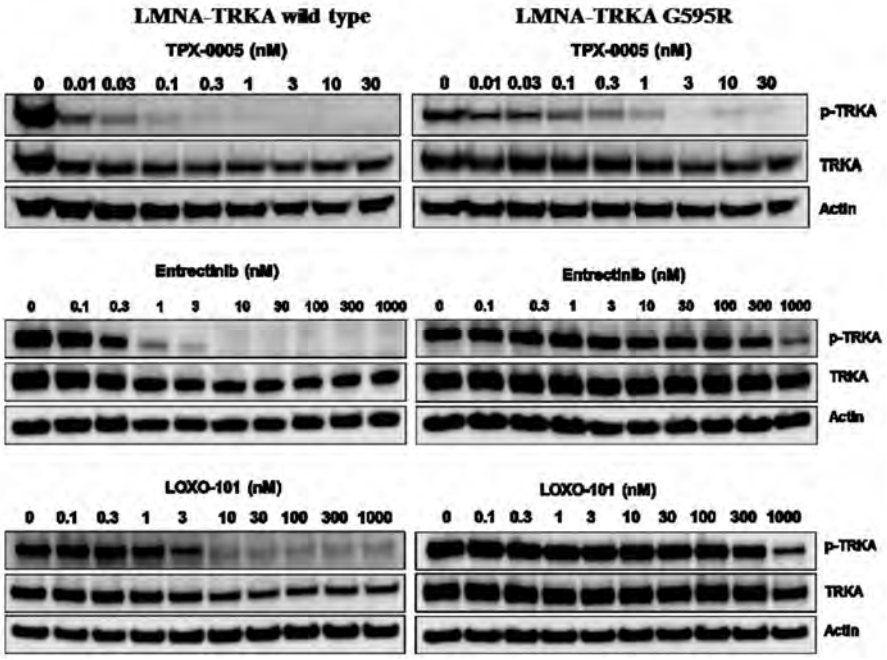
遺伝子導入 NIH3T3 細胞における WT 並びに変異型の LMNA-TRKA 及び TEL-TRKB の自己リン酸化に対する Repotrectinib の阻害作用を評価した（試験番号 00218）（Figure 2.2.2.3-1）。Repotrectinib は 0.01 nM の濃度で WT の TRKA 自己リン酸化を 50%超阻害し、エヌトレクチニブ及びラロトレクチニブは、それぞれ 0.3 及び 3 nM の濃度で WT の LMNA-TRKA の自己リン酸化を約 50%阻害した。また、Repotrectinib は、0.1 nM の濃度で LMNA-TRKA G595R の自己リン酸化を約 50%阻害したが、エヌトレクチニブ及びラロトレクチニブはいずれも 1000 nM において LMNA-TRKA G595R の自己リン酸化を約 50%阻害した。

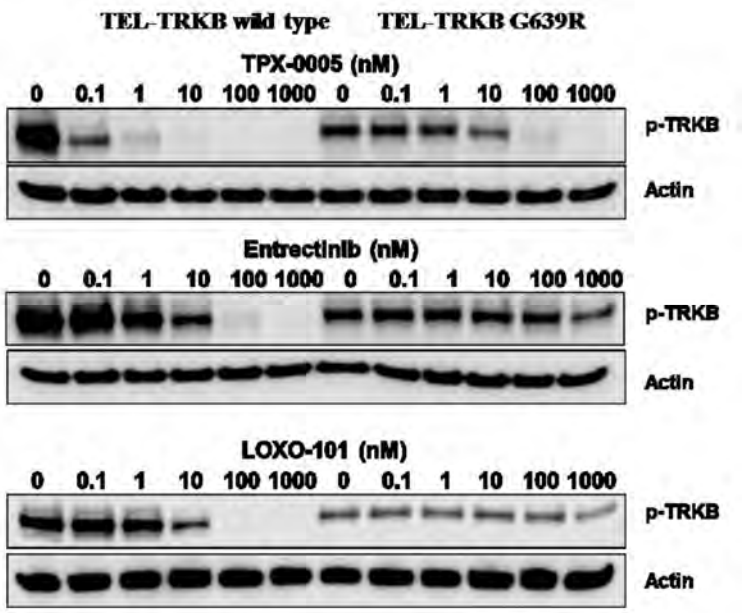
LMNA-TRKA に対する作用と同様に、Repotrectinib は TEL-TRKB WT（0.1 nM で約 50%阻害）及び G639R 変異型（3 nM で約 50%阻害）のいずれの自己リン酸化も阻害したが、エヌトレクチニブ及び

ラロトレクチニブの阻害作用はより弱く、それぞれ 3 及び 10 nM で TEL-TRKB WT の自己リン酸化を約 50%阻害し、いずれも 1000 nM において TEL-TRKB G639R の自己リン酸化を約 50%阻害した。

これらのデータから、Repotrectinib は自己リン酸化及び細胞増殖アッセイにおいて、WT の TRK 融合タンパク質を阻害するだけでなく、他の TRK 阻害剤に抵抗性の solvent front 変異を有する TRK 融合タンパク質も阻害することが示された。

Figure 2.2.2.3-1: **遺伝子導入 NIH3T3 細胞における WT 及び変異型 TRK の自己リン酸化に対する Repotrectinib の作用**





Source: Study 00218
Abbreviations: LOXO-101 = Larotrectinib.

2.2.3 ALK 融合タンパク質及びその変異型を発現する細胞株における Repotrectinib の活性

NPM-ALK 融合遺伝子を内因性に発現するヒト T 細胞リンパ腫細胞株 Karpas299 及び WT の EML4-ALK v1 又はその変異型を安定的に発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞及び NIH3T3 細胞を用いて、Repotrectinib の細胞増殖及びリン酸化に対する阻害作用を評価した（試験番号 00112、00113 及び 00117）。

2.2.3.1 NPM-ALK 融合遺伝子を内因性に発現する Karpas299 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性

Repotrectinib の Karpas299 細胞に対する増殖抑制作用を、ALK 阻害剤のクリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ及びロルラチニブと比較した（試験番号 00112）（Table 2.2.3.1-1）。

Repotrectinib は Karpas299 細胞の増殖を 23.7 nM の IC_{50} で抑制した。クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ及びロルラチニブも、Karpas299 細胞の増殖を抑制し、IC_{50} はそれぞれ 40、7.3、25.6 及び 1.6 nM であった。

Table 2.2.3.1-1: NPM-ALK 融合遺伝子を内因性に発現する Karpas299 細胞における Repotrectinib 及び他の ALK 阻害剤の細胞増殖抑制作用の比較

Test Articles	IC_{50} (nM) Karpas299
TPX-0005	23.7
Crizotinib	40
Ceritinib	7.3
Alectinib	25.6
Lorlatinib	1.6

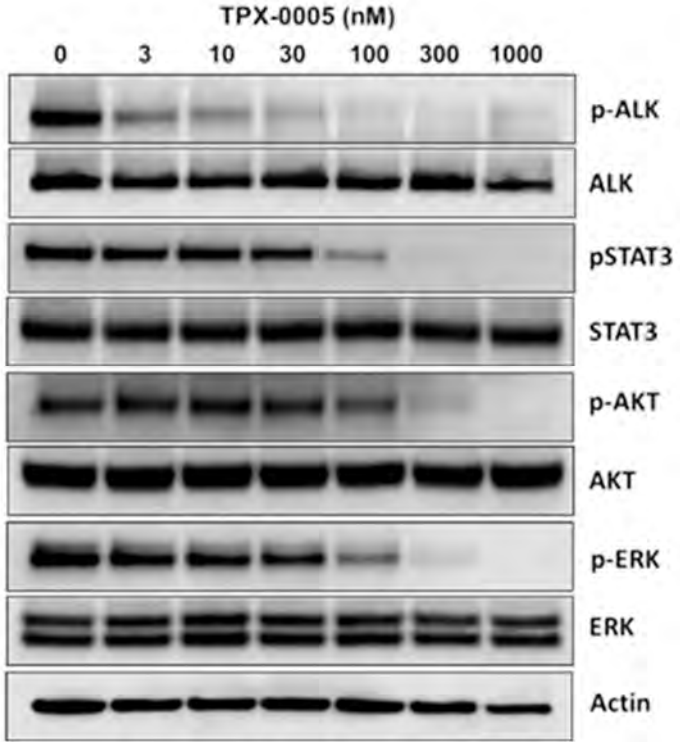
Source: Study 00112
Abbreviations: IC_{50} = half maximal inhibitory concentration.

2.2.3.2 Karpas299 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化及び ALK 下流のシグナル伝達分子のリン酸化の阻害

Karpas299 細胞を用いて、NPM-ALK 自己リン酸化及び ALK 下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する Repotrectinib の阻害活性を評価した（試験番号 00112）（Figure 2.2.3.2-1）。

Repotrectinib は、Karpas299 細胞において 3 nM の濃度で ALK 自己リン酸化を 50%超阻害した。また、Repotrectinib は STAT3、AKT 及び ERK などの NPM-ALK 下流のシグナル伝達分子のリン酸化を濃度依存的に阻害した。

Figure 2.2.3.2-1: **Karpas299 細胞における NPM-ALK 及び下流のシグナル伝達分子 STAT3、AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対する Repotrectinib の作用**



Source: Study 00112

2.2.3.3 EML4-ALK v1 融合タンパク質（WT 及び変異型）を遺伝子導入した Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性

ドライバー変異である WT の EML4-ALK v1 融合タンパク質又はクリゾチニブ及び他の ALK 阻害剤に耐性を獲得した患者にみられるその変異型（G1202R、L1196M、F1174C、C1156Y、L1152P 又は G1269S）を発現する Ba/F3 細胞を用いて、Repotrectinib の細胞増殖抑制作用を ALK 阻害剤（クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ及びロルラチニブ）と比較した（試験番号 00113）（Table 2.2.3.3-1）。

Repotrectinib 及び評価した全ての ALK 阻害剤は、遺伝子導入していない親細胞株 Ba/F3 細胞では、わずかな活性のみを示した。Repotrectinib は、EML4-ALK v1 又はその変異型 G1202R、L1196M、F1174C、C1156Y 若しくは L1152P を発現する Ba/F3 細胞に対して、それぞれ 21.1、20.5、74、54.2、24 及び 60.1 nM の IC_{50} で増殖抑制作用を示した。Repotrectinib は G1269S 変異に対する活性が低く、IC_{50} は 430.4 nM であった。WT の EML4-ALK v1 を発現する Ba/F3 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制は、他の ALK 阻害剤（クリゾチニブ、セリチニブ、アレクチニブ及びロルラチニブ）と同等であったが、Repotrectinib は臨床でみられる様々な耐性変異型をより広範に阻害した。Repotrectinib は ALK G1202R 発現 Ba/F3 細胞の増殖を 20.5 nM の IC_{50} で阻害したが、クリゾチニブ、

セリチニブ、アレクチニブ及びロルラチニブの活性は低かった。Repotrectinib は ATP 結合部位の内側に完全に収まる形で結合し、G1202R 残基との相互作用を回避するように設計されており [1]、このことは ALK G1202R 発現 Ba/F3 細胞における細胞増殖抑制活性に反映されている。

以上より、Repotrectinib は臨床でみられる耐性変異型、特に既存の ALK 阻害剤への耐性の要因として知られる ALK G1202R に対して強力な活性を有することが示された。

Table 2.2.3.3-1: EML4-ALK 融合タンパク質（WT 及び変異型）を発現する Ba/F3 細胞に対する Repotrectinib 及び ALK 阻害剤の細胞増殖抑制作用

Test Articles	IC_{50} (nM) Ba/F3 EML4-ALK v1							IC_{50} (nM) Parental Ba/F3
	WT	G1202R	L1196M	F1174C	C1156Y	L1152P	G1269S	
TPX-0005	21.1	20.5	74	54.2	24	60.1	430.4	1268
Crizotinib	69.8	359.4	918.1	114.4	475	343.1	1415	2464
Ceritinib	8.7	388	52.2	210.4	414	630.6	51.6	3057
Alectinib	13.7	606.9	120.8	58.1	108	> 5000	161.7	> 10000
Lorlatinib	0.9	1000	11.3	2	30	1500	85.1	10000

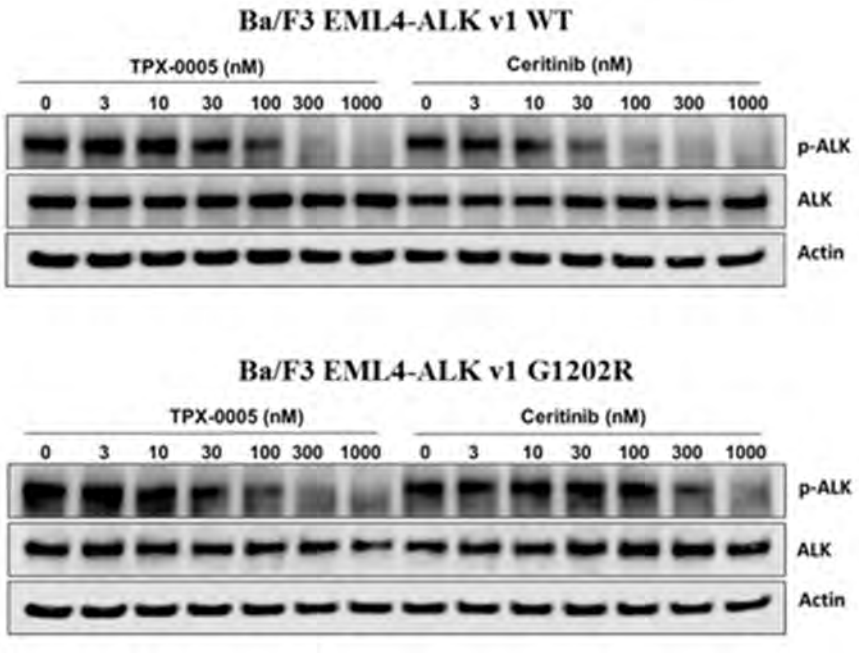
Source: Study 00113
Abbreviations: IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; WT = wild type.

2.2.3.4 EML4-ALK v1 融合タンパク質又はその変異型 G1202R を遺伝子導入した Ba/F3 細胞及び NIH3T3 細胞におけるキナーゼ自己リン酸化の阻害

WT の EML4-ALK v1 融合タンパク質又はその G1202R 変異型を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞（試験番号 00113）及び NIH3T3 細胞（試験番号 00117）の EML4-ALK の自己リン酸化に対する Repotrectinib の活性を評価した（Figure 2.2.3.4-1 及び Figure 2.2.3.4-2）。

EML4-ALK v1 WT 発現 Ba/F3 細胞において、Repotrectinib は 30 nM の濃度で ALK 自己リン酸化を約 50%阻害した（Figure 2.2.3.4-1）。EML4-ALK v1 G1202R 融合タンパク質発現 Ba/F3 細胞においても、Repotrectinib は同程度の ALK 自己リン酸化阻害を示したが、比較評価したセリチニブの活性はより低く、300 nM の濃度で ALK 自己リン酸化を約 50%阻害した。

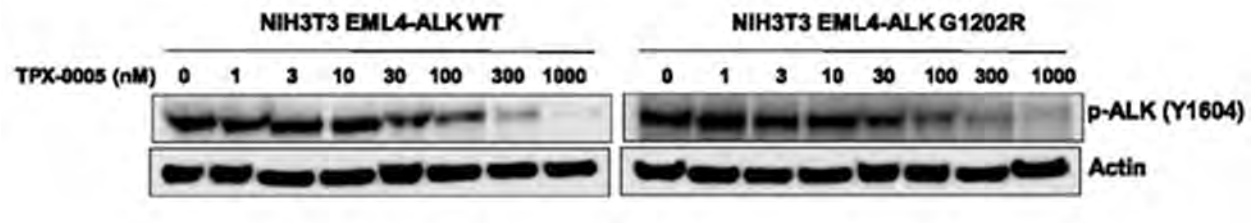
Figure 2.2.3.4-1: **遺伝子導入 Ba/F3 細胞における EML4-ALK WT 及び変異型タンパク質の自己リン酸化に対する Repotrectinib の作用**



Source: Study 00113
Abbreviations: WT = wild type.

Ba/F3 細胞と同様に、Repotrectinib は NIH3T3 細胞においても WT 及び G1202R 変異型の EML4-ALK の自己リン酸化をいずれも 30 nM で約 50%阻害し、強力な ALK 自己リン酸化阻害作用を示した（Figure 2.2.3.4-2）。これらの結果から、Repotrectinib が発がんドライバーである EML4-ALK WT だけでなく、臨床でみられる耐性変異の EML4-ALK G1202R の自己リン酸化も阻害することが示された。

Figure 2.2.3.4-2: **遺伝子導入 NIH3T3 細胞における EML4-ALK WT 及び変異型タンパク質の自己リン酸化に対する Repotrectinib の作用**



Source: Study 00117
Abbreviations: WT = wild type.

2.3 マウス担がんモデルにおける Repotrectinib の in vivo 抗腫瘍効果

2.3.1 ROS1 融合タンパク質（WT 及び変異型）発現細胞移植マウスにおける評価

2.3.1.1 雌性胸腺欠損ヌードマウスの SDC4-ROS1 WT 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果

SDC4-ROS1 WT を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞を移植した雌性胸腺欠損ヌードマウスを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果を評価した（試験番号 00153）。

マウス（5～8 週齢）に WT の SDC4-ROS1 タンパク質を発現する NIH3T3 細胞（5×10^6 個）を皮下移植した（Day 0）。平均腫瘍体積が約 100 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 5）。マウス（各群 8 匹）に、媒体［1.0% Tween 80 添加 0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム（CMC）水溶液］又は 15 及び 50 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 26 日間経口投与した。腫瘍体積と体重を週 3 回測定した。腫瘍増殖抑制率（TGI）は、投与開始時と試験終了時の腫瘍体積から以下の式を用いて算出した（TV_t：薬剤群の試験終了時の腫瘍体積、TV_0：薬剤群の投与開始時の腫瘍体積、CV_t：媒体対照群の試験終了時の腫瘍体積、CV_0：媒体対照群の投与開始時の腫瘍体積）。

$TV_t > TV_0$ の場合：$TGI = (1 - [TV_t - TV_0] / [CV_t - CV_0]) \times 100\%$

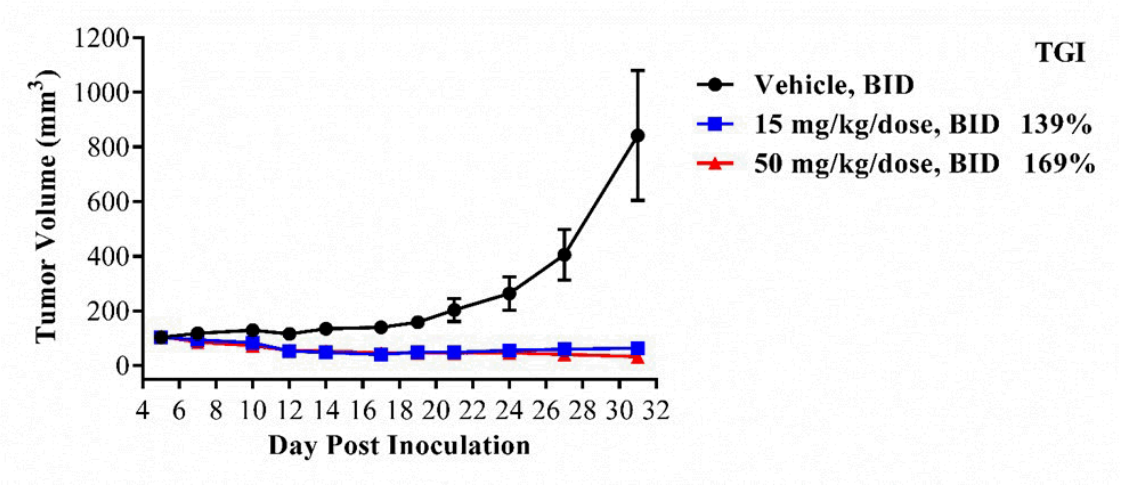
$TV_t < TV_0$ の場合：$TGI = (2 - TV_t / TV_0) \times 100\%$

100%を超える TGI は、腫瘍が投与開始時よりも退縮していることを示す。なお、2.3 項の他の抗腫瘍効果試験でも同様の方法で TGI を算出した。

Repotrectinib を 15 及び 50 mg/kg/dose の用量で BID 投与すると、腫瘍増殖が強力に抑制され、TGI はそれぞれ 139%及び 169%で、いずれの用量においても統計学的に有意な効果であった（媒体対照群との比較でいずれも $p < 0.001$）（Figure 2.3.1.1-1）。また、本モデルにおいて Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。50 mg/kg/dose 投与群のマウス 1 例で投与期間中（Day 10）の死亡が認められたことから、本個体は試験から除外した。その他には投与期間中に異常な症状は認められなかった。

本試験において、Repotrectinib は雌性ヌードマウスに SDC4-ROS1 WT 発現 NIH3T3 細胞を移植した担がんモデルで顕著な抗腫瘍効果を示し、明らかな毒性は認められなかった。

Figure 2.3.1.1-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの SDC4-ROS1 WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00153
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals in the vehicle group and 15 mg/kg treatment group, and 7 animals in the 50 mg/kg treatment group. The TGI was statistically significant for both the 15 and 50 mg/kg/dose groups (each with $p < 0.001$ compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

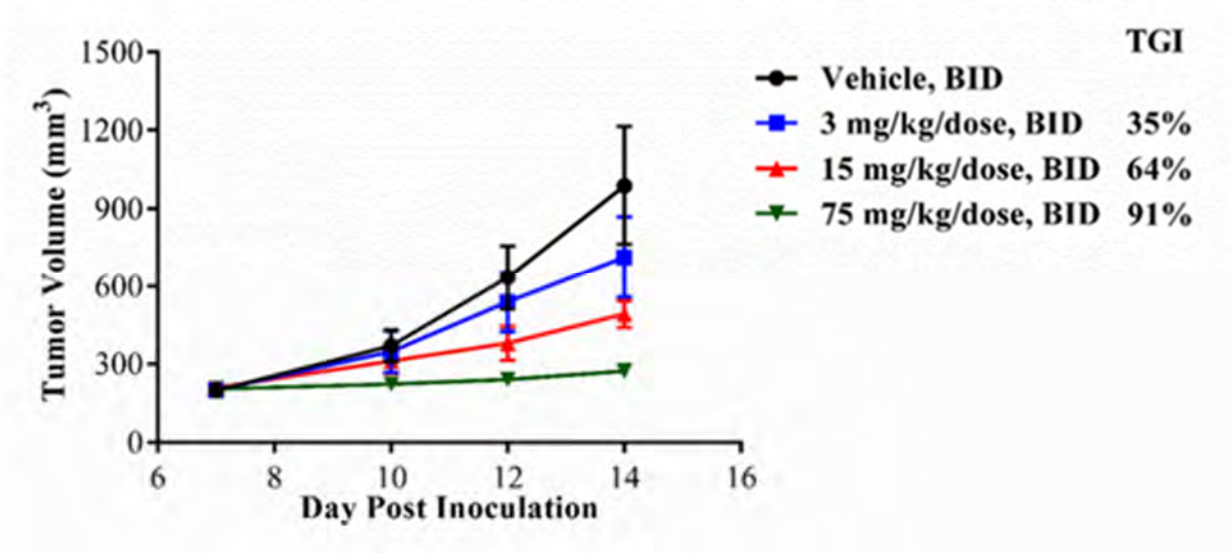
2.3.1.2 雌性胸腺欠損ヌードマウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果

CD74-ROS1 G2032R 融合タンパク質を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞を移植した雌性胸腺欠損ヌードマウス担がんモデルを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果を評価した（試験番号 00183）。

マウス（5～8 週齢）に CD74-ROS1 G2032R を発現する NIH3T3 細胞（1×10^6 個）を皮下移植し（Day 0）、平均腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 7）。マウス（各群 6 匹）に、媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 3、15 及び 75 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 7 日間経口投与した。

Repotrectinib を 3、15 及び 75 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、用量依存的に腫瘍増殖が抑制され、TGI はそれぞれ 35%、64%及び 91%であった（Figure 2.3.1.2-1）。Repotrectinib の 15 及び 75 mg/kg/dose 投与群では統計学的に有意な腫瘍増殖抑制を示した（媒体対照群との比較でそれぞれ $p < 0.001$ 及び $p < 0.0001$）。また、3、15 及び 75 mg/kg/dose BID のいずれの用量でも Repotrectinib を投与したマウスにおける忍容性は良好であり、体重減少は認められなかった。

Figure 2.3.1.2-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00183
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 6 animals per group. The TGI was statistically significant at 15 mg/kg/dose and 75 mg/kg/dose groups ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively, compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

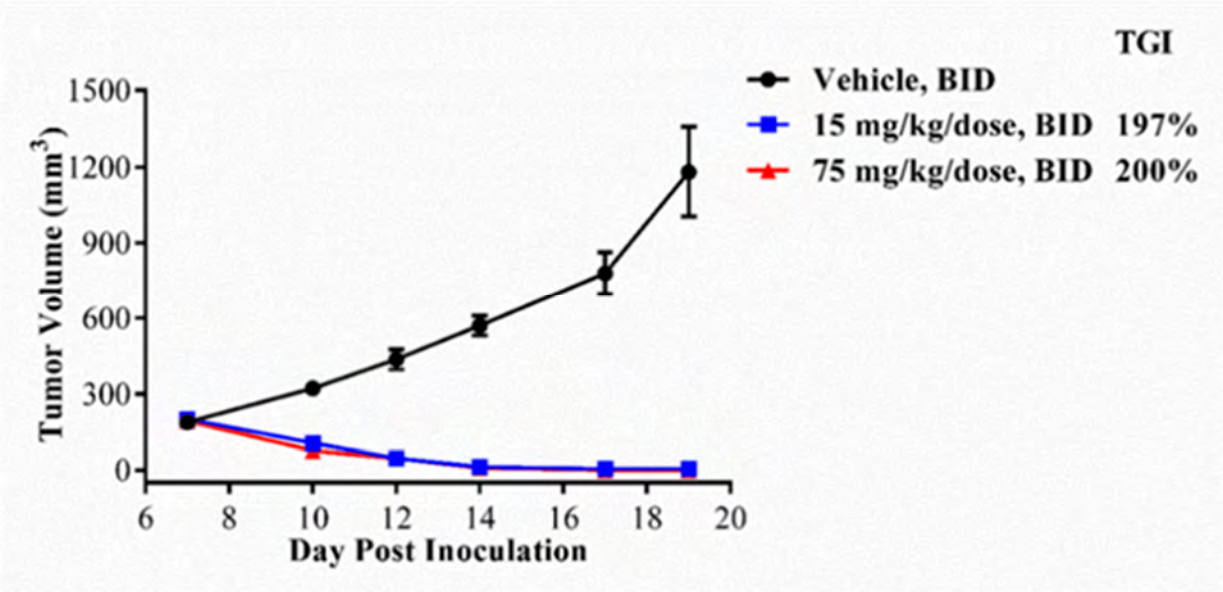
2.3.1.3 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 又は CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果

CD74-ROS1 WT 又は CD74-ROS1 G2032R を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞を移植した雌性 SCID/Beige マウス担がんモデルを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果を評価した（試験番号 00182）。

マウス（5～8 週齢）に CD74-ROS1 WT 又は CD74-ROS1 G2032R を発現する Ba/F3 細胞（5×10^6 個）を皮下移植し（Day 0）、平均腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した時点で投与を開始した（CD74-ROS1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデルでは Day 7、CD74-ROS1 G2032R Ba/F3 腫瘍担がんモデルでは Day 10）。マウス（各群 8 匹）に、媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 15 及び 75 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 12 日間（CD74-ROS1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデル）又は 11 日間（CD74-ROS1 G2032R Ba/F3 腫瘍担がんモデル）経口投与した。

CD74-ROS1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデルマウスに Repotrectinib を 15 及び 75 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、腫瘍増殖が強力に抑制され、TGI はそれぞれ 197%及び 200%であり、いずれの用量においても統計学的に有意な腫瘍増殖抑制であった（媒体対照群との比較でいずれも $p < 0.0001$）（Figure 2.3.1.3-1）。また、Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。すなわち、CD74-ROS1 WT を発現する Ba/F3 細胞を移植した雌性 SCID/Beige マウスでは、Repotrectinib 投与による明らかな毒性は認められず、ほぼ完全に腫瘍が退縮した。

Figure 2.3.1.3-1: **雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 WT 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**

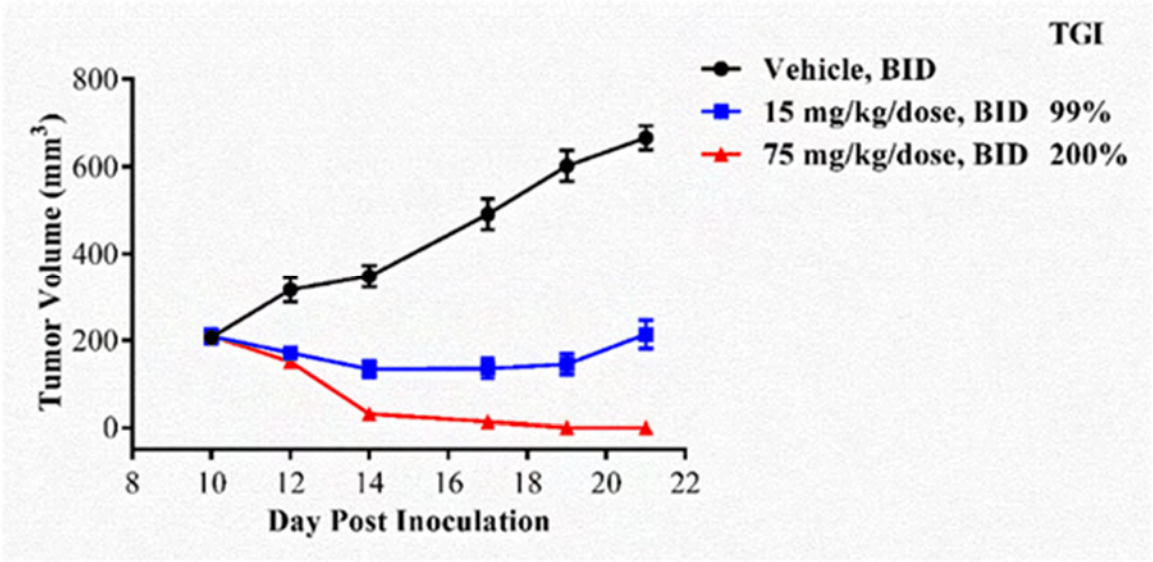


Source: Study 00182
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant for the 15 mg/kg/dose and 75 mg/kg/dose groups (each with $p < 0.0001$ compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

CD74-ROS1 G2032R Ba/F3 腫瘍担がんモデルマウスに Repotrectinib を 15 及び 75 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、用量依存的で強力な腫瘍増殖抑制が認められ、TGI はそれぞれ 99%及び 200%であった（Figure 2.3.1.3-2）。腫瘍増殖抑制はいずれの用量においても統計学的に有意であり（媒体対照群との比較でいずれも $p < 0.0001$）、75 mg/kg/dose 投与群では、完全な腫瘍退縮であった。いずれの用量においても Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。

以上の結果より、WT の ROS1 融合タンパク質を発現する腫瘍及び現在臨床で使用されている ROS1 阻害剤に耐性を示す ROS1 G2032R 変異型融合タンパク質 [12,14,15] を発現する腫瘍に対して、Repotrectinib が抗腫瘍活性を有することが示された。

Figure 2.3.1.3-2: **雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00182
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant for the 15 mg/kg/dose and 75 mg/kg/dose groups (each with $p < 0.0001$ compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

2.3.1.4 雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib 単回及び反復投与時の血漿中薬物濃度及び薬力学作用

標的キナーゼの自己リン酸化に対する Repotrectinib の薬力学（PD）作用及びその際の血漿中濃度を評価するため、雌性 SCID/Beige マウスに CD74-ROS1 G2032R を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞を移植した担がんモデルを用いて単回及び反復投与試験を実施した（試験番号 00235）。

単回投与試験（実験 1）では、マウス（5～8 週齢）に CD74-ROS1 G2032R を発現する Ba/F3 細胞（5×10^6 個）を皮下移植し、平均腫瘍体積が約 230 mm^3 に達した時点で投与を実施した。マウス（各群 5 匹）に、Repotrectinib（15 mg/kg）又は媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）を単回経口投与した。投与 3 時間後に安楽死させ、血漿及び腫瘍組織を採取した。各群 5 匹中 4 匹の検体試料を用いて、腫瘍組織ではウエスタンブロット法により PD マーカーであるキナーゼの自己リン酸化阻害を評価し、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）により血漿中の Repotrectinib 濃度を測定した。

反復投与試験（実験 2）では、マウス（5～8 週齢）に CD74-ROS1 G2032R を発現する Ba/F3 細胞（5×10^6 個）を皮下移植し、平均腫瘍体積が約 510 mm^3 に達した時点で投与を開始した。マウス（各群 4 匹）に Repotrectinib（15 及び 75 mg/kg/dose）又は媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶

液）を BID で計 3 回経口投与した。最終投与の 6 時間後（媒体群）及び 12 時間後（Repotrectinib 群）にマウスを安楽死させ、血漿及び腫瘍組織を採取した。腫瘍組織を用いてウエスタンブロット法によりキナーゼの自己リン酸化阻害を評価し、血漿中の Repotrectinib 濃度を LC-MS/MS により測定した。

単回投与試験の投与 3 時間後において、15 mg/kg の Repotrectinib 投与により CD74-ROS1 G2032R 融合タンパク質の自己リン酸化は対照群の 0.47%まで低下し、99%超の阻害が認められた（Table 2.3.1.4-1）。15 mg/kg 単回投与 3 時間後の平均血漿中総薬物濃度は 2727 ng/mL（7673 nM）であった（Table 2.3.1.4-2）。

反復投与試験では、最終投与 12 時間後に、15 mg/kg/dose の Repotrectinib により CD74-ROS1 G2032R 融合タンパク質のリン酸化が対照群の 2.97%に低下した（Table 2.3.1.4-1）。15 mg/kg/dose 投与では最終投与 12 時間後の平均血漿中総薬物濃度は 107 ng/mL（301 nM）で、この血漿中総薬物濃度における血漿中非結合型薬物濃度は 12.7 nM と算出された［マウス血漿中の非結合形分率（fu）4.23%（M2.6.5、6 項）に基づく］（Table 2.3.1.4-2）。75 mg/kg/dose 投与群では腫瘍退縮が顕著であったため、腫瘍組織検体は採取できなかった。なお、15 mg/kg/dose 投与群の 1 検体は、採取可能な腫瘍組織量が限定的で CD74-ROS1 G2032R の発現を確認できなかったため、評価から除外した。

以上の結果から、CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおいて、G2032R 変異を有する CD74-ROS1 融合タンパク質の自己リン酸化を阻害する Repotrectinib の単回及び反復投与による PD 作用が示された。

Table 2.3.1.4-1: **雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルの腫瘍組織における CD74-ROS1 の自己リン酸化に対する Repotrectinib 単回及び反復投与の効果**

Experiment	Dosing schedule	Dose (mg/kg)	Sampling Time hours post last dose	Number of mice	Phospho-CD74-ROS1 Mean ± SEM (%)[a]
1	Single dose	15	3	4	0.47 ± 0.19
2	Multiple dosing (3 doses, BID)	15	12	3	2.97 ± 1.00

Source: Study 00235
Abbreviations: BID = twice daily; SEM = standard error of mean.

[a] Results for the phosphorylation of CD74-ROS1 are presented as percentage of phosphorylation in the TPX-0005 treated mice over that of the vehicle treated mice.

Table 2.3.1.4-2: **雌性 SCID/Beige マウスの CD74-ROS1 G2032R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 単回及び反復投与時の血漿中濃度**

Experiment	Mouse ID	Dose (mg/kg)	Time Point (h)	Plasma concentration		Mean plasma concentration		Mean free concentration[a]
				(ng/mL)	(nM)	(ng/mL)	(nM)	(nM)
1 Single dose	355	15	3	2730	7674	2727	7673	324
	341	15	3	1650	4638			
	344	15	3	2680	7534			
	362	15	3	3850	10823			
2 Multiple dose (3 doses, BID)	740	15	12	72.1	203	107	301	12.7
	742	15	12	114	321			
	744	15	12	135	380			

Source: Study 00235
Abbreviation: BID = twice daily.

[a] Mouse plasma protein binding fu = 0.0423 (M2.6.5 Section 6) was used to calculate the free plasma concentration of TPX-0005.

2.3.2 TRK 融合タンパク質（WT 及び変異型）発現細胞移植マウスにおける評価

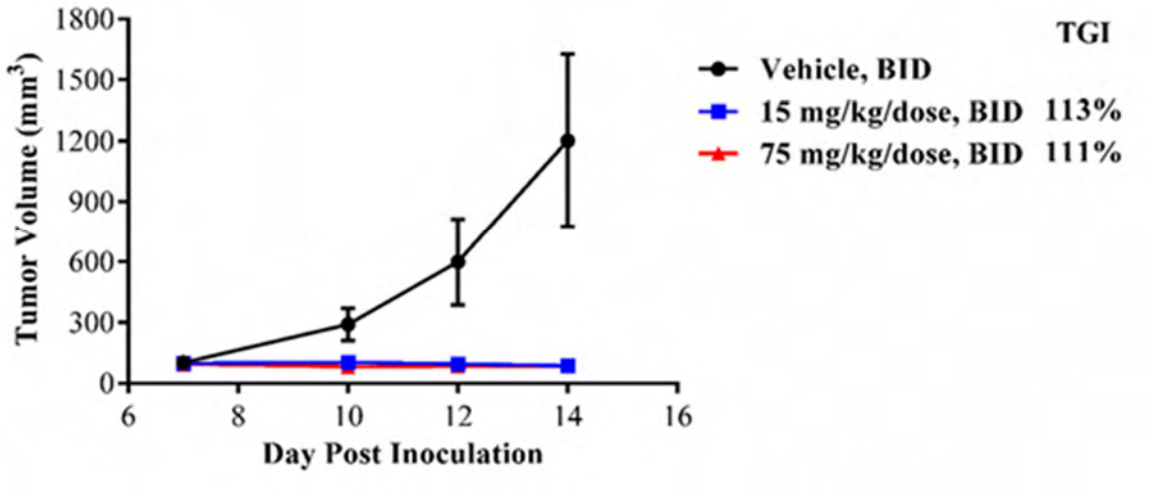
2.3.2.1 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果（高用量投与）

TPM3-TRKA 融合タンパク質を内因性に発現するヒト結腸癌由来 KM12 細胞を移植した雌性胸腺欠損ヌードマウスを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果を評価した（試験番号 00154）。

マウス（5～8 週齢）に、KM12 細胞（5×10^6 個）を皮下移植した（Day 0）。平均腫瘍体積が約 100 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 7）。マウス（各群 8 匹）に媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 15 及び 75 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 7 日間経口投与した。

Repotrectinib を 15 及び 75 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、KM12 腫瘍の増殖が強力に抑制され、いずれの用量においても試験終了時の TGI は約 110%で、統計学的に有意であった（媒体対照群との比較でいずれも $p < 0.05$）（Figure 2.3.2.1-1）。これらのデータから、KM12 腫瘍に対する Repotrectinib の最大の抗腫瘍効果は 15 mg/kg/dose の用量で得られていることが示された。また、本モデルにおいて、いずれの用量の Repotrectinib 投与でも体重減少は認められず、投与期間中に異常な症状は認められなかった。

Figure 2.3.2.1-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現ヒト KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00154
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant at all dose levels ($p < 0.05$ compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

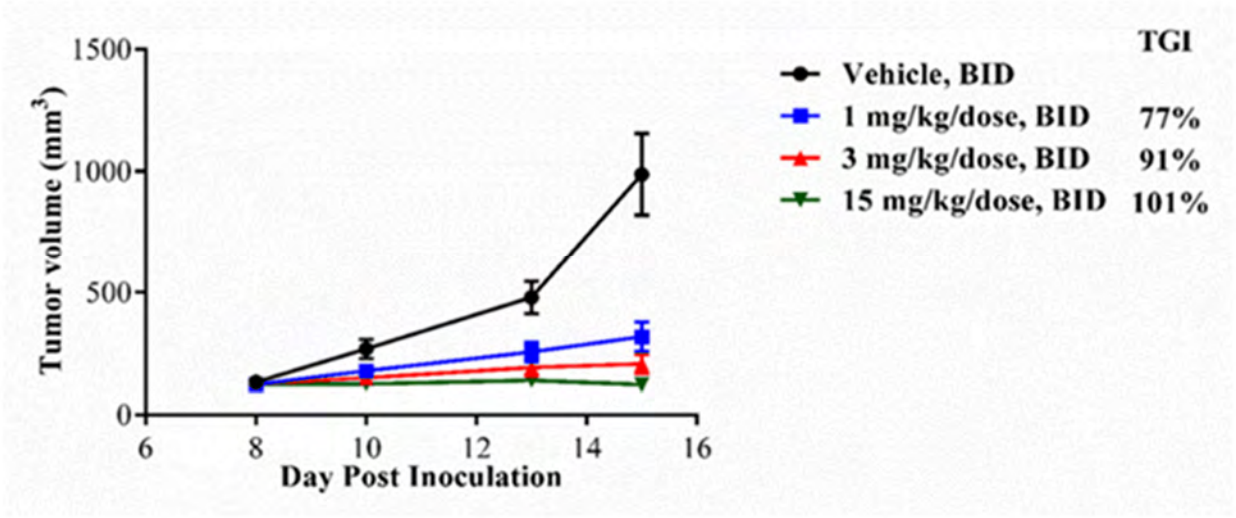
2.3.2.2 雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果及び薬物動態（用量反応性）

Repotrectinib の腫瘍増殖抑制作用の用量反応性を確認するため、雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 細胞皮下移植モデルに、15 mg/kg までの複数用量で Repotrectinib を BID 投与した（試験番号 00210）。また、血漿中の Repotrectinib 濃度を LC-MS/MS 法により測定した。

マウス（5～8 週齢）に、TPM3-TRKA 融合タンパク質を内因性に発現するヒト結腸癌由来 KM12 細胞（5×10^6 個）を皮下移植し（Day 0）、平均腫瘍体積が約 120 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 8）。マウス（各群 10 匹）に媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 1、3 及び 15 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 7 日間経口投与した。抗腫瘍効果評価終了後、さらに 1 日追加で BID 投与（計 8 日間投与）し、最終投与後 0.25、1、2、4、8 及び 12 時間で各群 3 匹から採血した。

Repotrectinib を 1、3 及び 15 mg/kg/dose の用量で BID 投与すると、KM12 腫瘍の増殖が用量依存的に抑制され（TGI はそれぞれ 77%、91%及び 101%）、全ての用量で統計学的に有意であった（媒体群との比較でそれぞれ $p < 0.001$、$p < 0.0001$ 及び $p < 0.0001$）（Figure 2.3.2.2-1）。また、Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。

Figure 2.3.2.2-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果（用量反応性）**

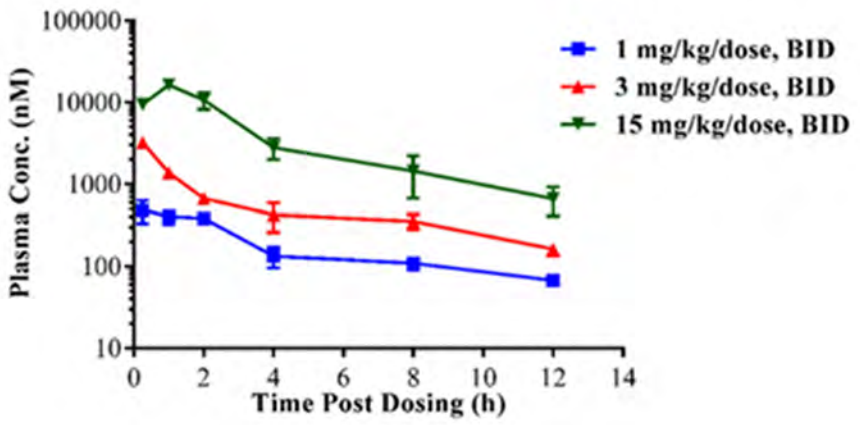


Source: Study 00210
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 10 animals per group. The TGI was statistically significant at all dose levels ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively, compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

Repotrectinib 反復投与（8 日間）後の血漿中濃度は、1、3 及び 15 mg/kg/dose の投与で用量依存的に増加した（Figure 2.3.2.2-2）。平均血漿中濃度（$C_{average}$）は、それぞれ 179、568 及び 4202 nM であり、最高血漿中濃度（C_{max}）は、それぞれ 483、3214 及び 16274 nM であった。血漿中トラフ濃度（C_{trough}）は 1、3 及び 15 mg/kg 群でそれぞれ 67、163 及び 663 nM であった（Table 2.3.2.2-1）。

以上より、雌性ヌードマウスに TPM3-TRKA 融合タンパク質を内因性に発現する KM12 細胞を移植した担がんモデルにおいて、Repotrectinib 投与により統計学的に有意で用量依存的な抗腫瘍効果が示され、明らかな毒性は認められなかった。

Figure 2.3.2.2-2: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与後の血漿中薬物濃度推移**



Source: Study 00210
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 3 animals per group per time point.

Table 2.3.2.2-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの TPM3-TRKA 発現 KM12 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与後の薬物動態パラメータ**

Dose (mg/kg/dose, BID)	Days of Dosing	Plasma $AUC_{(0\text{-}12h)}$ (h•nM)	Fold change in $AUC_{(0\text{-}12h)}$	C_{max} (nM)	C_{trough} (nM)	T_{max} (h)	$C_{average}$ (nM)
1	8	2143	1.0	483	67	0.25	179
3	8	6818	3.18	3214	163	0.25	568
15	8	50424	23.5	16274	663	1	4202

Source: Study 00210
Abbreviations: $AUC_{(0\text{-}12h)}$ = area under curve from 0 to 12 hour; BID = twice daily; $C_{average}$ = average plasma concentration; C_{max} = maximum plasma concentration; C_{trough} = plasma concentration at 12 hour (same as the minimum plasma concentration in this experiment); T_{max} = time to C_{max}.
Notes: Mean plasma pharmacokinetic parameters after 8 days of BID dosing are presented. AUC fold change was calculated as normalization to 1 mg/kg/dose BID dose.

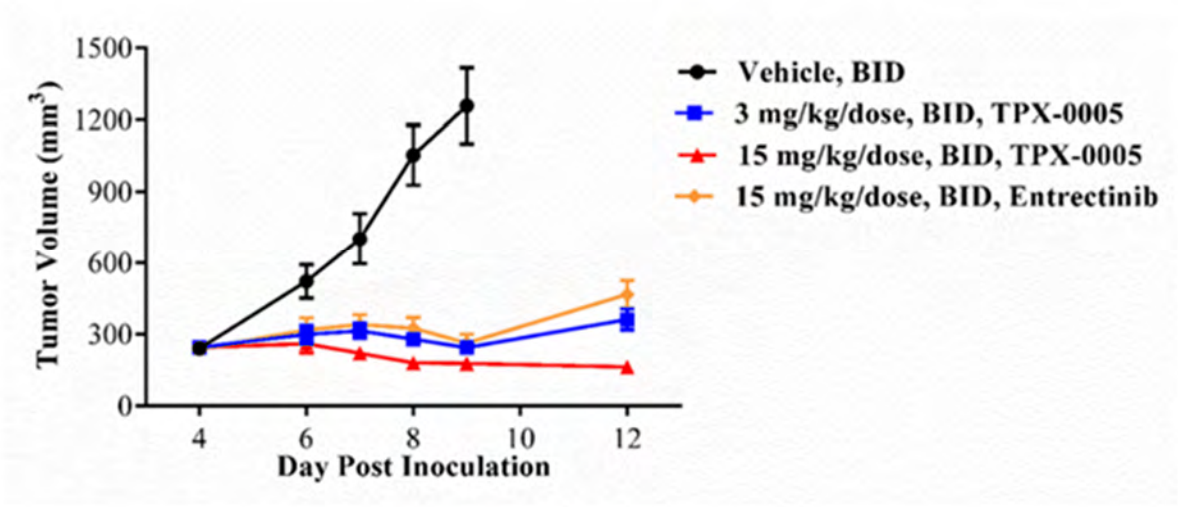
2.3.2.3 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA WT 又は LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果及び薬物動態

LMNA-TRKA WT 又は LMNA-TRKA G595R を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞を移植した雌性胸腺欠損ヌードマウスを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果をエヌトレクチニブと比較評価した（試験番号 00225）。

マウス（5～8 週齢）に、LMNA-TRKA WT 又は LMNA-TRKA G595R を発現する NIH3T3 細胞（3.4×10^6 個）を皮下移植した。平均腫瘍体積が約 240 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 4）。マウス（各群 8～10 匹）に、LMNA-TRKA WT NIH3T3 腫瘍担がんモデルでは、媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）、3 及び 15 mg/kg/dose の Repotrectinib 又は 15 mg/kg/dose のエヌトレクチニブを、LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルでは、媒体、3、15 及び 60 mg/kg/dose の Repotrectinib 又は 60 mg/kg/dose のエヌトレクチニブを、BID で 8 日間経口投与した。媒体対照群は 5 日間投与後（Day 9）に安楽死させたため、TGI は Day 9 の腫瘍体積を用いて算出した。抗腫瘍効果評価終了後、さらに 1 日追加で Repotrectinib を BID 投与（計 9 日間投与）し、最終投与の 0.25、1、2、4、8 及び 12 時間後に採血（各群 3 匹）して血漿中薬物濃度を LC-MS/MS により測定した。

LMNA-TRKA WT NIH3T3 腫瘍担がんモデルに Repotrectinib を 3 及び 15 mg/kg の用量で BID 投与した結果、5 日間投与後（Day 9）に腫瘍増殖が強力に抑制され（TGI はそれぞれ 100%及び 128%）、媒体対照群と比較して、いずれの用量でも統計学的に有意であった（$p < 0.0001$）（Figure 2.3.2.3-1）。また、エヌトレクチニブ 15 mg/kg/dose の BID 投与では、Day 9 の TGI は 98%で、媒体対照群と比較し統計学的に有意な腫瘍増殖抑制が認められた（$p < 0.0001$）。

Figure 2.3.2.3-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 及びエヌトレクチニブの抗腫瘍効果**



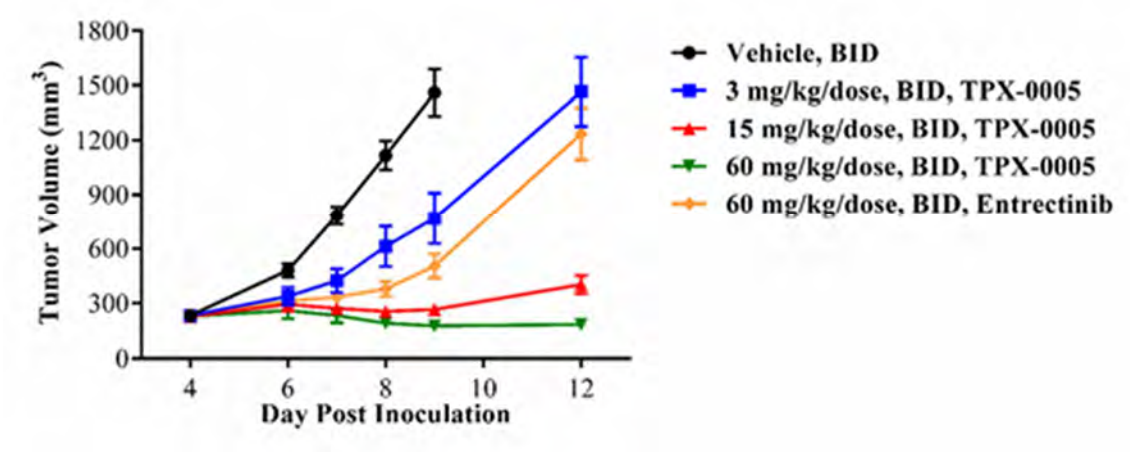
Source: Study 00225
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant in all treatment groups ($p < 0.0001$ compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルに Repotrectinib を 3、15 又は 60 mg/kg/dose で BID 投与した結果、Day 9 の TGI はそれぞれ 56%、97%及び 123%であり、いずれの用量の腫瘍増殖抑制作

用も、媒体対照群と比較し統計学的に有意であった（それぞれ $p < 0.001$、$p < 0.0001$ 及び $p < 0.0001$）（Figure 2.3.2.3-2）。エヌトレクチニブ 60 mg/kg/dose の BID 投与では Day 9 の TGI は 78%であり、媒体対照群と比較し統計学的に有意であった（$p < 0.0001$）。また、本モデルにおいて Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。

Day 12 においては、60 mg/kg/dose の Repotrectinib 投与により、投与開始時と比較し約 20%の腫瘍退縮が認められた。一方、同一用量及び同一期間のエヌトレクチニブ投与では、腫瘍体積は投与開始時から約 5 倍に増加した。すなわち、Repotrectinib は solvent front 変異型の TRKA G595R を有する LMNA-TRKA NIH3T3 腫瘍の増殖を顕著に抑制したが、エヌトレクチニブでは、増殖抑制効果が低いことが示された。

Figure 2.3.2.3-2: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 及びエヌトレクチニブの抗腫瘍効果**



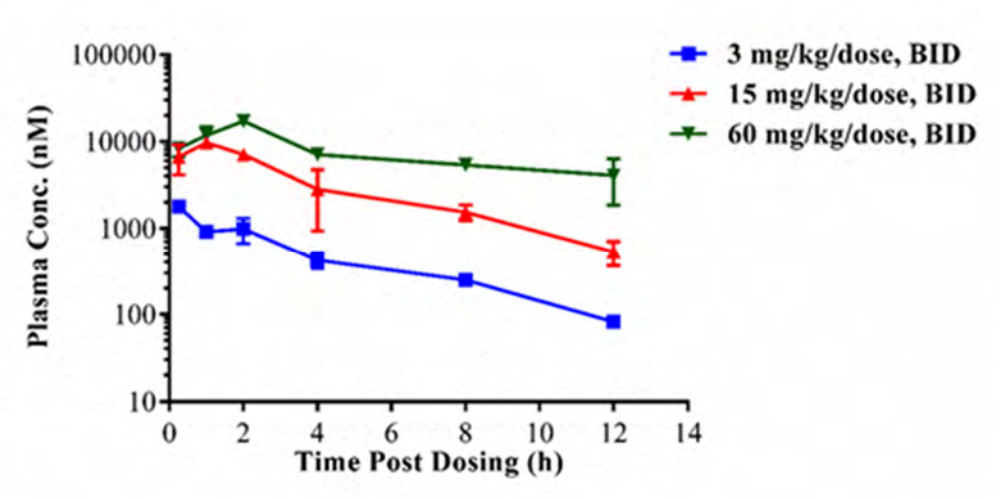
Source: Study 00225
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8-10 animals per group. All of the effects on TGI were statistically significant in the 3, 15 and 60 mg/kg/dose of TPX-0005 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$, and $p < 0.0001$, respectively, compared to vehicle) and 60 mg/kg/dose of Entrectinib groups ($p < 0.0001$) (Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

LMNA-TRKA WT NIH3T3 及び LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルマウスにおける Repotrectinib の血漿中濃度推移を Figure 2.3.2.3-3 に、各種薬物動態（PK）パラメータを Table 2.3.2.3-1 に示す。9 日間の Repotrectinib 反復投与後、血漿中濃度は 3、15 及び 60 mg/kg/dose の投与で用量依存的に増加した。Repotrectinib の 3、15 及び 60 mg/kg/dose 投与群における C_{trough} は、それぞれ 82、536 及び 4103 nM であった。15 mg/kg/dose の用量では、$AUC_{(0\text{-}12h)}$及び非結合型の推定 C_{trough} はそれぞれ 38301 h•nM 及び 22.7 nM［マウス血漿中 fu 4.23%（M2.6.5、6 項）に基づく］であった。すなわち、15 mg/kg/dose の本曝露量において、LMNA-TRKA WT NIH3T3 腫瘍担がんモデルでは腫瘍が投与

開始時よりも退縮し、LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルでは 97%の腫瘍増殖抑制が認められている。

以上より、雌性ヌードマウスに WT の LMNA-TRKA 融合タンパク質又は変異型の LMNA-TRKA G595R 融合タンパク質を発現する NIH3T3 細胞を移植した担がんモデルにおいて、Repotrectinib の投与により統計学的有意で用量依存的な抗腫瘍効果が示された。さらに、これらの腫瘍モデルに対する Repotrectinib の抗腫瘍効果はエヌトレクチニブよりも高く、特に solvent front 変異を有する TRKA 腫瘍モデルでその差は顕著であった。

Figure 2.3.2.3-3: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA（WT 及び G595R）発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時の血漿中薬物濃度推移**



Source: Study 00225
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 3 animals per group per time point.

Table 2.3.2.3-1: **胸腺欠損ヌードマウス LMNA-TRKA NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時（Day 12）の血漿中 PK パラメータ**

Dosage (mg/kg/dose, BID)	Days of Dosing	$AUC_{(0\text{-}12h)}$ (h•nM)	Fold change in $AUC_{(0\text{-}12h)}$	$C_{ss,\ max}$ (nM)	C_{trough} (nM)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	$C_{average}$ (nM)
3	9	5628	1.0	1794	82	0.25	3.4	468
15	9	38301	6.8	9713	536	1	3.3	3187
60	9	91631	16.3	17216	4103	2	10.0	7625

Source: Study 00225
Abbreviations: $AUC_{(0\text{-}12h)}$ = area under curve from 0 to 12 hour; BID = twice daily; $C_{average}$ = average plasma concentration between 0 and 12 hour; $C_{ss,\ max}$ = maximum plasma concentration at steady state; C_{trough} = plasma

concentration at 12 hour (same as the minimum plasma concentration in this experiment) at steady state; T_{max} = time to C_{max}; $t_{1/2}$ = elimination half-life.

2.3.2.4 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時の血漿中薬物濃度及び PD 作用

雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルに Repotrectinib 反復経口投与時の血漿中薬物濃度及び PD 作用を評価した（試験番号 00231）。

マウス（5～8 週齢）に LMNA-TRKA G595R を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞（3.4×10^6 個）を皮下移植した。平均腫瘍体積が約 580 mm^3に達した時点でマウスを 5 群に割り付け、投与を開始した。マウスに媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 3 及び 15 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 3 回経口投与した。最終投与の 3 及び 12 時間後に血漿及び腫瘍組織を採取した。Repotrectinib の血漿中濃度を LC-MS/MS により測定し、腫瘍組織における PD 作用をウエスタンブロット法により評価した（各群 4 匹）。

Repotrectinib は LMNA-TRKA G595R 融合タンパク質の自己リン酸化を用量依存的に阻害し、投与後の時間経過と共にリン酸化阻害は減弱した（Table 2.3.2.4-1）。Repotrectinib 3 mg/kg/dose の BID 投与により、最終投与 3 及び 12 時間後の LMNA-TRKA G595R の自己リン酸化がそれぞれ 85%及び 56%阻害され、それらの時点での Repotrectinib の平均血漿中濃度がそれぞれ 275.9 及び 39.4 nM であった。Repotrectinib 15 mg/kg/dose の BID 投与では、最終投与 3 及び 12 時間後の LMNA-TRKA G595R の自己リン酸化がそれぞれ 96%及び 74%阻害され、それらの時点での Repotrectinib の平均血漿中濃度がそれぞれ 2171.4 及び 72.7 nM であった。

なお、前述の別試験（試験番号 00225）で同じく LMNA-TRKA NIH3T3 腫瘍担がんモデルに Repotrectinib を同じ用量の 15 mg/kg/dose で 9 日間 BID 投与をした際の血漿中 PK パラメータは、定常状態の最高血漿中濃度（$C_{ss, max}$）、C_{trough}、$C_{average}$ 及び $AUC_{(0\text{-}12h)}$が、それぞれ 9713 nM、536 nM、3187 nM 及び 38301 h•nM であり（Table 2.3.2.3-1）、本曝露量において LMNA-TRKA G595R NIH3T3 腫瘍担がんモデルの腫瘍増殖が 97%阻害されている（Figure 2.3.2.3-2）。

Table 2.3.2.4-1: 雌性胸腺欠損ヌードマウスの LMNA-TRKA G595R 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 反復経口投与時の PD 作用及び血漿中薬物濃度

Dose	Time post last Dose (h)	No. of Mice	Phospho-LMNA-TRKA Mean ± SEM (%)[a]	Mean Plasma Concentration	
				ng/mL	nM
3 mg/kg, BID	3	4	15.1 ± 4.1	98.2	275.9
	12	4	44.5 ± 7.7	14.0	39.4
15 mg/kg, BID	3	4	3.7 ± 2.6	772.8	2171.4
	12	4	25.7 ± 3.8	25.9	72.7

Source: Study 00231
Abbreviations: BID = twice daily; SEM = standard error of mean.

[a] Results for the phosphorylation of LMNA-TRKA are presented as percentage of phosphorylation in the TPX-0005 treated mice over that of the vehicle treated mice.

2.3.3 ALK 融合タンパク質（WT 及び変異型）発現細胞移植マウスにおける評価

2.3.3.1 雌性 SCID/Beige マウスの NPM-ALK 発現 Karpas299 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果、血漿中薬物濃度及び PD 作用

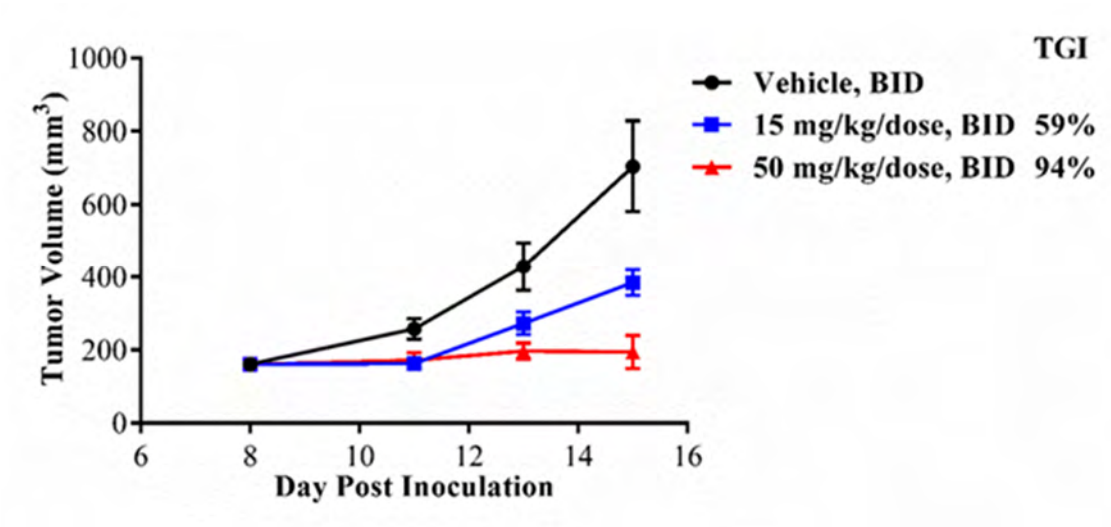
NPM-ALK 融合タンパク質を内因性に発現するヒト T 細胞リンパ腫 Karpas299 細胞を移植した雌性 SCID/Beige マウスを用い、Repotrectinib の抗腫瘍効果、血漿中薬物濃度及び PD 作用を評価した（試験番号 00151）。

マウス（5～8 週齢）に Karpas299 細胞（5×10^6 個）を皮下移植し（Day 0）、平均腫瘍体積が約 190 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 8）。マウス（各群 8 匹）に、媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 15 及び 50 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 7 日間経口投与した。

また、本モデルにおける Repotrectinib の血漿中薬物濃度及び PD 作用を評価するため、抗腫瘍効果評価終了後の最終投与 3 及び 12 時間後に各群 2～4 匹から血漿及び腫瘍組織を採取した。血漿中の Repotrectinib 濃度を LC-MS/MS により測定し、腫瘍組織における NPM-ALK の自己リン酸化並びに STAT3、AKT 及び ERK1/2 などの下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する Repotrectinib の阻害効果をウエスタンブロット法により評価した。

Repotrectinib を 15 及び 50 mg/kg/dose の用量で BID 投与すると、腫瘍増殖が強力に抑制され、試験終了時の TGI はそれぞれ 59%及び 94%であり、いずれの群においても統計学的に有意であった（媒体対照群との比較でそれぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.001$）（Figure 2.3.3.1-1）。本モデルおいて、いずれの用量でも Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。

Figure 2.3.3.1-1: **雌性 SCID/Beige マウスの NPM-ALK 発現 Karpas299 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00151
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant for the 15 mg/kg/dose and 50 mg/kg/dose groups ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively, compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

Repotrectinib の血漿中濃度及び腫瘍組織でのリン酸化に対する PD 作用を Table 2.3.3.1-1 及び Table 2.3.3.1-2 に示す。

15 mg/kg/dose BID の 7 日間投与では、Repotrectinib の血漿中濃度は最終投与 3 時間後で 1050 nM、12 時間後で 228 nM であり、その際の NPM-ALK の自己リン酸化阻害はそれぞれ 91%及び 79%で、ALK 下流のシグナル伝達分子 STAT3 のリン酸化阻害はそれぞれ 92%及び 67%であった。50 mg/kg/dose BID の 7 日間投与では、Repotrectinib の血漿中濃度は最終投与 3 時間後で 4596 nM、12 時間後で 453 nM であり、NPM-ALK の自己リン酸化阻害はそれぞれ 96%及び 90%、STAT3 リン酸化阻害はそれぞれ 97%及び 77%であった。さらに、Repotrectinib はいずれの用量においても AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対しても阻害作用を示した。

Table 2.3.3.1-1: 雌性 SCID/Beige マウスの Karpas299 腫瘍担がんモデルにおける NPM-ALK、STAT3、AKT 及び ERK1/2 のリン酸化に対する Repotrectinib 7 日間 BID 投与時の PD 作用

Dose	Time point post last dose (h)	No of mice	% of control			
			Phospho-ALK	Phospho-STAT3	Phospho-AKT	Phospho-ERK1/2
15 mg/kg BID for 7 days	3	4	9.5 ± 1.6	7.6 ± 1.0	13.3 ± 1.5	10.7 ± 1.1
	12	4	21.0 ± 5.9	33.5 ± 6.6	14.2 ± 3.3	22.1 ± 6.6
50 mg/kg BID for 7 days	3	3	3.7 ± 1.0	3.2 ± 0.4	12.5 ± 2.1	18.5 ± 2.6
	12	4	10.5 ± 0.7	22.8 ± 3.9	13.4 ± 2.2	27.5 ± 1.2

Source: Study 00151
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM).

Table 2.3.3.1-2: 雌性 SCID/Beige マウスの Karpas299 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib 7 日間 BID 投与時の血漿中薬物濃度

Dose	Time point post last dose (h)	No of mice	Mean plasma concentration		Mean free concentration
			ng/mL	nM	nM
15 mg/kg BID for 7 days	3	2	373	1050	44
	12	4	92	228	11
50 mg/kg BID for 7 days	3	3	1633	4596	194
	12	3	161	453	19

Source: Study 00151
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Mouse plasma protein binding fu = 0.0423 (M2.6.5 Section 6) was used to calculate the free plasma concentration of TPX-0005.

以上の結果から、NPM-ALK 融合タンパク質を内因性に発現する Karpas299 腫瘍担がんモデルにおいて、Repotrectinib 投与により NPM-ALK の自己リン酸化が時間及び用量依存的に阻害され、統計学的有意かつ用量依存的な抗腫瘍効果が示された。

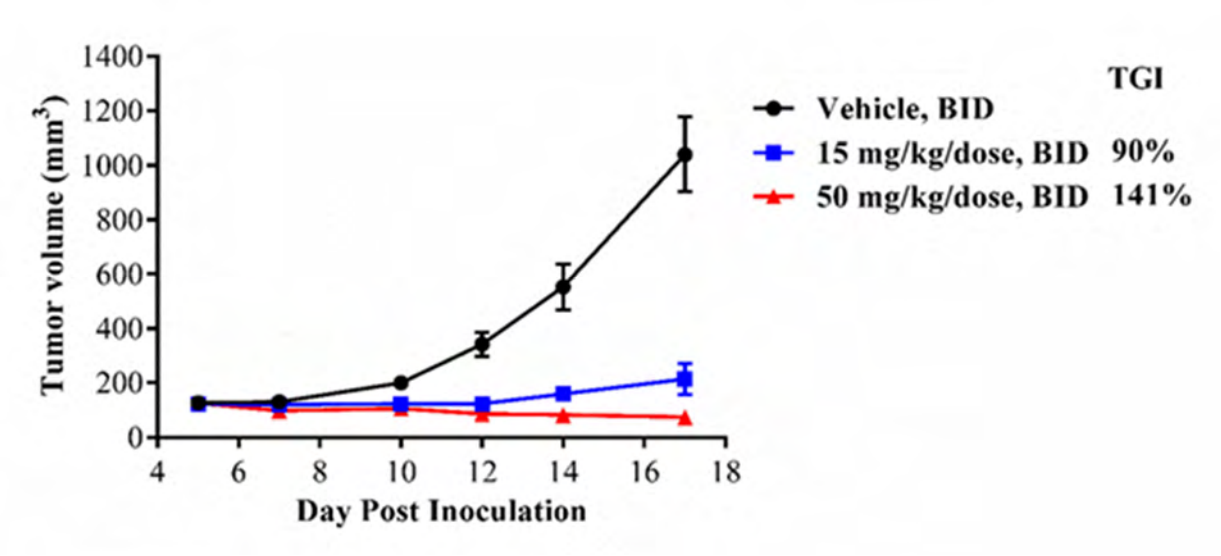
2.3.3.2 雌性胸腺欠損ヌードマウスの EML4-ALK v1 WT 発現 NIH3T3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果

EML4-ALK v1 WT を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞を移植した雌性胸腺欠損ヌードマウスを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果を評価した（試験番号 00152）。

マウス（5～8 週齢）に EML4-ALK v1 WT を発現する NIH3T3 細胞（5×10^6 個）を皮下移植した。平均腫瘍体積が約 100 mm^3 に達した時点で投与を開始した（Day 5）。マウス（各群 8 匹）に、媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 15 及び 50 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 12 日間経口投与した。

Repotrectinib を 15 及び 50 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、腫瘍増殖が強力に抑制され、TGI はそれぞれ 90%及び 141%で、いずれの用量においても統計学的に有意な腫瘍増殖抑制であった（媒体対照群との比較でいずれも $p < 0.0001$）（Figure 2.3.3.2-1）。また、本モデルにおいて、Repotrectinib のいずれの用量群でも体重減少は認められなかった。したがって、Repotrectinib 投与により、EML4-ALK v1 融合タンパク質発現 NIH3T3 細胞を皮下移植した担がんモデルにおいて統計学的有意かつ用量依存的な抗腫瘍効果が認められた。Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。

Figure 2.3.3.2-1: **雌性胸腺欠損ヌードマウスの EML4-ALK v1 WT 発現 NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00152
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 7 animals (one mouse was found dead during the treatment on Day 10 and excluded from the data analysis) in the vehicle group and 8 animals for both the 15 and 50 mg/kg treatment groups. The TGI was statistically significant for the 15 mg/kg/dose and 50 mg/kg/dose groups (each with $p < 0.0001$ compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

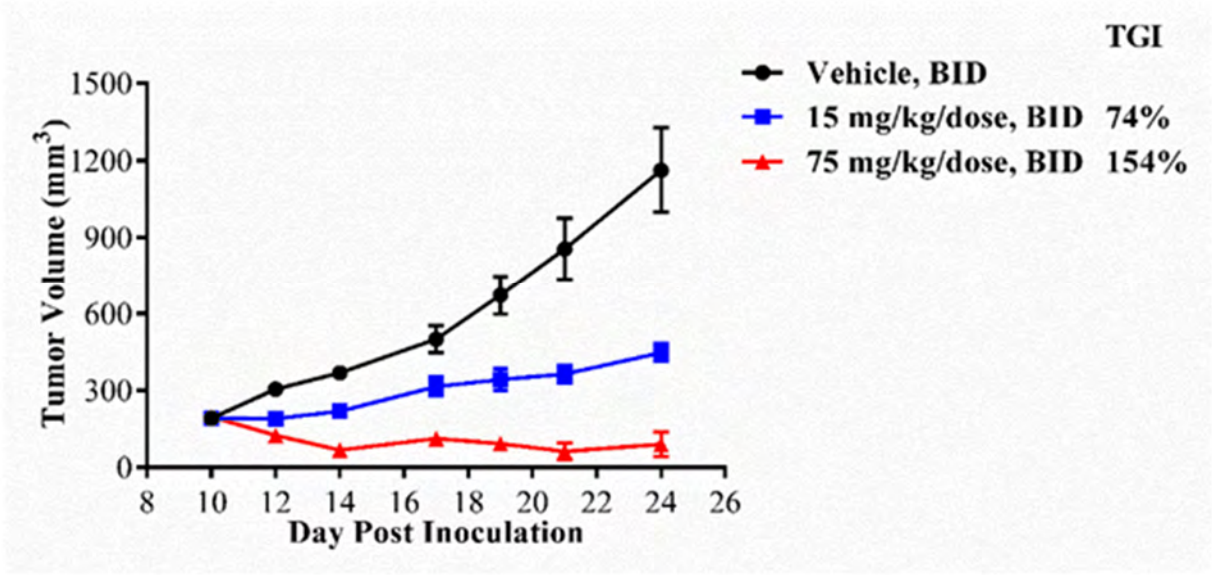
2.3.3.3 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 WT 又は EML4-ALK v1 G1202R 発現 Ba/F3 細胞皮下移植モデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果

EML4-ALK v1 WT 又は EML4-ALK v1 G1202R を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞を移植した雌性 SCID/Beige マウスを用いて、Repotrectinib の抗腫瘍効果を評価した（試験番号 00181）。

マウス（5～8 週齢）に EML4-ALK v1 WT 又は EML4-ALK v1 G1202R を発現する Ba/F3 細胞（5×10^6 個）を皮下移植した。平均腫瘍体積が約 200 mm^3 に達した時点で投与を開始した（EML4-ALK v1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデルでは Day 10、EML4-ALK v1 G1202R Ba/F3 腫瘍担がんモデルでは Day 14）。マウス（各群 8 匹）に、媒体（1.0% Tween 80 添加 0.5% CMC 水溶液）又は 15 及び 75 mg/kg/dose の Repotrectinib を BID で 14 日間（EML4-ALK v1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデル）又は 17 日間（EML4-ALK v1 G1202R Ba/F3 腫瘍担がんモデル）経口投与した。

EML4-ALK v1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデルでは、Repotrectinib を 15 及び 75 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、腫瘍増殖が強力に抑制され、TGI はそれぞれ 74%及び 154%で、いずれの用量でも統計学的に有意な腫瘍増殖抑制であった（媒体対照群との比較でそれぞれ $p < 0.001$ 及び $p < 0.0001$）（Figure 2.3.3.3-1）。また、Repotrectinib 投与による体重減少は認められなかった。

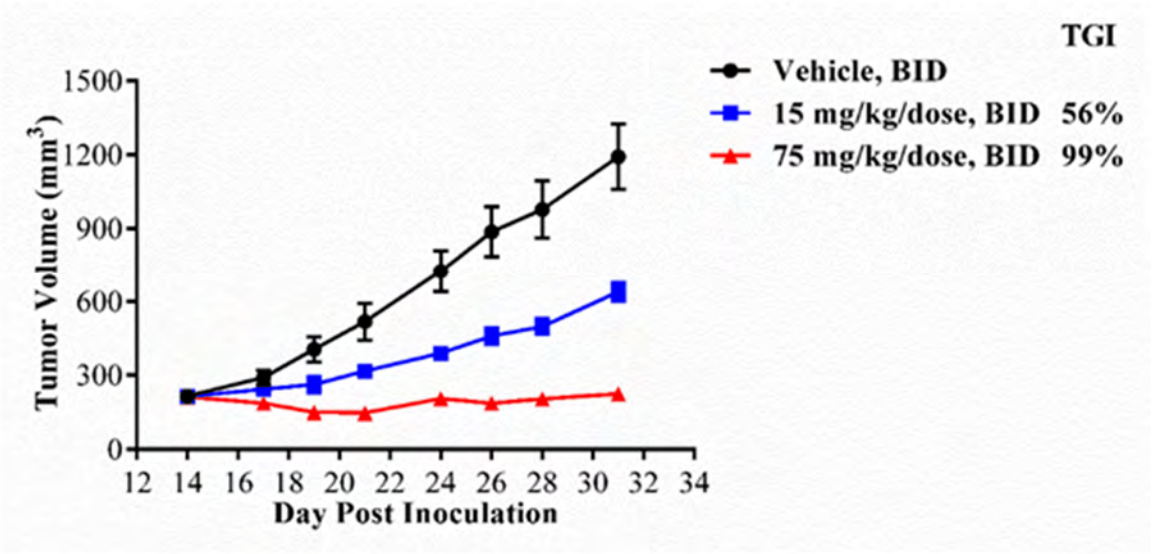
Figure 2.3.3.3-1: 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 WT 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果



Source: Study 00181
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant at both dose levels ($p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively, compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

EML4-ALK v1 G1202R Ba/F3 腫瘍担がんモデルでは、Repotrectinib を 15 及び 75 mg/kg/dose の用量で BID 投与した結果、腫瘍増殖が強力に抑制され、TGI はそれぞれ 56%及び 99%で、いずれの用量でも統計学的に有意な腫瘍増殖抑制であった（媒体対照群との比較でそれぞれ $p < 0.001$ 及び $p < 0.0001$）（Figure 2.3.3.3-2）。

Figure 2.3.3.3-2: **雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 G1202R 発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib の抗腫瘍効果**



Source: Study 00181
Abbreviations: BID = twice daily; TGI = tumor growth inhibition.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 8 animals per group. The TGI was statistically significant at both dose levels ($p < 0.001$ and < 0.0001, respectively, compared to vehicle. Two-way repeated analysis of variance [ANOVA] followed by post hoc analysis was used for statistical analysis).

以上のように、Repotrectinib 投与は、雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1 WT Ba/F3 腫瘍担がんモデル及び EML4-ALK v1 G1202R Ba/F3 腫瘍担がんモデルのいずれにおいても統計学的に有意かつ用量依存的な抗腫瘍効果を示した。これらのデータから、WT の ALK 融合タンパク質を発現する腫瘍及び臨床で使用されている ALK 阻害剤に耐性を示す ALK G1202R 変異型融合タンパク質を発現する腫瘍に対して、Repotrectinib は抗腫瘍活性を有することが示された。

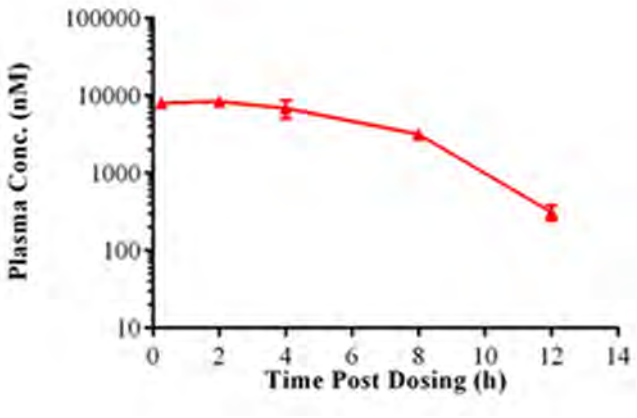
2.3.3.4 雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1（WT 若しくは G1202R）又は CD74-ROS1（WT 若しくは G2032R）発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib BID 反復投与時の薬物動態

EML4-ALK v1（WT 若しくは G1202R）を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞又は CD74-ROS1（WT 若しくは G2032R）を発現する Ba/F3 細胞を皮下移植した SCID/Beige マウスにおける Repotrectinib BID 反復投与後の PK を評価した（試験番号 00181）。

雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1（WT 若しくは G1202R）発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデル又は CD74-ROS1（WT 若しくは G2032R）発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルを用いた異なる 2 つの抗腫瘍効果評価試験（試験番号 00181 及び 00182）において、75 mg/kg/dose の Repotrectinib を投与したマウスから、最終投与後 0.25、2、4、8、12 時間で採血を行い、LC-MS/MS により Repotrectinib の血漿中濃度を測定し（Figure 2.3.3.4-1）、PK パラメータを算出した（Table 2.3.3.4-1）。

Repotrectinib 75 mg/kg/dose を BID 反復投与時の $AUC_{(0\text{-}12h)}$、C_{max}、C_{trough} 及び $C_{average}$ の平均値は、それぞれ 57538 h•nM、8421 nM、314 nM 及び 4795 nM であった。

Figure 2.3.3.4-1: **雌性 SCID/Beige マウスの EML4-ALK v1（WT 若しくは G1202R）又は CD74-ROS1（WT 若しくは G2032R）発現 Ba/F3 腫瘍担がんモデルにおける Repotrectinib（75 mg/kg/dose）BID 反復経口投与時の血漿中薬物濃度推移**



Source: Study 00181
Abbreviations: BID = twice daily.
Notes: Data represent mean ± standard error of mean (SEM) of 3 animals per time point.

Table 2.3.3.4-1: **SCID/Beige マウス皮下移植担がんモデルに 75 mg/kg BID 反復経口投与時の Repotrectinib の血漿中 PK パラメータ**

Dosage (mg/kg/dose, BID)	$AUC_{(0\ 12h)}$ (h•nM)	$C_{ss,\ max}$ (nM)	C_{trough} (nM)	Free C_{trough} (nM)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	$C_{average}$ (nM)
75	57538	8421	314	13.3	2	1.2	4795

Source: Study 00181
Abbreviations: $AUC_{(0\text{-}12h)}$ = area under curve from 0 to 12 hour; BID = twice daily; $C_{average}$ = average plasma concentration; C_{max} = maximum observed plasma concentration; $C_{ss,\ max}$ = maximum plasma concentration at steady state; C_{trough} = observed concentration at the end of a dosing interval; $t_{1/2}$ = elimination half-life; T_{max} = time to C_{max}.

2.4 Repotrectinib のキナーゼ選択性

2.4.1 キナーゼ選択性スクリーニング評価

KINOME*scan*®活性部位特異的競合結合アッセイを用いて、456 種類のヒトキナーゼ及びそれらの変異型に対する Repotrectinib のキナーゼ選択性をスクリーニング評価し、結合シグナル（%Ctrl）を算出した｛%Ctrl＝［（被験物質シグナル− 陽性対照シグナル）／（陰性対照シグナル− 陽性対照シグナル）］× 100%｝（試験番号 00098）。陰性対照シグナルは媒体［ジメチルスルホキシド（DMSO）］によるシグナル（100%Ctrl）を、陽性対照シグナルは陽性対照物質によるシグナル（0%Ctrl）を示し、%Ctrl 値が小さいほどより強力に競合することを示す。

%Ctrl が 10%未満のヒットキナーゼの一覧を Table 2.4.1-1 に示す。

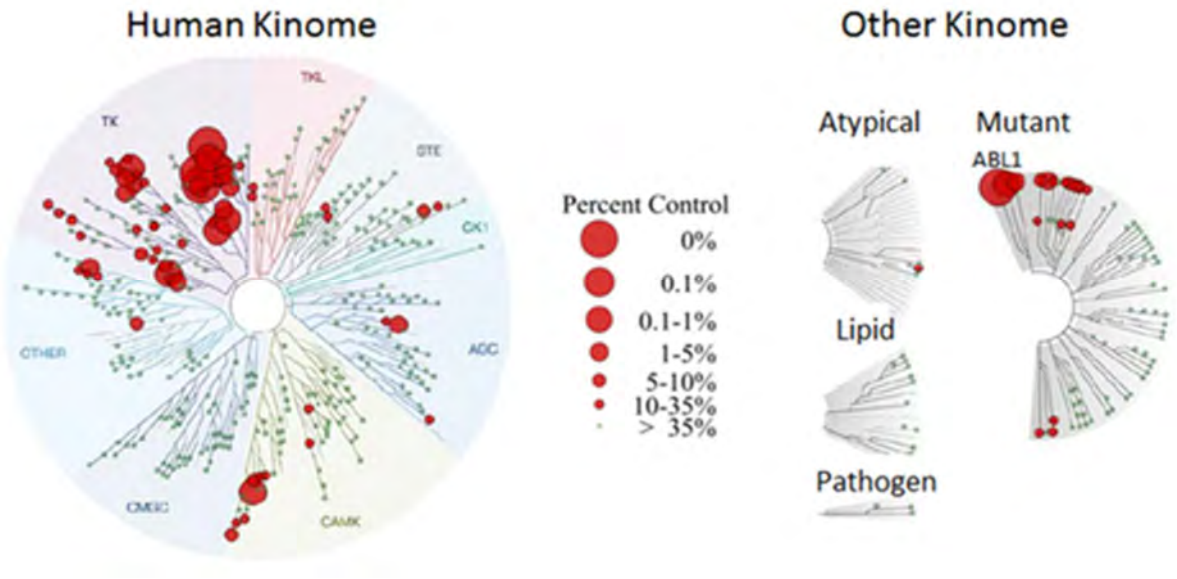
Table 2.4.1-1: Repotrectinib に対する結合シグナル（%Ctrl）が 10%未満のヒトキナーゼ

Kinase	%Ctrl	Kinase	%Ctrl	Kinase	%Ctrl
JAK2	0	ALK	1.1	LTK	3.6
JAK3	0	GRK7	1.3	ROS1	4.2
TRKA	0	DDR2	1.4	EPHA1	5.3
TRKC	0	TXK	1.6	HCK	6.8
DDR1	0.3	TYK2	1.6	EPHA8	6.9
TRKB	0.35	FAK	2	MAP3K2	7.2
EPHB6	0.45	LCK	2	MARK3	7.3
SRC	0.45	PLK4	2.2	ARK5	8.5
TNK2	0.6	BLK	2.7	SgK110	9.9
SNARK	0.9				

Source: Study 00098

KINOME*scan*®のスクリーニングデータを解析するための化合物プロファイル可視化ツールである TREEspot™を用いて、ヒトキノーム並びに変異型、非定型、脂質及び病原体の各キノームについて、キナーゼに対する Repotrectinib の親和性を相互作用マップとして可視化した（Figure 2.4.1-1）。Repotrectinib に結合したキナーゼは赤丸で示し、丸が大きいほど高い結合親和性を示す。

Figure 2.4.1-1: **Repotrectinib とヒトキノーム並びに非定型、脂質、病原体及び変異型キノームとの相互作用マップ**



Source: Study 00098

さらに、主要標的である ROS1、ALK 並びに TRKA、TRKB 及び TRKC に対する Repotrectinib の解離定数（Kd）を測定した（Table 2.4.1-2）。

Table 2.4.1-2: **Repotrectinib の ROS1、ALK 並びに TRKA、TRKB 及び TRKC に対する解離定数**

Target Kinase	Kd (nM)
ROS1	0.19
ALK	5.7
TRKA	0.019
TRKB	0.054
TRKC	0.088

Source: Study 00098
Abbreviations: Kd = dissociation constant.

2.4.2 Repotrectinib のキナーゼ阻害活性（副次的標的）

KINOME*scan*®スクリーニングで%Ctrl が 10%未満であったキナーゼを中心に、放射性標識 HotSpot キナーゼアッセイを用いて Repotrectinib のキナーゼ阻害の IC_{50} を算出した（試験番号 00110）。

2.1 項に記載のとおり、Repotrectinib はその主要標的キナーゼとして、ROS1、TRKA、TRKB、TRKC 及び ALK を阻害する。さらに、Repotrectinib は他の複数のキナーゼも阻害し、その IC_{50} を Table 2.4.2-1 に示す。

Table 2.4.2-1: Repotrectinib のキナーゼ阻害活性（副次的標的）

Kinase	IC_{50} (nM)
JAK2	1.04
TXK	3.17
ARK5	4.46
SRC	5.29
DDR1	5.73
FAK	6.96
SNARK	13.0
HCK	16.4
LCK	18.6
JAK1	18.8
TYK2	21.6
TYK1	21.8
DDR2	23.0
ACK1	24.1
EPHA1	25.0
BLK	32.3
GRK7	35.2
PYK2	39.9
RET	47.1
JAK3	49.9
EPHA8	50.2
PLK4	126
AXL	149
MARK3	512

Source: Study 00110
Abbreviations: IC_{50} = half maximal inhibitory concentration.

2.4.3 H2228 及び HT1080 細胞株における SRC/FAK 及びそれらの関連シグナル経路に対する Repotrectinib の活性

2.4.3.1 H2228 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性並びにキナーゼ自己リン酸化及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化の阻害活性

ヒト肺癌 H2228 細胞株は EML4-ALK 融合遺伝子を内因性に発現しているが、ALK 阻害剤クリゾチニブに高い耐性を示す。H2228 細胞では、SRC 及び FAK 並びに関連するシグナル経路の構成因子の発現上昇が認められ、その結果、細胞増殖が誘導され、ALK 阻害剤に対する耐性が生じると考えられている。このため、H2228 細胞を用いて、SRC 及び FAK 並びに関連するシグナル経路の分子に対する Repotrectinib の作用を評価した。

Repotrectinib の細胞増殖抑制活性は、ATP 定量アッセイを用いて測定し、キナーゼ及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する作用は、キナーゼリン酸化アッセイにおいてウエスタンブロット法により測定した（試験番号 00108）。

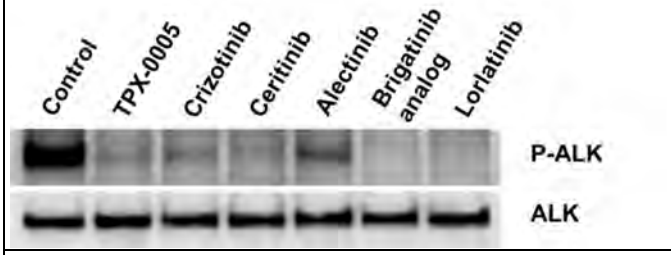
Repotrectinib は、細胞増殖アッセイにおいて H2228 細胞の増殖を抑制したが（IC_{50}：約 100 nM）、クリゾチニブ及びセリチニブの活性はより低かった（IC_{50}：1200 及び 1000 nM）。

細胞増殖アッセイでは、H2228 細胞はクリゾチニブ及びセリチニブに対し耐性を示したが、H2228 細胞の ALK リン酸化に対しては、Repotrectinib 並びにクリゾチニブ及びセリチニブを含む他の ALK 阻害剤は 100 nM の濃度で顕著な阻害作用を示した（Figure 2.4.3.1-1）。

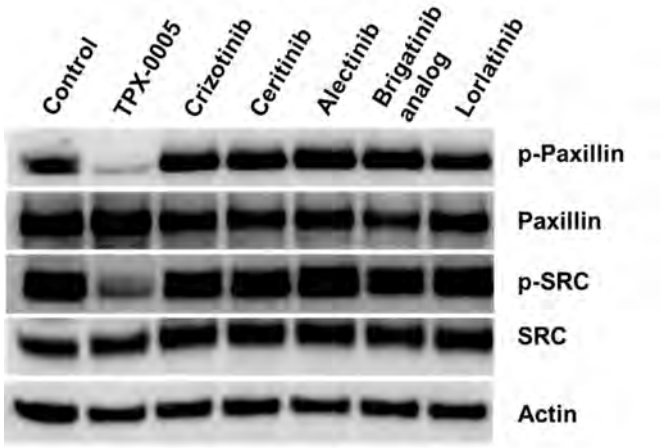
また、Repotrectinib は H2228 細胞において 1000 nM の濃度で SRC 及び下流のシグナル伝達分子であるパキシリンのリン酸化を顕著に阻害したが、他の ALK 阻害剤は同濃度でほとんど阻害しなかった。また、Repotrectinib は、H2228 細胞において SRC 及び FAK 並びに下流のシグナル伝達分子のパキシリンのリン酸化を濃度依存的に阻害した。SRC ファミリーに対する選択的な阻害剤である Saracatinib も SRC、FAK 及びパキシリンのリン酸化を阻害し、Repotrectinib と同等の活性を示した（Figure 2.4.3.1-1）。

Figure 2.4.3.1-1: **Repotrectinib の ALK、SRC、FAK 及び下流のシグナル伝達分子のリン酸化に対する阻害活性並びに ALK 及び SRC ファミリー阻害剤との比較**

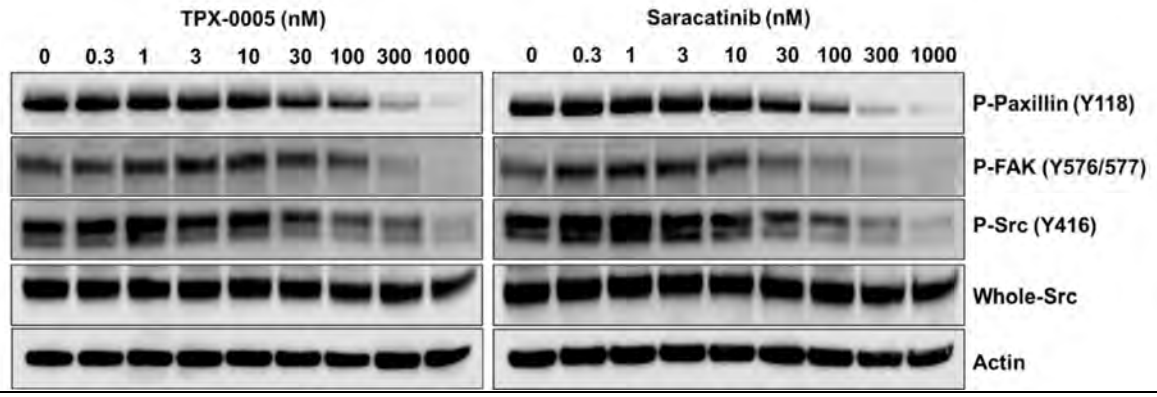
Phosphorylation of ALK (at 100 nM TPX-0005 or other inhibitors)



Phosphorylation of SRC and Paxillin (at 1000 nM TPX-0005 or other inhibitors)



Phosphorylation of FAK, SRC and Paxillin (0.3-1000 nM TPX-0005 or saracatinib)



Source: Study 00108

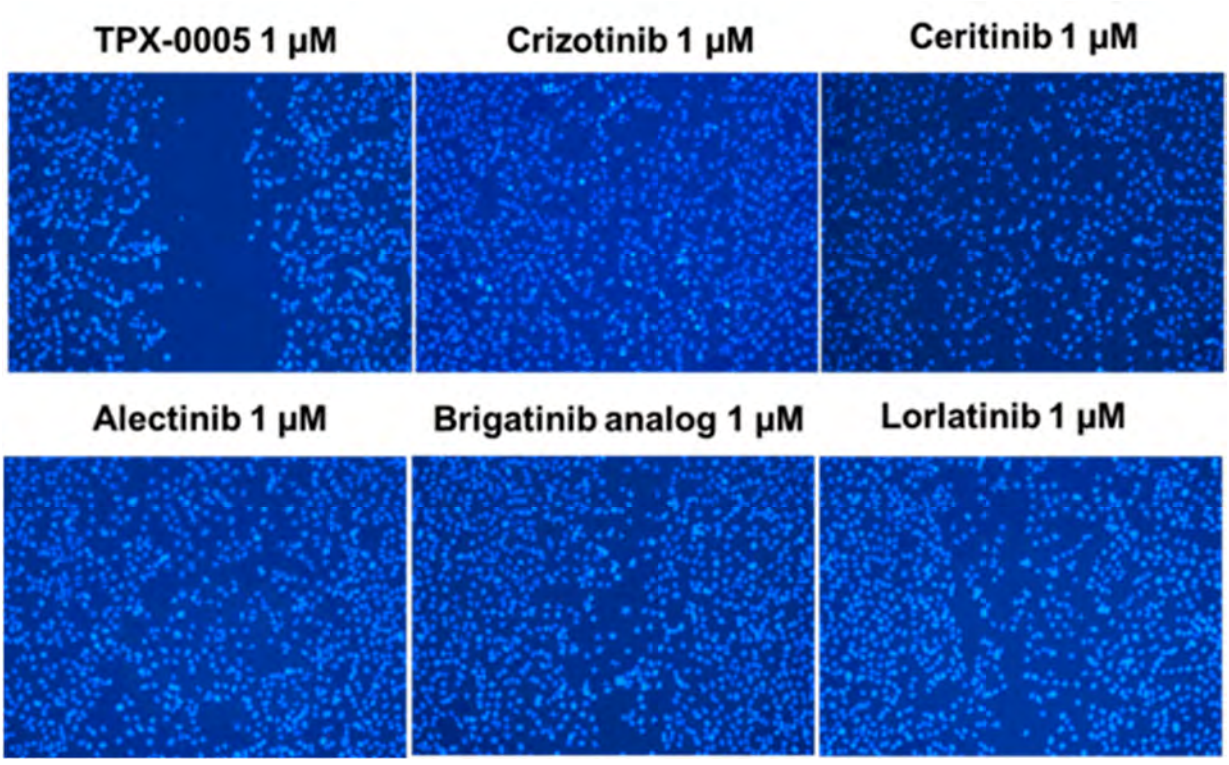
2.4.3.2 HT1080 及び H2228 細胞における細胞遊走の阻害

SRC がん遺伝子は、腫瘍の浸潤及び進行、上皮間葉転換、血管新生並びに転移に関与すると考えられており[16]、SRC/FAK 阻害剤は、創傷治癒アッセイにおいて効果を示すことが報告されている[17]。

SRC/FAK シグナル経路依存性の細胞遊走に対する Repotrectinib の作用について、SRC 及び FAK の活性が高い HT1080 細胞を用いた in vitro 創傷治癒スクラッチアッセイ及び H2228 細胞を用いたボイデンチャンバーにおけるトランスウェル遊走アッセイにより評価した（試験番号 00108）。

HT1080 細胞を用いた創傷治癒アッセイにおいて、Repotrectinib は細胞遊走を強力に阻害したが、他の ALK 阻害剤は、効果が低い（ブリグチニブアナログ及びロルラチニブ）か、全く効果を示さなかった（クリゾチニブ、セリチニブ及びアレクチニブ）（Figure 2.4.3.2-1）。

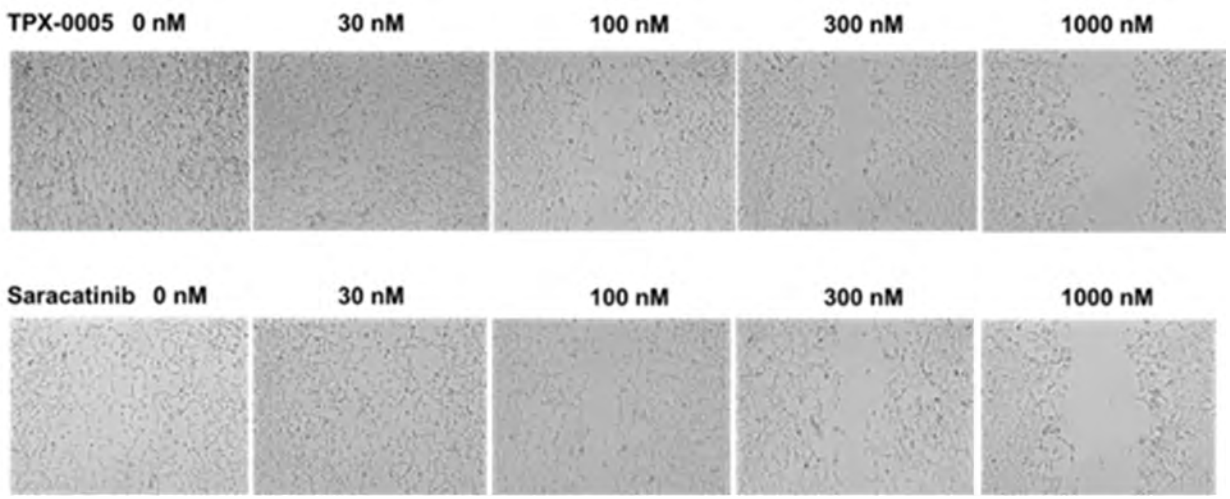
Figure 2.4.3.2-1: **創傷治癒アッセイにおける Repotrectinib 及び他の ALK 阻害剤の HT1080 細胞の遊走に対する作用**



Source: Study 00108

また同アッセイ系での評価において、Repotrectinib は濃度依存的に細胞遊走を阻害し、選択的 SRC 阻害剤である Saracatinib と同程度の効果を示した（Figure 2.4.3.2-2）。

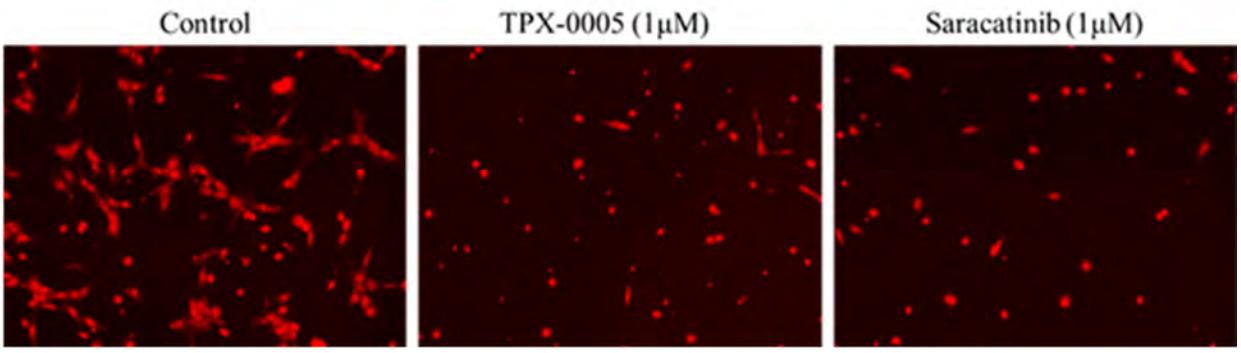
Figure 2.4.3.2-2: **創傷治癒アッセイにおける HT1080 細胞の遊走に対する Repotrectinib 及び Saracatinib の濃度依存的作用**



Source: Study 00108

トランスウェル遊走アッセイにおける H2228 細胞の走化性の細胞遊走に対する Repotrectinib の阻害作用を Figure 2.4.3.2-3 及び Table 2.4.3.2-1 に示す。Repotrectinib（1 μM）処理により遊走細胞数が顕著に減少（対照群の 36.5%）し、Saracatinib（1 μM）処理による減少（対照群の 26.5%）と同等であった。

Figure 2.4.3.2-3: **トランスウェル遊走アッセイにおける H2228 細胞の遊走に対する Repotrectinib と Saracatinib の作用**



Source: Study 00108

Table 2.4.3.2-1: トランスウェル遊走アッセイにおける Repotrectinib 及び Saracatinib による H2228 細胞の遊走阻害

Compound	Concentration (μM)	Number of Cells in Images						% of Control
		1	2	3	4	5	Total	
Control	NA	174	135	147	141	142	739	100
TPX-0005	1	43	52	65	67	43	270	36.5
Saracatinib	1	43	41	35	38	39	196	26.5

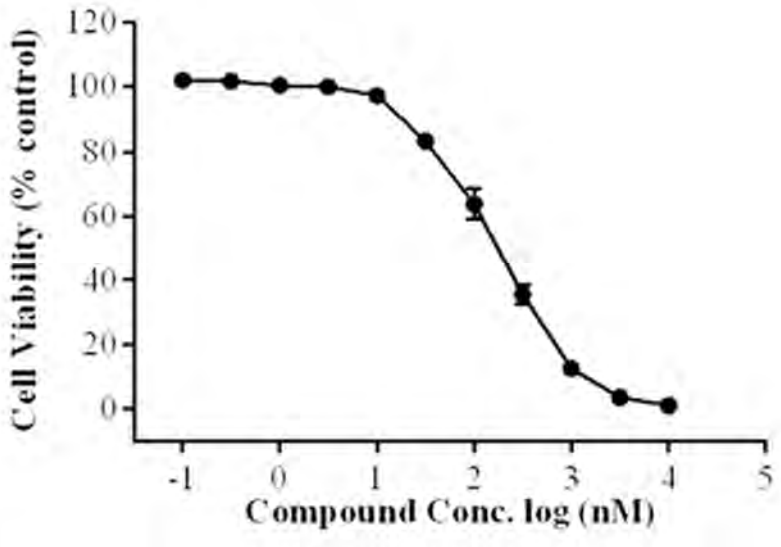
Source: Study 00108
Abbreviations: NA = not applicable.

2.4.4 SET2 細胞における Repotrectinib の JAK2 V617F に対する活性

JAK2 に対する Repotrectinib の阻害活性を細胞レベルで評価するため、内因性に JAK2 V617F 変異型を発現する SET2 細胞を Repotrectinib で処理し、細胞増殖及び STAT5 リン酸化の阻害を評価した（試験番号 00236）。

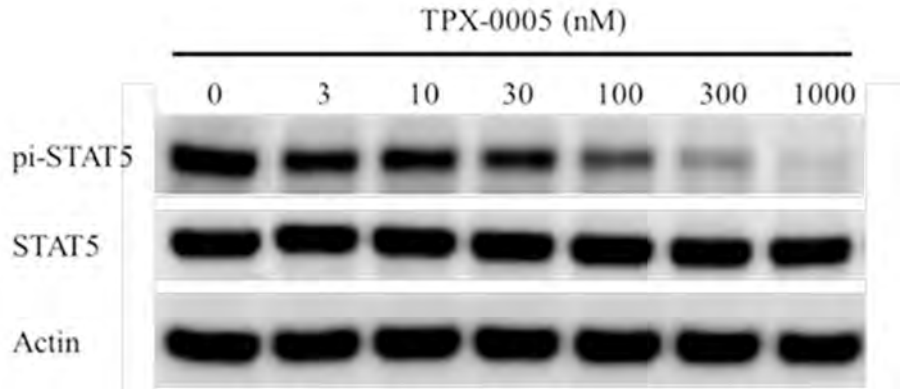
Repotrectinib は SET2 細胞の増殖を濃度依存的に阻害し、IC_{50} は 169 nM であった（Figure 2.4.4-1）。また、Repotrectinib は JAK2 の基質である STAT5 のリン酸化を濃度依存的に阻害した（Figure 2.4.4-2）。

Figure 2.4.4-1: SET2 細胞における Repotrectinib の細胞増殖抑制活性



Source: Study 00236

Figure 2.4.4-2:　　SET2 細胞の STAT5 リン酸化に対する Repotrectinib の作用



Source: Study 00236

3　副次的薬理試験

3.1　安全性スクリーニングパネルを用いた評価

過去に副作用の可能性と関連付けられている重要な生理活性に関与する 44 種類のタンパク質[13]のパネルを用いて、Repotrectinib の標的外作用を評価した（試験番号 00206）。さらに、Repotrectinib が 50%を超える阻害（又は刺激）を示した場合には、IC_{50} を算出した。

Repotrectinib は 10 μM の濃度で 3 種類の標的［ヒトアデノシン A_{2A} 受容体（50.3%）、ラット Ca^{2+} チャネル（L 型、ジヒドロピリジン結合部位）（69.8%）及びヒト LCK（81.9%）］に対するリガンド結合又は酵素活性を 50%超阻害した。これら 3 つの分子に対する Repotrectinib の阻害作用について、IC_{50} 及びその他のキネティックパラメータを算出した（Table 3.1-1）。Repotrectinib はアデノシン A_{2A} 受容体及び Ca^{2+} チャネルのリガンド結合をそれぞれ 6.3 及び 3.5 μM の IC_{50} で阻害した。これらの値は、ヒトに Repotrectinib 160 mg を BID 投与した際の非結合型 Repotrectinib の平均 C_{max}［0.066 μM：血漿中総薬物濃度の平均 C_{max} 514 ng/mL（【M2.7.2、Table 2.1.1-2】参照）及びヒト血漿中 fu 4.59%（M2.6.5、6 項）より算出］の 95 及び 53 倍に相当する。また、Repotrectinib は LCK キナーゼ活性を阻害し、その IC_{50} は 0.11 μM であった。これは非結合型のヒト平均 C_{max}（0.066 μM）の 1.7 倍に相当する。LCK はチロシンキナーゼの SRC ファミリーに属し、LCK 阻害は SRC 阻害剤でも認められている。LCK は T 細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞に発現し、T 細胞受容体を介した T 細胞の活性化及びシグナル伝達に関与する。LCK の阻害により T 細胞が抑制される可能性があるが、臨床試験で Repotrectinib を投与した患者におけるリンパ球数減少の発現率は低く（5%未満）（【M5.3.5.2-4 TRIDENT-1 P2 CSR Addendum 01、Table 14.3.1.2.1】参照）、このクラスの薬剤及び患者集団において免疫抑制及び感染症の増加は認められていない。

Table 3.1-1: **アデノシン A_{2A}受容体、Ca^{2+}チャネルのリガンド結合並びに LCK のキナーゼ活性に対する Repotrectinib の阻害活性**

Assays	IC_{50}	K_i	nH
A_{2A} (h) (agonist radioligand)	6.3 µM	5.1 µM	0.6
Ca^{2+} channel (L, dihydropyridine site) (antagonist radioligand)	3.5 µM	2.2 µM	0.9
LCK (h)	0.11 µM	-	0.5

Source: Study 00206
Abbreviations: h = human; IC_{50} = half maximal inhibitory concentration; K_i = inhibition constant; LCK = lymphocyte kinase; nH = Hill coefficient, determined by non-linear regression analysis of the competition curves (binding assays) or inhibition/concentration-response curves (enzyme and uptake assays) generated with mean replicate values using Hill equation curve fitting.

4 安全性薬理試験

ICH S9 ガイドラインに基づき、Repotrectinib の独立した in vivo 安全性薬理試験は実施しなかったが、心血管系、中枢神経系及び呼吸系に及ぼす影響を評価するため、GLP 適合の 28 日間及び 91 日間反復投与毒性試験において、心電図評価（サル）並びに呼吸系又は中枢神経系（ラット及びサル）への影響を示唆する症状の有無についての詳細な症状観察を実施した。Repotrectinib に関連した心血管系及び呼吸系への影響は認められなかった。成熟ラットを用いた反復投与毒性試験及び幼若ラットを用いた用量設定毒性試験（GLP 非適合）で、中枢神経系症状として振戦及び運動失調が認められた（【M2.6.6、9 項】参照）。

4.1 hERG、hNav1.5 及び hCav1.2 チャネル阻害

パッチクランプ法による電気生理学的試験において、ヒトイオンチャネル（hERG、hNav1.5 及び hCav1.2）に対する Repotrectinib の影響を評価した（試験番号 00204、GLP 非適合）。

Repotrectinib（1、3、10 及び 30 µM）の hERG カリウムチャネルに対する阻害作用を、遺伝子導入により hERG を安定的に発現する CHO 細胞株を用いて評価した。陽性対照はシサプリド（1 µM）を用いた。また、hNav1.5（α サブユニット）を遺伝子導入した HEK293 細胞を用いて、Repotrectinib（10 及び 30 µM）の hNav1.5 に対する阻害作用を評価した。陽性対照にはテトラカイン（30 µM）を用いた。さらに、hCav1.2（α1 及び β サブユニット）を遺伝子導入した HEK293 細胞を用いて、L 型 hCav1.2 に対する Repotrectinib（10 及び 30 µM）の阻害作用を評価した。陽性対照はニフェジピン（30 µM）を用いた。

Repotrectinib は hERG カリウム電流を 1、3、10 及び 30 µM の濃度でそれぞれ 3%、13%、27%及び 70%阻害した（Table 4.1-1）。Repotrectinib の hERG カリウム電流阻害作用の IC_{50} は 18 µM であり、これはヒトにおける非結合型 Repotrectinib の平均 C_{max}（0.066 µM）の 271 倍に相当する。

Table 4.1-1: hERG カリウムチャネルに対する Repotrectinib の阻害作用

TPX-0005 Concentration (μM)	% Inhibition Trial 1	% Inhibition Trial 2	% Inhibition Trial 3	% Inhibition Mean ± SD
1	6	0	3	3 ± 2.4
3	15	13	12	13 ± 1.2
10	25	26	29	27 ± 1.7
30	70	69	70	70 ± 0.5

Source: Study 00204
Abbreviations: SD = standard deviation.

Repotrectinib は 10 μM の濃度では hNav1.5 ナトリウムチャネルを阻害しなかったが、30 μM の濃度では阻害率は 15%以下であった。また、Repotrectinib は 10 μM の濃度では hCav1.2 カルシウムチャネルを阻害しなかったが、30 μM の濃度では約 35%阻害した。

以上より、Repotrectinib の hERG チャネル、hNav1.5 チャネル及び hCav1.2 チャネルに対する阻害活性は弱く、Repotrectinib のこれらのヒトイオンチャネルに対する影響は軽微であると考えられた。

5 薬力学的薬物相互作用試験

Repotrectinib について、薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6 考察及び結論

Repotrectinib の薬理学的プロファイルを明らかにし、ROS1 遺伝子、NTRK1、NTRK2 及び NTRK3 遺伝子又は ALK 遺伝子の再構成を有する進行固形癌患者を対象とした Repotrectinib の臨床開発の妥当性を裏付けるための非臨床薬理試験を実施し、以下のことが示された。

Repotrectinib は強力な ROS1 阻害剤であり、臨床でクリゾチニブに耐性を示す ROS1 変異型を顕著に阻害する。ROS1 融合タンパク質は、NSCLC 及び他の悪性腫瘍の発がんドライバーであることが知られている [3,4]。ALK/ROS1/MET 阻害剤であるクリゾチニブに抵抗性の ROS1 陽性 NSCLC 患者において solvent front 変異型である ROS1 G2032R 及び D2033N が報告されている [6,7]。Repotrectinib は、in vitro でキナーゼドメインが WT 及びこれらの solvent front 変異型の ROS1 融合タンパク質を発現する遺伝子導入 NIH3T3 細胞において、ROS1 融合タンパク質の自己リン酸化を阻害した。また、Repotrectinib は WT 及び solvent front 変異型の ROS1 融合タンパク質を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞の増殖を高い活性で抑制したが、ロルラチニブ、カボザンチニブ及びエヌトレクチニブは、ROS1 WT の融合タンパク質を発現する細胞の増殖に対しては高い活性を示したものの、G2032R のような ROS1 solvent front 変異型を発現する細胞の増殖に対しては活性が低かった。Repotrectinib は in vivo で、CD74-ROS1 WT 又は G2032R 変異型を発現する Ba/F3 腫瘍担がんモデルの腫瘍増殖を強力に抑

制した。以上より、Repotrectinib は ROS1 融合タンパク質及びそれらの臨床でみられる耐性変異、特に solvent front 変異型に対する強力な阻害剤であることが示された。

Repotrectinib は強力な pan-TRK 阻害剤であり、臨床でエヌトレクチニブに耐性を示す TRK 変異型を顕著に阻害する。多くの種類の固形癌で NTRK ファミリー遺伝子の再構成が確認されている [8]。ROS1 及び ALK を標的とした治療薬と同様に、大腸癌における solvent front 変異型 TRKA G595R 及び乳腺相似分泌癌における TRKC G623R などにより、エヌトレクチニブ及びラロトレクチニブなどの既存の TRK 阻害剤に対する獲得耐性が生じている [9,10]。Repotrectinib は TPM3-NTRK1 融合遺伝子を内因性に発現する KM12 細胞及び遺伝子導入 NIH3T3 細胞において、TRK 融合タンパク質及びそれらの solvent front 変異型の自己リン酸化を阻害した。また、Repotrectinib は KM12 細胞並びに WT 又は solvent front 変異型 TRK 融合タンパク質を発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞の細胞増殖を強力に抑制した。さらに、Repotrectinib は KM12 腫瘍担がんモデル並びに LMNA-TRKA WT 又は LMNA-TRKA G595R 変異型を発現する NIH3T3 腫瘍担がんモデルにおいて強力かつ用量依存性の腫瘍増殖抑制を示した。以上より、Repotrectinib は強力な pan-TRK 阻害剤であり、in vitro 及び in vivo で solvent front 変異型を顕著に阻害することが示された。

Repotrectinib は、クリゾチニブ及び第二世代の ALK 阻害剤に臨床で耐性を示す ALK 変異型を顕著に阻害する。ALK 遺伝子再構成を有する NSCLC 患者は、クリゾチニブ治療後進行時に第二世代の ALK 阻害剤による治療を受けることで大きなベネフィットを得られる。クリゾチニブで進行した ALK 陽性肺癌患者の約 20%に獲得耐性変異が認められ、第二世代 ALK 阻害剤で進行した場合にはその割合は著しく増加する（セリチニブ 54%、アレクチニブ 53%、ブリグチニブ 71%）[12]。ALK solvent front 変異型 G1202R は第二世代の ALK 阻害剤治療後に耐性変異として増加することが報告されている（クリゾチニブ 2%、セリチニブ 21%、アレクチニブ 29%及びブリグチニブ 43%）[12]。Repotrectinib は、遺伝子組換え ALK WT 並びに solvent front 変異型 G1202R、gatekeeper 変異型 L1196M、セリチニブ耐性変異型 F1174L 及びアレクチニブ耐性変異型 1151T Ins などの ALK タンパク質のキナーゼ活性を強力に阻害した。また、Repotrectinib は、EML4-ALK v1 又はその変異型である EML4-ALK v1 G1202R、L1196M、F1174C 及び C1156Y などを発現する遺伝子導入 Ba/F3 細胞の増殖を強力に抑制した。さらに、Repotrectinib は、NPM-ALK を内因性に発現する Karpas299 細胞及び EML4-ALK v1 WT 又はその変異型を発現する遺伝子導入細胞を皮下移植した担がんモデルにおいて、顕著な腫瘍増殖抑制を示した。以上より、Repotrectinib は WT 及び変異型 ALK のいずれに対しても高い活性を有することが示された。

Repotrectinib の in vitro 標的外結合及び心血管系に関する安全性プロファイルは良好である。副次的薬理試験では、Repotrectinib の標的外結合に関するプロファイルを、過去に副作用の可能性と関連付けられている重要な生理活性に関与する 44 種類のタンパク質のプロファイリングパネルを用いて in vitro で評価した。その結果、3 種類の分子［アデノシン A_{2A} 受容体（IC_{50}：6.3 μM）、L 型 Ca^{2+}チャネル（IC_{50}：3.5 μM）及び SRC ファミリーキナーゼ LCK（IC_{50}：0.11 μM）］にのみ弱い標的外の

阻害作用が認められた。また、in vitro 心血管系安全性薬理試験において、hERG チャネル（IC_{50}：18 μM、CHO 細胞）、hNav1.5 チャネル（IC_{50}：＞30 μM、HEK293 細胞）及び hCav1.2 チャネル（IC_{50}：＞30 μM、HEK293 細胞）に対する阻害活性は弱く、Repotrectinib のこれらのヒトイオンチャネルに対する影響は軽微であると考えられた。また、心血管系の評価としてカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で実施した心電図測定においても、Repotrectinib に関連した心血管系への影響は認められていない。

以上を総合すると、Repotrectinib は in vitro 及び in vivo 試験において WT 及び solvent front 変異を含む変異型 ROS1、TRK 及び ALK に対して強力な活性を示した。Repotrectinib は分子量が小さく強固な三次元大環状構造を有することにより、活性化キナーゼの立体構造を標的とし、現在臨床で使用されている ROS1、TRK 及び ALK 阻害剤の結合を立体的に障害する様々な変異型による耐性を克服することが可能と考えられる。したがって、Repotrectinib は、ROS1、TRKA、TRKB 及び TRKC 並びに ALK の solvent front 変異型に対する強力な阻害剤であり、現在臨床で使用されている ROS1、TRK 及び ALK 阻害剤に耐性を示すがん患者に新たな選択肢を提供するものと期待される。

7 参考文献

[1] Drilon A, Ou SH, Cho BC, et al. Repotrectinib (TPX-0005) is a next-generation ROS1/TRK/ALK inhibitor that potently inhibits ROS1/TRK/ALK solvent- front mutations. Cancer Discov. 2018;8:1227-36.

[2] Yun MR, Kim DH, Kim SY, et al. Repotrectinib exhibits potent antitumor activity in treatment-naïve and solvent-front-mutant ROS1-rearranged non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2020;26:3287-95.

[3] Planchard D, Popat S, Kerr K, et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [updated version published 15 September 2020 by ESMO Guidelines Committee]. Ann Oncol. 2018;29(Suppl 4):iv192-iv237

[4] Uguen A, De Braekeleer M. ROS1 fusions in cancer: a review. Future Oncol. 2016;12:1911-28.

[5] Shaw AT, Ou SH, Bang Y-J, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. N Engl J Med. 2014;371:1963-71.

[6] Awad MM, Katayama R, McTigue M, et al. Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. N Engl J Med. 2013;368:2395-401.

[7] Drilon A, Somwar R, Wagner JP, et al. A novel crizotinib-resistant solvent-front mutation responsive to cabozantinib therapy in a patient with ROS1-rearranged lung cancer. Clin Cancer Res. 2016;22:2351-8.

[8] Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. Cancer Discov. 2015;5:25-34.

[9] Russo M, Misale S, Wei G, et al. Acquired resistance to the TRK inhibitor entrectinib in colorectal cancer. Cancer Discov. 2016;6:36-44.

[10] Drilon A, Li G, Dogan S, et al. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after ETV6-NTRK3 identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). Ann Oncol. 2016;27:920-6.

[11] Hallberg B, Palmer RH. Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. Nat Rev Cancer. 2013;13:685-700.

[12] Gainor JF, Dardaei L, Yoda S, et al. Molecular mechanisms of resistance to first- and second-generation ALK inhibitors in ALK-rearranged lung cancer. Cancer Discov. 2016;6:1118-33

[13] Bowes J, Brown AJ, Hamon J, et al. Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. Nat Rev Drug Discov. 2012;11:909-22

[14] Sehgal K, Patell R, Rangachari D, et al. Targeting ROS1 rearrangements in non-small cell lung cancer with crizotinib and other kinase inhibitors. Transl Cancer Res. 2018;7(Suppl 7):S779-86.

[15] Shaw AT, Solomon BJ, Chiari R, et al. Lorlatinib in advanced ROS1-positive non-small-cell lung cancer: a multicentre, open-label, single-arm, phase 1-2 trial. Lancet Oncol. 2019;20:1691-701.

[16] Sen B, Johnson FM. Regulation of SRC family kinases in human cancers. J Signal Transduct. 2011;2011:865819.

[17] Cavalloni G, Peraldo-Neia C, Sarotto I, et al. Antitumor activity of Src inhibitor saracatinib (AZD-0530) in preclinical models of biliary tract carcinomas. Mol Cancer Ther. 2012;11:1528-38.

Table of Contents

1 薬理試験：一覧表 2
2 効力を裏付ける試験 6
3 副次的薬理試験 6
4 安全性薬理試験 7
5 薬力学的薬物相互作用試験 7

1 薬理試験：一覧表

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Article: Repotrectinib (TPX-0005)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Primary Pharmacodynamics					
Enzymatic kinase activity	Radiolabeled kinase catalytic activity assays	In vitro	[redacted], USA	00111	4.2.1.1-1
In vitro cellular activity in transduced Ba/F3 cells	Cell proliferation assays (SDC4-ROS1 & CD74-ROS1, WT & mutants)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00114	4.2.1.1-2
In vitro cellular activity in transduced NIH3T3 cells	Cellular kinase phosphorylation assays (CD74-ROS1 WT and mutants)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00115	4.2.1.1-3
In vitro cellular activity in KM12 cells	Cell proliferation assays; cellular kinase phosphorylation assays (TPM3-TRKA)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00116	4.2.1.1-4
In vitro cellular activity in transduced Ba/F3 or NIH3T3 cells	Cell proliferation assays; cellular kinase phosphorylation assays (LMNA-TRKA, TEL-TRKB & TEL-TRKC, WT & solvent front mutants)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00218	4.2.1.1-5
In vitro cellular activity in Karpas299 cells	Cell proliferation assays; cellular kinase phosphorylation assays (NPM-ALK)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00112	4.2.1.1-6
In vitro cellular activity in transduced Ba/F3 cells	Cell proliferation assays; cellular kinase phosphorylation assays (EML4-ALK v1 WT & mutants)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00113	4.2.1.1-7
In vitro cellular activity in transduced NIH3T3 cells	Cellular kinase phosphorylation assays (EML4-ALK v1 WT & G1202R)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00117	4.2.1.1-8

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Article: Repotrectinib (TPX-0005)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
In vivo TGI	NIH3T3 SDC4-ROS1 WT tumor in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA	00153	4.2.1.1-9
In vivo TGI	NIH3T3 CD74-ROS1 G2032R tumor in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA	00183	4.2.1.1-10
In vivo TGI	Ba/F3 CD74-ROS1 WT & G2032R tumors in mouse, SCID/Beige female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA	00182	4.2.1.1-11
In vivo plasma concentration and PD effect	Ba/F3 CD74-ROS1 G2032R tumor in mouse, SCID/Beige female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA	00235	4.2.1.1-12
In vivo TGI	KM12 tumor (TPM3-TRKA) in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA	00154	4.2.1.1-13

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Article: Repotrectinib (TPX-0005)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
In vivo PK and TGI	KM12 tumor (TPM3-TRKA) in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA [redacted], USA	00210	4.2.1.1-14
In vivo PK and TGI	NIH3T3 LMNA-TRKA WT & G595R tumors in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA	00225	4.2.1.1-15
In vivo plasma exposure and PD effect	NIH3T3 LMNA-TRKA G595R tumor in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA	00231	4.2.1.1-16
In vivo TGI and PK/PD	Karpas299 tumor (NPM-ALK) in mouse, SCID/Beige female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA	00151	4.2.1.1-17

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Article: Repotrectinib (TPX-0005)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
In vivo TGI	NIH3T3 EML4-ALK v1 WT tumor in mouse, athymic nude female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA	00152	4.2.1.1-18
In vivo TGI and PK	Ba/F3 EML4-ALK v1 WT & G1202R tumors (TGI), Ba/F3 EML4-ALK v1 WT & G1202R or CD74-ROS1 WT & G2032R tumors (PK) in mouse, SCID/Beige female	Oral gavage	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA [redacted] USA [redacted] USA	00181	4.2.1.1-19
Kinase selectivity over 456 kinases	KINOME*scan*® profiling assay	In vitro	[redacted] USA	00098	4.2.1.1-20
Kinase inhibitory activity against the kinase selectivity hits	Enzymatic kinase catalytic activity assay	In vitro	[redacted], USA	00110	4.2.1.1-21
In vitro cellular activity in H2228 cells and HT1080 cells	Cell proliferation assays; cellular kinase phosphorylation and modulation of downstream targets; cell migration assay (SRC/FAK)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00108	4.2.1.1-22
In vitro cellular activity in SET2 cells	Cell proliferation assays; cellular kinase phosphorylation assays (JAK2 V617F)	In vitro	TP Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA	00236	4.2.1.1-23
Secondary Pharmacodynamics					
In vitro off-target safety screen assay	Cerep SafetyScreen44 assays	In vitro	[redacted], France	00206	4.2.1.2-1

Table 2.6.3.1: Pharmacology Overview

Test Article: Repotrectinib (TPX-0005)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location in Dossier
Safety Pharmacology					
Ion channel inhibition	Cultured cells with the expression of human ion channels	In vitro	[redacted], USA	00204	4.2.1.3-1
Pharmacodynamic Drug Interactions					
No PDI studies were conducted with TPX-0005.					

Abbreviations: PD = pharmacodynamics; PDI = pharmacodynamic drug interaction; PK = pharmacokinetics; SCID = severe combined immunodeficiency; TGI = tumor growth inhibition; v1 = variant 1; WT = wild type.

2 効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験の概要は、M2.6.2、2 項に示す。

3 副次的薬理試験

副次的薬理試験の概要は、M2.6.2、3 項に示す。

4 安全性薬理試験

Table 2.6.3.4: In Vitro Ion Channel Inhibition Assays

Test Article: Repotrectinib (TPX-0005)

Location in Dossier: 4.2.1.3-1

Ion Channels	Host Cells	Concentrations (μM)	IC50 (μM)	Max. Inhibition (%)	GLP Compliance	Study Number
hERG	CHO	1, 3, 10, 30	18	70	No	00204
hNav1.5	HEK293	10, 30	> 30	≤ 15	No	00204
hCav1.2	HEK293	10, 30	> 30	35	No	00204

Abbreviations: CHO = Chinese hamster ovary; hCav1.2 = human voltage-gated calcium channel 1.2; HEK = human embryonic kidney; hERG = human ether-a-go-go related gene; hNav1.5 = human voltage-gated sodium channel 1.5; IC50 = half maximal inhibitory concentration.

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当試験なし