

Non-Clinical Trial Reports

1. Name of the medicinal product (number of registration certificate, if available):	ROZLYTREK®		
1) type of the medicinal product, by which registration was conducted or planned	Medicinal product with complete dossier (stand-alone dossier), other medicinal product, new active substance according to item 1 (sub-item 1.1) of section III of the Procedure of Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 23.07. 2015 № 460.		
2) Trials conducted	<input checked="" type="checkbox"/> yes	<input type="checkbox"/> no	If not, substantiate
<p>Note: the following code designations, which appear in the reports, have been used to identify entrectinib: RO7102122 , RXDX-101, G03344900 or NMS-1191372</p>			
2. Pharmacology:			
1) primary pharmacodynamics	<p>The kinase inhibitory activity of entrectinib (RXDX-101) was determined using radiometric kinase assays. Entrectinib (code named RXDX-01-0177) potently inhibited the tropomyosin receptor kinase (TRK) A, TRKB, TRKC, ROS proto-oncogene 1 (ROS1), and anaplastic lymphoma kinase (ALK) with IC₅₀ values of 1.7, 0.1, 0.1, 0.2, and 1.6 nM, respectively [Reports No. 1087232, 1087233]. The Kinase Selectivity Screening demonstrated that the selectivity of entrectinib was limited to TRKA, TRKB, TRKC, ROS1, and ALK [Report No. 1087233]. In addition, a major metabolite of entrectinib, M5 (code named RXDX-01-0158), inhibited TRKA, TRKB, TRKC, ROS1, and ALK with IC₅₀ values of 2.5, 0.1, 0.2, 0.2, and 1.9 nM, respectively.</p> <p>The anti-proliferative activity of entrectinib was tested in two large cell-based screens and dedicated cell viability studies in individual lines harboring NTRK or ROS1 gene fusions. Entrectinib (NMS-1191372) was initially tested for anti-proliferative activity against a panel of 160 cell lines [Report No. 1087234]. The tested lines were mainly human tumor-derived and were of diverse histological origins, including: 35 leukemias/lymphomas, 27 lung carcinomas, 24 colorectal carcinomas, 14 breast carcinomas, 8 kidney adenocarcinomas, 8 melanomas, 8 multiple myelomas, 7 ovarian carcinomas, 5 glioblastomas, 4 pancreatic adenocarcinomas, 3 prostatic carcinomas, 3 cervical adenocarcinomas, 2 astrocytomas, 2 osteosarcomas, 2 neuroblastomas, 1 bladder carcinoma and 1 gliosarcoma. Also 6 non tumoral cell lines were tested. Exponentially growing cells were treated with NMS-1191372 for 72 h. At the end of this incubation period, antiproliferative activity was assessed on the basis of ATP content in test sample relative to mock-treated control samples. NMS-1191372 was found to inhibit</p>		

proliferation with an average IC_{50} across the panel of 2.76 μM , ranging from 0.02 to 6.05 μM , with potent activity (<100 nM) against a limited subset of cell lines, which included lines known to harbor constitutively active forms of ALK.

In a second large cell-based screen [Report No. 1090429], entrectinib and the metabolite M5 were tested for anti-proliferative activity in a panel of 308 cell lines, consisting of 269 adult human cancer cell lines and 39 pediatric cancer cell lines. Anti-proliferative activity ($IC_{50s} < 1 \mu M$) for entrectinib and M5 was observed in 16 unique cancer cell lines as well as 5 cell lines identified as being duplicates or lines derived from one of the 16 sensitive lines.

Amongst the identified sensitive cell lines there were 5 unique NTRK fusion cell lines, 4 ROS1 fusion cell lines, and 5 ALK dysregulated cell lines, as well as the MV-4-11 FLT3-ITD cell line previously identified as an entrectinib-responsive cell line. These data are consistent with the kinase activity of entrectinib and with potency against the TRKs, ROS1 and ALK kinases, and weaker activity against FL T3. There was a high degree of correlation between the entrectinib and M5 IC_{50} values across all cell lines tested ($n=223$ cell lines, Pearson $r=0.7762$, $p<0.0001$) as well as within lines with $qIC_{50s} < 1 \mu M$ ($n=20$ cell lines, Pearson $r=0.8946$, $p<0.0001$). These data demonstrate that the M5 metabolite is equipotent to entrectinib in suppression of cellular proliferation. Further, these data demonstrate that neither entrectinib nor the M5 metabolite show promiscuously in inhibiting cell growth in cell lines not harboring gene fusion events for NTRKs, ROS1 or ALK.

To determine and compare the *in vitro* anti-proliferative activity of entrectinib against NTRK fusion genes, NTRK fusion cDNAs were delivered into mouse Pro-B cells Ba/F3 using the lentiviral expression system [Report No. 1087236]. Ba/F3 cells expressing NTRK fusion genes and growing independently of mouse interleukin 3 (IL3) were treated with serial diluted entrectinib and IC_{50} values were determined. Entrectinib exhibited similar, sub-single digit- nanomolar anti-proliferative potency, regardless of the identity of the fusion partners.

Studies were conducted to evaluate the *in vitro* anti-proliferation activity and *in vivo* antitumor activity of entrectinib in a human non-small lung carcinoma (NSCLC) cell line, CUTO-3 which contains the MPRIP NTRK1 fusion gene [Report No. 1087237]. Compared to crizotinib, entrectinib demonstrated higher potency in the cell based assay, with a cellular IC_{50} of 1.6 nM for entrectinib vs 153.5 nM for crizotinib. In the *in vivo*

$_{50}$ and IC_{90} values were calculated using the tumor volume data collected. It was found that the IC_{50} and IC_{90}

In study PC 17-007 [Report No.1087247] was demonstrated that TRK kinase inhibition by entrectinib selectively targets preclinical models of NTRK fusion-driven hematologic malignancies. Two human acute myeloid leukemia (AML) cell lines driven by the ETV6 NTRK3 fusion gene were identified and characterized (IMS-M2 and M0-91). Entrectinib demonstrated high potency in a cell based proliferation assay, with a cellular IC_{50} values of 0.47 nM for IMS-M2 and 0.65 nM for M0-91. Phosphorylation of the ETV6-TRKC fusion protein, as well as phosphorylation of known TRKC downstream signaling effectors, was inhibited by entrectinib treatment in a dose-dependent manner. Sensitivity to entrectinib was dependent on expression of the ETV6-TRKC fusion protein. In xenograft models, entrectinib treatment at clinically relevant doses resulted in tumor regression, which was accompanied by inhibition of TRK signaling pathways and elimination of residual cancer cells from the bone marrow.

Studies were conducted to evaluate the *in vitro* anti-proliferation activity of entrectinib and other available ROS1 inhibitors in a human NSCLC cell line, CUTO-28 which contains the TPM3-ROS1 fusion gene [Report No. 1087687]. Compared to ceritinib and crizotinib, entrectinib demonstrated higher potency in the cell based assay, with a cellular IC_{50} of 20.1 nM for entrectinib vs 36.6 nM for crizotinib, and 179.6 nM for ceritinib.

To assess the cell activity of entrectinib and its major active metabolite, M5, against the KM12 colorectal cancer (CRC) cell line harboring a TMP3-NTRK1 gene fusion comparative cell viability studies were performed [Report No. 1089907]. Cell activities assessed included activity in a 3-day cell viability assay, cell cycle analysis and induction of apoptosis following treatment with entrectinib or M5. Consistent with cell screening data, both entrectinib and the metabolite M5 showed equivalent potency in cell viability with IC_{50} s of 2.8 and 2.6 nM, respectively. These data demonstrate that the metabolite M5 of entrectinib is a cell active metabolite whose exposure may be relevant to the overall anti-tumor activity of entrectinib.

To evaluate the activity of entrectinib *in vitro* and *in vivo* on a

ROS1-dependent cellular model, the BaF3 murine, IL-3 dependent, pro-B cell line was transformed with TEL-ROS1 fusion protein [Report No. 1087258]. Entrectinib potently inhibited cell proliferation with an IC_{50} of 5 nM, while crizotinib, tested in the same conditions, had an IC_{50} of 180 nM. The growth arrest induced by entrectinib was rescued by the addition of IL-3, thus confirming that inhibition of cell proliferation by entrectinib was specifically due to ROS1 oncogene inhibition.

Entrectinib has been assessed in a panel of solid and hematologic xenograft tumor models representing various histologies harboring TRK or ROS1 fusions with various fusion partners.

IC_{50} and IC_{90} values, calculated based on tumor volume data, were 1.64 mg/kg and 11.64 mg/kg, respectively on day 17, and 2.35 mg/kg and 6.23 mg/kg, respectively on day 20.

Further studies assessed the anti-tumor activity of entrectinib in the KM12-Luciferase (TPM3-NTRK1) colorectal subcutaneous tumor model [Report No. 1090136]. The purpose of the studies was to assess the dose-dependency of orally administered entrectinib on actively growing NTRK gene fusion tumors growing subcutaneously. Collectively data help demonstrate that entrectinib treatment resulted in dose-dependent anti-tumor efficacy, inhibition of TRK pathway activity, and dose-proportional pharmacokinetics. In the efficacy portion of this study (GNT20180522C), entrectinib demonstrated dose-dependent efficacy with doses less than 5 mg/kg resulting in weaker anti-tumor activity (< 45% TGI), whereas doses of 5 mg/kg and greater resulted in tumor regressions (> 100% TGI). TRK pathway PD analysis demonstrated that entrectinib treatment resulted in pathway modulation at doses of 5 mg/kg and higher, reaching maximal inhibition of phospholipase C gamma 1 (pPLC γ 1), pAKT and ribosomal protein S6 (pS6) at doses greater than 30 mg/kg. Lastly, drug PK was assessed from plasma samples collected during the in-life efficacy and PD components of these studies. These analyses demonstrated plasma drug levels of entrectinib showed good dose proportionality that correlated well

with pathway inhibition where exposures of AUC₂₄

The Study No. PC 17-001 [Report No. 1087243] was conducted to evaluate the antitumor activity of entrectinib in a human AML model that has the ETV6-NTRK3 fusion. Four groups of immunodeficient animals (10 per group) were implanted with IMS-M2 cells and treated with vehicle (0.5% methyl cellulose, 1% v/v Tween 80), 3, 10, and 30 mg/kg entrectinib PO q.d. for a total of 21 treatments. Comparison of the tumor volumes showed that all entrectinib groups had reduced tumor growth. Overall, entrectinib was well tolerated.

Entrectinib was also evaluated in the M0-91 AML model, harboring an ETV6-NTRK3 fusion gene [Report No. 1087244]. This study was conducted to evaluate the antitumor activity of entrectinib in a human AML model that has the ETV6-NTRK3 fusion. Four groups of immunodeficient animals (10 per group) were implanted with M0-91 cells and treated with vehicle, 3, 10, and 30 mg/kg entrectinib PO q.d. for a total of 18 treatments. Comparison of the tumor volumes showed that all entrectinib groups had reduced tumor growth. Overall, entrectinib was well tolerated. These data show that all doses of entrectinib had a strong effect on tumor growth, resulting TGI of > 100% for all days measured. Entrectinib treatment significantly reduced tumor volume as compared to vehicle by day 18.

Entrectinib was assessed in a patient-derived xenograft (PDX) model of human head and neck cancer, CTG-0798, harboring an ETV6-NTRK3 fusion gene [Report No. 1087238]. CTG-0798 tumor-bearing mice were treated with entrectinib at doses of 15 and 60 mg/kg PO, twice a day (BID) for 21 days. Entrectinib demonstrated significant anti-tumor efficacy at both 15 and 60 mg/kg in the CTG-0798 model, resulting in tumor regressions (146% and 149% TGI, respectively). It was concluded that entrectinib at 15 mg/kg and 60 mg/kg had significant antitumor activity against human head and neck tumors in model CTG-0798 when treatment was initiated when tumors were between 100–300 mm³.

The subsequent study was conducted to evaluate the preclinical anti-tumor activity of entrectinib and its combination with trametinib in low passage Champions TumorGraft™ model CTG-0798 of human squamous head and neck cancer in immunocompromised mice. Mice were implanted subcutaneously into the left flank tumor fragments from model CTG-0798 and were treated daily (q.d.) for

57 days (n = 8) via oral gavage (PO) with vehicle, entrectinib at 15 mg/kg, trametinib at 1 mg/kg, or the combination of entrectinib (15 mg/kg) and trametinib (1 mg/kg). Effects on tumor growth were evaluated by measuring percent TGI, and the number of complete regression (CR), partial regression (PR), and tumor-free survivors (TFS). Tolerability was assessed by body weight loss, lethality, and clinical signs of adverse treatment-related side effects. Treatment with entrectinib (TGI = 116%, p < 0.001), trametinib (TGI = 63%, p < 0.01) and the combination of entrectinib and trametinib (TGI = 116%, p < 0.001) had significant antitumor activity compared to the vehicle control in model CTG-0798. The vehicle control group and the trametinib group had no PR, CR or TFS. By Day 119, the end of the following-up period, entrectinib group had 1 PR and 7 TFSs and the entrectinib/trametinib combination group had 8 TFSs. There was no significant difference in tumor volume between the 3 treatment groups. Entrectinib, trametinib and their combination were well tolerated in this study.

The study was conducted to evaluate the antitumor activity of entrectinib in a sarcoma PDX found to have the TPM3-NTRK1 fusion [Report No. 1087257]. Overall, the agent was well tolerated and the tumor inhibition was robust. Two groups of immunodeficient animals (10 per group) were implanted with the PDX and treated with vehicle or 30 mg/kg entrectinib PO q.d. for a total of 28 treatments. Treatment with 30 mg/kg entrectinib caused significant and durable tumor regressions, with > 100% TGI for all days measured.

IC_{50} and IC_{90} values were calculated using the tumor volume data collected. It was found that the IC_{50} and IC_{90}

in vivo antitumor activity against the PDX G002, a model known to have a TPM3-NTRK1 fusion gene.

Entrectinib was further studied in the CTG-0848 NSCLC PDX model, which contains a CD74-ROS1 fusion [Report No. 1087260]. CTG-0848 tumor-bearing mice were treated with entrectinib at 30 and 60 mg/kg, PO, BID for 29 days. Entrectinib treatment was

well-tolerated and resulted in significant tumor regressions at both 30 mg/kg (TGI=134%, $p < 0.001$) and 60 mg/kg entrectinib (TGI=131%, $p < 0.001$).

Entrectinib was evaluated in an additional ROS1 fusion positive PDX model, LU-01-0414, originally established from a surgically resected biopsy from a NSCLC patient, and confirmed to contain a SCD4-ROS1 fusion [Report No. 1087259]. A dose-ranging efficacy study was performed in this model testing entrectinib at doses between 1.5 and 45 mg/kg, PO, BID for 21 or 49 days. Entrectinib treatment was well-tolerated and resulted in dose-dependent inhibition of tumor growth. Entrectinib treatment resulted in tumor growth delay at doses of 1.5 and 5 mg/kg (44% and 70% TGI, respectively), whereas doses of 15 and 45 mg/kg resulted in sustained tumor regressions (111% and 113% TGI, respectively).

To better understand the dose-dependency of efficacy of entrectinib in intracranial tumors, the KM12-Luciferase (TPM3-NTRK1) CRC model was inoculated intracranially, and dose-ranging efficacy studies were performed testing doses ranging from 1, 5, 15, and 60 mg/kg dosed BID and 10 and 30 mg/kg dosed q.d. [Report No. 1090134]. Without treatment, mice inoculated with KM12-Luciferase cells succumb to tumor growth and moribundity in 15–20 days. Therefore, tumor growth was monitored via bioluminescence, and survival through 28 days was assessed. Entrectinib treatment was well tolerated and resulted in dose-dependent inhibition of intracranial tumor growth and improvement in animal survival. Doses greater than 5 mg/kg BID or 10 mg/kg q.d. resulted in inhibition of tumor growth and progression, however full tumor growth suppression was only achieved at 60 mg/kg BID. Further, all animals treated with entrectinib at doses above 15 mg/kg BID or 30 mg/kg q.d. survived through the 28-day dosing window relative to all animals in the vehicle group, which succumbed to their tumors by Day 16. Drug PK was assessed from plasma samples collected during the in-life efficacy and PD components of these studies. These analyses demonstrated plasma drug levels of entrectinib showed good dose proportionality that correlated well with pathway inhibition where exposures of AUC_{24} .

These data are consistent with a repeat study assessing entrectinib at 60 mg/kg BID, which demonstrated full tumor growth suppression through the dosing window [Report No. 1087694]. For both cell inoculation densities, entrectinib at 60 mg/kg significantly prolonged the animal survival rate. The mice in vehicle groups died within 12

	<p>days after treatment start, the mice in entrectinib survived up to 33 days. The mice tolerated the compound well, but the KM12-luc intracranial tumors can cause heavy body weight loss in vehicle groups at a late stage.</p> <p>Entrectinib (G03344900.1-4; GI-17829) was screened using the Thermo Fisher Scientific's SelectScreen™ Profiling Service across a panel of 293 kinases at 100 nM to assess the relative selectivity of the molecule against [Report No. 1089804]. This screen utilized three screening platforms, including 201 kinases screened using the Z'-LYTE platform, 71 kinases screened using the LanthaScreen Binding platform, and 21 kinases screened using the Adapta platform. Collectively these screens demonstrated that entrectinib potently inhibited only 6 kinases > 95% (ALK, ROS1, TXK, TRKA, TRKB and TRKC), 2 kinases > 80%, (CSF1R and JAK2), 4 kinases > 60% (ITK, LTK, MuSK, and TYK2), and 18 kinases > 40%, (ARK5, AXL, BTK, BMX, FGFR2, FER, FGR, FLT3, FYN, HP IGF1R, IRR, JAK1, PEAK1, RET, SRC_N1, TNK1, and YES). The remaining 256 kinases in the kinome screen showed minimal inhibition by entrectinib, demonstrating the relative selectivity over the majority of the kinome. These results are consistent with a previous kinase inhibition studies that showed potent inhibition TRKA, TRKB, TRKC, ROS1 and ALK. These data are also consistent with the selective inhibition of cancer cell lines dysregulated by NTRK, ROS1 or ALK gene fusions, but not broadly across other cancer or normal cell lines.</p>
2) secondary pharmacodynamics	<p>Entrectinib was screened across a panel of 293 kinases to assess the relative selectivity of the molecule against a highly diverse set of protein kinases as well as serine threonine subfamilies. Entrectinib potently inhibited only ALK, ROS1, TXK, TRKA, TRKB, and TRKC >95%, demonstrating the relative selectivity over the majority of the kinome [1089804]. These results are consistent with previous kinase inhibition studies that showed potent inhibition of TRKA, TRKB, TRKC, ROS1, and ALK. These data are also consistent with the selective inhibition of cancer cell lines dysregulated by NTRK, ROS1, or ALK gene fusions, but not broadly across other cancer or normal cell lines.</p> <p>In vitro screening assays investigated the effects of a single concentration (10 M) of entrectinib and its major metabolite M5 on ligand binding to 89 targets (receptors, ion channels, and transporters [1089509, 1089510, 1089511, 1089512]. The results of these assays showed significant binding ($\geq 50\%$) at concentrations far exceeding the clinically relevant free exposure in plasma (free $C_{max,ss} \sim 0.007 \mu\text{M}$) for parent and/or M5 (free $C_{max} \sim 0.004 \mu\text{M}$) by ~ 1400- and 2500-fold, respectively, against several targets ($\alpha 1A$, 2A, 2C; CB2; D1, D2S, D3, D5; (DOP); GR; sigma2; OX; H1; H2; kappa; M1, 4, 5;</p>

	[MOP], PPAR, 5-HT1B, 2A, 2B, 5a, 6, 7; sst4, COX2; L-type Ca ²⁺ channels [dihydropyridine, verapamil, diltiazem, phenylalkylamine, and benzothiazepine sites], potassium channel hERG and sodium channel (site 2); norepinephrine, serotonin, dopamine, 5-HT, and choline transporters).
3) safety pharmacology	<p>Cardiovascular system</p> <p>Entrectinib was tested for effects on hERG current using stably transfected HEK293 cells under patch clamp conditions [1087271]. A concentration-dependent inhibition of the IKr channel occurred at all concentrations as follows: 16% (0.05 μM), 45% (0.5 μM), 65% (1.5 μM), and 90% (15 μM). The calculated IC₅₀ 0.6 μM, indicates a potential liability for QT prolongation at a 86-fold multiple to unbound human mean C_{max,ss} (0.007 μM). The effects of metabolite M5, a major circulating metabolite in human and dog, on the hERG expressed in mammalian cells were evaluated at ambient temperature using the QPatch HT® (Sophion Bioscience A/S, Denmark), an automatic parallel patch clamp system [1087275]. M5 was tested at 0.3, 1, 3, and 10 μM (n=4). The calculated IC₅₀ was approximately 10.4 μM. However, solubility limitations at 3 and 10 μM may have led to underestimation of hERG inhibition.</p> <p>In non-GLP Study 0231-2007 [Report No. 1087272] 3 conscious telemetered female dogs were given a single oral administration of vehicle (session 1) or 300 mg/kg entrectinib (session 2) 7 days apart [1087272]. NMS-1191372 did not have any effect on heart rate and ECG intervals, including QT. Based on the results 300 mg/kg was considered NOEL.</p> <p>In the GLP telemetry study, telemetered dogs (2/sex) were orally administered escalating entrectinib at 0, 60, and 120 mg/kg (1-week washout) [1087273]. The single dose levels were selected based on the results of a 4-week repeat-dose toxicity study [1087335], where ECG evaluations conducted on Day 11 in the 120 mg/kg/day group had revealed QTcF prolongation. In the GLP telemetry study, cardiovascular parameters and body temperature were reported from 60 minutes before treatment to 7 hours after treatment.</p> <p>Entrectinib did not have any effect on systemic arterial pressure, heart rate, ECG intervals (including QT and QTc), or body temperature at any of the doses tested; thus, the NOEL for cardiovascular parameters and body temperature was 120 mg/kg, with C_{max} estimated to range from 3.1 to 7.0 μM based on the Day 1 exposure data from the 4-week study [1087335].</p> <p>In the conditions of this experiment, the NOEL for NMS-1191372 on cardiovascular parameters and body temperature in the</p>

beagle dogs is 120 mg/kg.

An exploratory study was conducted to investigate the time/dose-dependent correlation of CNS clinical signs and QT prolongation observed in the 4-week 2x2 intermittent study with systemic exposure of entrectinib [1087338]. Entrectinib was administered orally once daily to female dogs (4/group) at 80 or 120 mg/kg/day for 7 days followed by an 11-day recovery period. Moderate increases in QT and QTcF intervals (versus pretest data) were noted in the recovery phase on Days 8 and 9 in 1 animal at 120 mg/kg/day (last dose Day 7, C_{max}=7.08 µM). By Day 11, effects on QT and/or QTcF interval were no longer observed.

Please also refer to the repeat dose section for QT prolongation effects after repeat dosing in GLP studies.

Respiratory system

In a GLP study, groups of 8 female rats were given a single oral dose of 0, 50, 100, or 200 mg/kg entrectinib [1087274]. Respiratory parameters including tidal volume, minute volume, respiratory rate, peak inspiratory flow, peak expiratory flow, inspiration time, expiration time, relaxation time, and Penh (an index of bronchoconstriction) parameters were collected using whole body plethysmography. No relevant effects were observed at any of the doses administered; the NOEL for respiratory function was 200 mg/kg.

Central nervous system

A modified Irwin's general behavioral test and an assessment of body temperature were incorporated into Days 1 and 14 of dosing in the first 2-week treatment period of the 4-week GLP 2x2 intermittent repeat-dose toxicology study in rats [Report No. 1087346]. Groups of 5 female rats received oral entrectinib 0, 50, 100, or 200 mg/kg/day. No changes in general behavior were observed on Day 1 of administration, however after 14 days of repeat dosing, all animals in the 200 mg/kg/day group showed abnormal gait and red staining on the nose at the 3-hour postdose time point. The corresponding mean C_{max} at 200 mg/kg/day dose was 4.6 µM on Day 1 and 9.0 µM on Day 42 (Day 14 of the second 2-week treatment period). No meaningful changes in body temperature were observed in any of the dose groups. Under the conditions of this study, NOEL for general behavior and body temperature was 100 and 200 mg/kg/day, respectively.

Exploratory 7-day repeat-dose study in dogs was conducted to investigate the time/dose-dependent correlation of CNS clinical signs and QT prolongation observed in the 4-week 2x2 intermittent study with systemic exposure of entrectinib [Report No. 1087338].

Entrectinib was administered orally once daily to female dogs (4/group) at 80 or 120 mg/kg/day for 7 days followed by an 11-day recovery period. Adverse CNS effects were noted in 2 of 4 animals at 120 mg/kg/day. Tremors, hypoactivity, staggering, and slight to moderate incoordination of hindlimbs and forelimbs were noted in 1 animal from Day 7 to 12 (individual C_{max} : 7.08 μ M, AUC: 144 μ M•h on Day 7). In the lower exposed animal, only slight to moderate incoordination of hindlimbs was noted on Days 10 and 11, and slight staggering was noted on Day 10 (individual C_{max} : 4.23 μ M, AUC₀₋₂₄: 92.7 μ M•h at the end of the treatment period).

Slight to marked dose-dependent signs of gastrointestinal toxicity including soft stool and diarrhea (at both the dose levels) and emesis (at 120 mg/kg only) were noted in all animals (more severe and higher incidence in animals at 120 mg/kg with CNS signs) and resolved within 2 to 3 days of being off dose. A minimal to slight progressive decrease in body weight was observed in all animals with no dose relationship. The 2 animals at 120 mg/kg/day with adverse CNS effects had slight to marked reductions in food consumption.

For additional information on CNS effects of entrectinib, please refer to the repeat dose section.

4) pharmacodynamic interactions

No pharmacodynamics drug interaction studies have been conducted.

3. Pharmacokinetics:

1) analytical procedures and reports on their validation

To determine the plasma concentrations of entrectinib and M5 in rats and dogs in all GLP studies, validated LC-MS/MS-based bioanalytical methods were applied [Reports No. 1087313, 1087314, 1087315, 1087318, 1087319, 1087320, 1087321]. The LC-MS/MS methods used in non-GLP nonclinical studies were either validated or qualified [Report No. 1087269].

Non-validated LC-MS/MS methods were also developed and used for the analysis of plasma and brain samples for preliminary or exploratory PK studies in mice, rats, and dogs. In addition, radioactivity levels were measured in blood, plasma, urine, and fecal samples from mass balance studies in rats and dogs. The methods used are described briefly in the study reports.

2) absorption

Absorption and pharmacokinetics

Entrectinib was readily absorbed following single oral administration, with a mean time to reach maximum concentration (T_{max}) observed at approximately 2 to 3 hours post dose. The absolute oral bioavailability of entrectinib ranged from 31 to 76% across different PK studies in animal models [Reports No. 1087276, 1087277, 1087278, 1087301, 1087302]. A 3- or 6-fold dose increase resulted in an increase of C_{max} and mean AUC_{0-∞}, indicating a proportional or slightly more than proportional increase of the

	<p>concentrations of NMS-1191372 with the dose [Reports No. 1087277, 1087278].</p> <p>Following single intravenous (IV) administration of entrectinib at 10 mg/kg to mice, rats, and dogs, entrectinib showed low to moderate plasma clearance and large volume of distribution at steady state (V_{ss}). The mean terminal $t_{1/2}$ was approximately 3.6, 3.5, and 11.9 hours in mice, rats, and dogs, respectively.</p> <p>Following repeated daily oral dosing of entrectinib in mice, rats, and dogs, the systemic exposures of entrectinib appeared to increase in an approximately dose-proportional manner over pharmacologically relevant dose ranges. Following five daily PO doses at 29.2, 58.4, and 87.6 mg/kg to mice, entrectinib was eliminated from the systemic circulation at mean $t_{1/2}$ values of approximately 4.3, 5.3, and 6.5 hours, respectively. Entrectinib average T_{max} ranged between 1 and 4 hours. [Report No. 1087310]. The pharmacokinetics of entrectinib in rats and dogs was evaluated across the repeat dose toxicology studies.</p> <p>The exposure of M5 was measured in some PK studies [Reports No. 1087301, 1087302], and metabolite-to-parent AUC ratios were ~0.05 in rats and up to ~2 in dogs.</p> <p>Under the conditions of the Study 17IGNYP2R2 (SR-17-012) [Report No. 1087481], entrectinib cannot be classified as highly</p>
	<p>permeable, as its mean apical-to-basolateral (A-to-B) apparent permeability (P_{app}) was lower than that of the co-dosed high</p>
	<p>permeability reference compound minoxidil, both in the absence and presence of cyclosporine A (CsA), an inhibitor of drug transporters. At 0.1 μM, the permeability of entrectinib (P_{app} [A-to-B] in presence of CsA: 1.07 ± 0.11 or $3.72 \pm 1.36 \times 10^{-6}$ cm/s vs. permeability of minoxidil (P_{app} [A-to-B]: $5.25 \pm 0.499 \times 10^{-6}$ cm/s) Entrectinib exhibited an efflux ratio of 4.22 in the absence of CsA, which was reduced to 0.808 in the presence of CsA.</p> <p>One study [Report No. 1087692] was conducted to compare the pharmacokinetics (PK) profile following oral administration of two different lots of RXDX-101 (suspension formulation and solution formulation). It was concluded that RXDX-101 was quickly absorbed in male beagle dogs after oral dosing. Compared to suspensions, administration of solution formulations resulted in significantly lower exposures of RXDX-101 in dogs.</p>
	<p>Plasma exposure of entrectinib and M5 were also evaluated in a 13-week juvenile rat toxicology study following daily oral dosing of entrectinib during postnatal day (PND) 7 and PND 97 [Report No. 1087245]. The exposure appeared to increase in an approximately dose-proportional manner over the dose range tested on PND 7, and were moderately reduced on PND 97 for both entrectinib and M5 reflecting increased clearance at the adult age. The M5-to-parent AUC ratios were similar to what has been observed in the adult rat.</p>

	<p>clearance value obtained, it can be concluded that the CYP3A4 was the mainly responsible for the metabolism of NMS-01191372. Furthermore, on the basis of percentage remaining data, CYP2C19 (79%), CYP2C9 (85%), CYP2C8 (86%) and CYP1A1 (90%) seem to be involved in the metabolism of NMS-01191372.</p>
<p>5) excretion</p>	<p>No dedicated excretion studies have been conducted. The excretion patterns have been assessed in studies in rats [Report No. 1087302] and dogs [Report No. 1087301] following a single dose of [¹⁴C]entrectinib. In both rats and dogs, fecal excretion was the predominant elimination route of [¹⁴C]entrectinib-derived radioactivity following oral or IV administration.</p>
<p>6) pharmacokinetic interactions (non-clinical)</p>	<p><u>In vitro inhibition of human CYP enzymes by entrectinib and metabolite M5</u></p> <p>In preliminary <i>in vitro</i> studies, entrectinib and M5 exhibited inhibitory potential toward CYP3A4/5, CYP2D6, and CYP2C8/9 [Reports No. 1087287, 1087289, 1089383]. Entrectinib (RO7102122) inhibited the activity of CYP3A4 with an IC₅₀ value of 2.04 μM [Report No. 1089383]. IC₅₀ values of M5 (RXDX-101-M5) for direct inhibition of CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6 and CYP3A4/5 were 17, 4.9, 21, 15 and 12 μM, respectively [Report No. 1087289].</p> <p>The purpose of the Study 0370-2013 [Report No. 1087295] was to investigate <i>in vitro</i> the potential Time-Dependent Inhibition (TDI) of entrectinib (NMS-1191372) towards the major isoforms of human cytochrome P450 (CYP450): CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. Test agent at the 50 μM concentration, showed low potential risk to be TDI, with an activity loss value, close to the fixed threshold (25%) only for CYP2B6 (23.5%). Entrectinib (RXDX-101) appeared to cause little to no direct or time-dependent inhibition of CYP2B6 [Report No. 1087300].</p> <p><u>In vitro induction of human CYP enzymes by entrectinib and metabolite M5</u></p> <p>Entrectinib exhibited induction potential toward CYP3A4/5, CYP1A2 or CYP2C19 <i>in vitro</i>. Test agent NMS 1191372 was able to affect significantly the mRNA expression of CYP1A2 (7-fold at 10 μM) and CYP3A4 (2-fold and 29-fold at 1 μM and 10 μM, respectively), whereas exerted any significant effect towards CYP2B6 [Report No. 1087293]. Treatment of cultured human hepatocytes with up to 10 μM entrectinib (RXDX-101) induced concentration dependent increases in CYP2C8, CYP2C9 and CYP3A4 mRNA expression levels. At 10 μM, the mean percent of positive control for mRNA level increase in CYP2C8, CYP2C9 and CYP3A4 by RXDX-101 was 90.2, 109 and 47.9%, respectively [Report No. 1087299].</p> <p>The induction potential of M5 (RXDX-101-M5) on the expression or activity of cytochrome P450 (CYP) enzymes was evaluated in</p>

three cultures of primary cryopreserved human hepatocytes [Report No. 1087288]. Treatment of cultured human hepatocytes with up to 10 μM RXDX-101-M5 did not induce CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4/5 enzyme activity or CYP1A2 mRNA levels. However, treatment of cultured human hepatocytes with up to 10 μM RXDX-101-M5 induced largely concentration dependent increases in CYP2B6 and CYP3A4 mRNA expression levels. At 10 μM , the mean percent of positive control for mRNA level increase in CYP2B6 and CYP3A4 was 26.5 and 16.5%, respectively.

Transporter-mediated drug interactions with entrectinib and metabolite M5 *in vitro*

Entrectinib is a poor substrate of rodent and human Permeability-glycoprotein (P-gp), which had a little effect at the level of the BBB for entrectinib [Report No. 1088452], whereas M5 was shown to be a substrate of P-gp and breast cancer resistance protein (BCRP) *in vitro* [Report No. 1087292].

In vitro transporter studies suggested a potential inhibitory effect of entrectinib and M5 on P-gp, BCRP, organic anion-transporting polypeptide (OATP) 1B1, and MATE1. In the presence of entrectinib (RXDX-101), P-gp, BCRP and OATP1B1 were inhibited with IC_{50} values of 1.33, 3.02 and 6.46 μM , respectively. OATP1B3, organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 were not inhibited more than 50% in the presence of up to 30 μM RXDX-101 [Report No. 1087291].

There was insufficient inhibition of organic cation transporter (OCT) 1 by entrectinib to determine an IC_{50} value, therefore, the IC_{50} value was greater than 30 μM for OCT1. For MATE1, the maximum inhibition observed was 88.4%. The entrectinib IC_{50} was determined to be 1.10 μM . For MATE2-K, the maximum inhibition observed was 57.5% which was the only one data point showing greater than 50% inhibition, so the IC_{50} cannot be determined accurately, but was estimated to be 19.4 μM . For Bile Salt Export Pump (BSEP), the maximum inhibition observed was 84.9%; the IC_{50} value was determined to be 13.3 μM [Report No. 1087486].

As for M5 (RXDX-101-M5) for OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, and BSEP, there was insufficient inhibition to determine an IC_{50} value, therefore, the IC_{50} values are greater than 30 μM for each of these transporters. For MATE1 and MATE2-K, the maximum inhibition observed were 96.9% and 90.3%, respectively. The IC_{50} values were determined to be 0.642 μM and 3.14 μM , respectively. For BCRP and P-gp, the maximum inhibition observed were 80.8% and 84.6%, respectively. The IC_{50} values were determined to be 8.35 μM and 10.1 μM , respectively [Report No. 1087486].

In study 30222 [Report No. 1090527], entrectinib (RO7102122) was characterised for its inhibitory potential against OATP1B1 with

	probe substrates pitavastatin and rosuvastatin. The results reveal RO7102122 to inhibit OATP1B1, with IC ₅₀ values of 3.89 μM and 4.22 μM, when using rosuvastatin and pitavastatin, respectively.
7) other pharmacokinetic studies	Other studies that were conducted during the discovery and early development stage to provide exploratory information for the follow-on studies include PK evaluation in dogs using 2 polymorph forms of entrectinib [Report No. 1087279], entrectinib PK in dogs under fed and fasted conditions [Reports No. 1087280, 1087281], metabolic profiling study using HPLC coupled with UV and high resolution mass spectrometry (HRMS) on dog plasma following oral administration of entrectinib [Report No. 1087484], discovery PK of entrectinib in nude mice [Report No. 1087303] and in different tumor-bearing mouse models [Reports No. 1087304, 1087306, 1087307, 1087312].
4. Toxicology:	
1) Single dose toxicity	<p>Single-dose, oral, non-GLP toxicity studies with entrectinib were conducted in Sprague Dawley (SD) rats [1087336] and one Beagle dog [1087337]. In rats (n=5/sex/group), doses of 60, 120, and 240 mg/kg did not cause any clinical signs [1087336]. Clinical pathology changes included increased platelets at 240 mg/kg and increased phosphorus and total bilirubin in females at 240 mg/kg. Reduced extra medullary hematopoiesis was also observed in spleen of male rats at 240 mg/kg. The MTD was considered to be ≥240 mg/kg .</p> <p>In a dog (n=1) treated with a single dose of 300 mg/kg, no clinical signs or ECG changes were observed [1087337]. Minimal increase in lactate dehydrogenase and creatine kinase were observed. The MTD was considered ≥300 mg/kg.</p> <p>Entrectinib was well tolerated up to the highest dose in both rats and dogs with no adverse findings</p>
2) Repeated dose toxicity	<p>Repeat-dose toxicity studies included a 14-day exploratory study in mice, 14-day Dose Range-Finding (DRF) Study, and 4-week (intermittent and daily dosing) and 13-week studies in SD rats and Beagle dogs. Recovery evaluations were included for all rat and dog studies. Evaluations included: clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmology, clinical pathology (serum chemistry, hematology, coagulation, and urinalysis), gross pathology, organ weight, histopathology evaluations, and toxicokinetic (TK) analysis, except where noted. Additional evaluations included ECGs in the dog studies and modified Irwin test in the 4-week 2×2 intermittent dosing rat study.</p> <p>Entrectinib was formulated in 0.5% (w/v) methylcellulose in deionized or reverse osmosis water, and given orally to mice, rats, or dogs up to a volume of 10 mL/kg. Control animals received 0.5% (w/v) methylcellulose.</p> <p>In 14-Day Exploratory Mice Study, 0, 120, or 240 mg/kg/day</p>

entrectinib was administered orally (PO) once daily to CD-1 female mice [Report No. 1087345]. No mortality was observed. One animal in the 240 mg/kg/day group exhibited a transient, slight decrease in activity on Days 3 and 4. Minimal to slight increases in serum creatinine and urea, sodium, chloride, and potassium, and minimal to slight decreases in serum amylase and lipase, total cholesterol and triglycerides were observed at 240 mg/kg/day. No test article related changes were identified in limited histopathology conducted on high-dose animals (liver, pancreas, spleen, thymus, mesenteric lymph nodes, femur with bone marrow, stomach, jejunum, colon). The no observed adverse effect level (NOAEL) for entrectinib was 240 mg/kg/day.

In the 14-day DRF study, rats (3/sex/group) received 0, 100, 200, or 400 mg/kg/day entrectinib PO for up to 14 consecutive days followed by a 1-week recovery period [1087347].

Three additional animals/sex/group were used to evaluate toxicokinetics and reversibility

One male in the main group and one female in the TK group at 400 mg/kg/day died on Day 8 with clinical signs of decreased activity and dyspnea resulting in discontinuation of dosing at this level on Day 7 and Day 9 for females and males, respectively. Major

Incoordination was observed in 1 female receiving 100 mg/kg/day towards the end of treatment period and in all animals receiving 200 mg/kg/day (Days 4–5). The findings were fully reversed after the 1-week recovery period. Hematological changes included slight to moderate increases in reticulocytes, platelets, and white blood cells (WBC) and a slight decrease in red blood cells (RBC) and

weight loss or decreased body weight gain was observed in individual animals. A slight increase in urea without a corresponding change in serum creatinine levels was observed at 200 mg/kg/day. In liver, slight to marked hepatocellular vacuolation and associated necrosis/single cell necrosis at 200 mg/kg/day in females and 400 mg/kg/day in both sexes was observed. These changes correlated with increases in ALT and AST. Reduced cellularity of the

discontinued on Days 7 and 9 for females and males due to severe clinical signs of decreased activity and dyspnea. Marked reduction in food consumption was observed in females. In the kidney of some animals, vacuolation of tubular epithelial cells in the cortex was observed. Complete regression of kidney changes occurred after recovery, while changes in the liver and in lymphoid tissues were partially reversed after the 7-day recovery period.

In Study 0163-2009 [Report No. 1087346], entrectinib (NMS-1191372) was administered PO to rats (Sprague Dawley) at doses of 0, 50, 100, and 200 mg/kg/day (15/sex/group) for 4 weeks with an intermittent dosing schedule (two-week treatment – two-week rest – two-week treatment). Recovery period lasted 4 weeks. The test agent caused mortality in females during anesthesia for blood collection and effects on CNS and liver at 200 mg/kg/day (AUC_{0-24} on Day 42 of 111 or 192 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ in males and females, respectively). Dose-related effects were observed in the spleen, mesenteric and mandibular lymph nodes and skin from the dose of 50 mg/kg/day. Complete regression occurred after recovery except for the spleen. The dose of 100 mg/kg/day can be considered the MTD. This dose corresponds on Day 42 to a mean AUC_{0-24} of 54 or 111 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ in males and females, respectively.

The purpose of 4-week toxicity study [Report No. 1087348] was to evaluate the toxicity and determine the TK of entrectinib (RXDX-101) when administered daily via oral gavage to rats for at least 4 weeks and to assess the reversibility, persistence, or delayed occurrence of any effects after a 2-week recovery phase. Administration of RXDX-101 at doses of 25, 50 and 100 mg/kg/day resulted in a dose-related incidence and severity of skin lesions, and a decision to stop dosing of the 100 mg/kg/day group and early necropsy of the TK and toxicity animals in the group on Day 24. The skin lesions, more severe in the female rats, manifested as scabs/sores and ulcerative moist lesions in some cases, coincided with decreased body weight and food consumption in the 100 mg/kg/day females, and correlated microscopically with minimal to marked acanthosis, erosion/ulcer, epidermal surface exudate, hemorrhage, and/or mixed cell inflammation. The skin effects were also reflected in clinical pathology changes indicative of inflammatory response, i.e., higher leukocyte and platelet counts, as well as serum protein changes (low albumin and globulin ratio, and high globulin concentration). Other RXDX-101-related changes included decreased red blood cell mass and minimal to mild

microscopic changes in the mandibular salivary gland (increased secretory product, 100 mg/kg/day), spleen (lymphoid depletion, congestion and extramedullary hematopoiesis, all doses). After a recovery period from 15 (50 mg/kg/day) to 20 days (100 mg/kg/day), the observed effects had reversed partially or completely. Based on these findings, 25 mg/kg/day was considered the NOAEL, corresponding to a mean C_{max} of 1.17/1.51 μM (male/female) and an AUC_{0-24} of 11.3/18.4 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ (male/female) on Day 28 of the dosing phase.

C_{max} and AUC values of 0.631 μM and 5.98 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$, respectively, in males and 0.629 μM and 6.71 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$, respectively, in females on Day 91 of the dosing phase.

In 14-day DRF study in female beagle dogs [Report No. 1087340], entrectinib (NMS-1191372), given orally, daily at the doses of 60 and 120 mg/kg and twice a day for 7 days at the dose of 120 mg/kg bid, caused no mortality. Incoordination, staggering, tremors and hypoactivity were observed after five dosings in animals given 120 mg/kg BID. No target organs were identified at histopathological examination in the conditions applied in the present study. Slight accumulation of NMS-1191372 in terms of AUC_{0-24} was observed after repeated dosing. On the basis of the clinical signs observed, the dose of 120 mg/kg/day, corresponding to an AUC_{0-24} of 63.4 μM on Day 14, can be considered as the MTD.

In Study 0157-2009 [Report No. 1087335], entrectinib (NMS-1191372) was given orally to beagle dogs at the doses of 30 or 60 mg/kg according to the following schedule: two-week daily treatment – two-week rest – two-week daily treatment, and at the

dose of 120 mg/kg/day daily for 11 (males) or 10 days (females); an additional group was given the vehicle according to the cyclic schedule. NMS-1191372, given orally for 10 or 11 days at the dose of 120 mg/kg/day, and as two 14-day cycles separated by a 14-day interval at the doses of 30 and 60 mg/kg/day, caused signs of CNS involvement from the dose of 60 mg/kg/day in both sexes; these signs were particularly severe at the dose of 120 mg/kg/day (AUC_{0-24} : 147-159 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ after repeated administration), so to lead to preterm sacrifice or mortality of the majority of females, and to interruption of the treatment at that dose level. Another target organ was the liver, showing single instances of hepatocellular necrosis at the dose of 120 mg/kg/day. Systemic exposure increased by a factor of three after repeated administration at the dose of 120 mg/kg/day. Under the condition applied in the present study, the dose of 60 mg/kg/day (AUC_{0-24} =37.3-37.8 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ after repeated administration) can be considered as the MTD.

1.38 μM and AUC_{0-24} of 9.31 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ for RXDX-101 and C_{max} of 0.79 μM and AUC_{0-24} of 8.83 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ for metabolite M5 on Day 28 of the dosing phase.

	<p style="text-align: right;">C_{max} and AUC_{0-24} values of 0.476 μM and 3.39 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ in males, and 0.673 μM and 5.04 $\mu\text{M}\cdot\text{hr}$ in females, respectively on Day 91.</p>
3) Genotoxicity: in vitro	<p>The standard genotoxicity battery in vitro assays included the Bacterial Reverse Mutation Assay [Report No. 1087350], a non-GLP micronucleus assay in Human Peripheral Blood Lymphocytes (HPBL) [Report No. 1087351], a GLP micronucleus assay in HPBL including fluorescence in situ hybridization analysis (FISH) [Report No. 1087352].</p> <p>Entrectinib was negative in the Ames assay, and did not induce a statistically significant increase in micronuclei in the initial non-GLP HPBL test. In the GLP in vitro micronucleus assay, statistically significant increases in the frequency of micronuclei were observed, following 24 hours of incubation in the absence of metabolic activation. Subsequent FISH analysis indicated that micronuclei were predominantly centromere positive, suggesting an aneugenic mechanism of micronucleation.</p>
Genotoxicity in vivo (including additional assessment on toxicokinetics)	<p>Entrectinib (RXDX-101) was evaluated for its <i>in vivo</i> genotoxic potential in the comet assay to induce DNA damage in liver cells and in the micronucleus assay for clastogenic activity in bone marrow of male rats [Report No. 1087353]. Under the conditions of this study, RXDX-101 administered via oral gavage at doses up to and including 2000 mg/kg/day did not induce a significant increase in DNA damage in liver or bone marrow cells relative to the concurrent vehicle control. Therefore, RXDX-101 was concluded to</p>

	be negative in the <i>in vivo</i> Comet and micronucleus assays.
4) Carcinogenicity:	Entrectinib is intended for the treatment of patients with advanced cancer. In line with the ICH S9 guideline, no carcinogenicity studies have been conducted.
long-term studies	-
short-term studies or mid-term studies	-
additional studies	-
5) Reproductive and developmental toxicity:	
effects on fertility and early embryonic development	<p>The ICH S9 guideline states that studies on fertility and early embryonic development are not warranted to support marketing authorization applications for pharmaceuticals such as entrectinib intended for the treatment of patients with advanced cancer. Accordingly, such studies were not performed.</p> <p>Effects on male and female reproductive organs in mature animals were investigated in the oral repeat-dose toxicity studies in rats and dogs, and no treatment-related histopathological abnormalities were detected.</p>
embryotoxicity	<p>The objective of the DRF study [Report No. 1087362] was to assess the potential embryo-fetal developmental toxicity of entrectinib (RXDX-101) in rats and to determine dosage levels for a definitive embryo/fetal developmental toxicity study in rats. Entrectinib was administered orally to groups of 8 pregnant rats during the organogenesis period (from Day 6 to 17 of gestation) at dose levels of 0, 25, 50, 100, and 200 mg/kg/day. Lower maternal mean body weight gains, in the absence of reduced mean food consumption, were noted for females in the 200 mg/kg/day group throughout the treatment period. Lower mean fetal weights were also noted in all RXDX-101 groups, which corresponded to the lower mean gravid uterine weights. The decreases in fetal weights at 100 and 200 mg/kg/day were statistically significant. No RXDX-101 related external fetal malformations or variations were observed at any dosage level. Based on these results, dosage levels of 12.5, 50, and 200 mg/kg/day will be selected for the definitive embryo/fetal development study of RXDX-101 administered orally by gavage to pregnant CrI:CD(SD) rats.</p> <p>In embryo-fetal development study entrectinib (RXDX-101) was administered orally to groups of 25 pregnant rats during the organogenesis period (from Day 6 to 17 of gestation) at dose levels of 0, 12.5, 50, and 200 mg/kg/day [Report No. 1087361]. Cesarean section was performed on Day 20 of gestation. Maternal toxicity was apparent at 200 mg/kg/day, as evidenced by adverse clinical signs, as well as lower body weight parameters and corresponding decreased mean food consumption generally throughout gestation. No evidence of maternal toxicity was noted at 12.5 and</p>

	<p>50 mg/kg/day. Based on these results, a dosage level of 50 mg/kg/day was considered to be the NOAEL for maternal toxicity when RXDX-101 was administered orally by gavage to pregnant Crl:CD(SD) rats. Lower mean fetal weights were noted at 50 and 200 mg/kg/day. These fetal weight effects corresponded to the lower mean gravid uterine weight and increases in external and skeletal malformations at 200 mg/kg/day, as well as the reduced fetal skeletal ossification findings at 50 and 200 mg/kg/day. Based on these results, a dosage level of 12.5 mg/kg/day was considered to be the NOAEL for embryo/fetal developmental toxicity. The corresponding maternal exposures (AUC_{0-24}) of RXDX-101 on gestation day 17 at the maternal NOAEL of 50 mg/kg/day was $41.5 \mu M \cdot hr$, while an AUC_{0-24} value of $10.2 \mu M \cdot hr$ was observed at the embryo/fetal developmental NOAEL of 12.5 mg/kg/day.</p>
prenatal and postnatal toxicity	<p>The ICH S9 guideline states that studies on pre- and postnatal toxicology are not warranted to support marketing authorization applications for pharmaceuticals such as entrectinib intended for the treatment of patients with advanced cancer. Accordingly, such studies were not performed.</p>
studies in which medication is administered to the offspring (immature animals) and/or long-term effects are assessed	<p>The studies included 6-day tolerability and TK study [Report No. 1087702], 4-week DRF study [Report No. 1087703], and a 13-week definitive juvenile toxicity study with dosing from postnatal day (PND) 7 through PND97 followed by a 4-week recovery period [Report No. 1087245].</p> <p>In the first of these studies, entrectinib (RXDX-101) was administered to juvenile female SD rats either as a single dose on PND7 (Groups 1, 3, and 5) or as repeat doses on PNDs 7 through 12 (Groups 2, 4, and 6) at 25, 50, and 100 mg/kg/day, respectively. Following repeat dosing from PNDs 7 through 12, a dose of 25 mg/kg/day was well tolerated in juvenile female rats. A dose of 50 mg/kg/day resulted in clinical signs of slight suspected dehydration and moderate reductions in body weight gains. The top dose of 100 mg/kg/day resulted in clinical signs of slight to moderate suspected dehydration and cold to touch, as well as severe body weight loss. Based on these data, dose levels of 0 (Control), 25, 50, and 75 mg/kg/day were recommended for the DRF toxicity study in juvenile rats.</p> <p>The objectives of the DRF study were to determine the effects of RXDX-101 when administered orally by gavage for 28 days to juvenile Crl:CD(SD) Sprague-Dawley rats from PND 7 through 34 and to provide information for the selection of dose levels to be used in a subsequent juvenile toxicity study. In addition, the toxicokinetic characteristics of RXDX-101 and M5 metabolite were determined. In conclusion, once daily oral administration of RXDX-101 to juvenile Sprague Dawley rats on PNDs 7 through 34, doses of 25, 50, and 75 mg/kg/day resulted in death and exceeded the MTD.</p>

Adverse clinical signs, reductions in mean body weights and body weights gains, and/or reductions in food consumption values were observed at > 25 mg/kg/day. The mortality and severity of toxicities led to early terminations of the animals at 50 mg/kg/day (PND 21 to 22) and 75 mg/kg/day (PND 15 and 17). At study termination, reductions in red and white cell parameters were observed in males and females at 25 mg/kg/day, along with increases in prothrombin time and concurrent reductions in activated prothrombin time and fibrinogen. Slight reductions in albumin, total protein, and globulin, were observed in males and females at 25 mg/kg/day, as well as slight reductions in creatinine, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, glucose, cholesterol, potassium, triglycerides, and aspartate aminotransferase. There were no gross lesions attributed to RXDX-101, but reductions in absolute organ weights and ratios of organ weights to terminal body weights and brain weights were reflective of reductions in mean body weights and body weight gains. No gender differences in RXDX-101 and M5 exposures were observed. RXDX-101 exposures appeared to increase in a dose-proportional manner on PND 7 from 25 to 75 mg/kg/day. Concentrations on PND 21 were higher than those observed on PND 7 at 50 mg/kg/day. Exposures of M5 did not vary across dose levels (PND 7) and were lower than those of the parent compound. Based on these data, dose levels of 0 (Control), 4, 8, and 16 mg/kg/day were selected for the definitive toxicity study in juvenile rats.

In the 13-week GLP study, entrectinib was administered orally by daily gavage to juvenile SD [CrI:CD(SD)] rats from PND 7 through 97, at 4, 8, and 16 mg/kg/day with a 4-week recovery phase through PND 125 [Report No. 1087245]. The following parameters and endpoints were evaluated in this study: viability, clinical signs, body weights, body weight changes, food consumption, sexual maturation, ophthalmological examinations, neurobehavioral evaluations (functional observational battery, motor activity, acoustic startle habituation, Morris watermaze), toxicokinetic evaluations (RXDX-101 and M5 metabolite), clinical pathology (hematology, coagulation, clinical chemistry, urinalysis), gross necropsy examinations, organ weights, femur lengths, and histopathological and neurohistopathological examinations. In conclusion, RXDX-101 was tolerated in juvenile rats at 8 mg/kg/day but induced mortalities at 16 mg/kg/day. The NOAEL for this study was considered to be 4 mg/kg/day, based on the developmental delays, clinical signs including convulsions, abnormal gait, decreased activity, tremors, labored breathing, prostration, low carriage, and increased respiratory rate (breathing), and effects on Functional Observational Battery (FOB) and water maze at higher doses. The associated mean AUC_{0-24} and C_{max} values for RXDX-101 at 4 mg/kg/day on PND 7 were 7.48 $\mu M \cdot h$ and 6.05 $\mu M \cdot h$ and 0.456 μM and 0.341 μM in

	<p>males and females, respectively. The associated mean AUC_{0-24} and C_{max} values for RXDX-101 at 4 mg/kg/day on PND 97 were 2.20 $\mu M \cdot h$ and 3.12 $\mu M \cdot h$ and 0.288 μM and 0.398 μM for males and females, respectively.</p>
6) local tolerance	<p>Entrectinib (NMS-1191372) was applied to the skin of the back of three female New Zealand White rabbits, 500 mg/animal, as a single 4-hour treatment [Report No. 1087357]. The treated area was observed for erythema and eschar or edema formation at the end of the application period and 1, 24, 48 and 72 hours thereafter. No irritation was apparent on the treated skin of any animal.</p> <p>Entrectinib (NMS-1191372) was placed in the conjunctival sac of the right eye of three female New Zealand White rabbits, 100 mg/animal, as a single 1-hour application [Report No. 1087358]. The treated eye was examined with the help of a hand slit-lamp 1, 24, 48 and 72 hours after the application for damage or irritation to the cornea, iris and conjunctivae, the untreated left eye serving control. A transient acute irritation, with interindividual variability, was apparent in the treated eye of all animals, with a complete recovery within 3–7 days post instillation. There was no indication of a systemic effect of the treatment.</p>
7) additional toxicity studies:	
antigenicity (antibody response)	-
immunotoxicity	-
study of the mechanisms of action	<p>To assess the mechanism of action of entrectinib in NTRK gene fusion cell lines, the phosphorylation of the TRK fusion protein and of downstream transducers of TRK signaling, including PLCγ, protein kinase B (AKT), and mitogen activated protein kinases (MAPKs), was evaluated in entrectinib-treated NTRK1 fusion-dependent human CRC KM12 cells [Report No. 1087242]. Consistent with the potent anti-proliferative effects, entrectinib completely inhibited phosphorylation of TRKA at concentrations of 10 nM and higher, with concomitant inhibition of phosphorylation of key downstream transducers.</p> <p>Mechanism of action of entrectinib (NMS-1191372) in human ALK dependent anaplastic large cell lymphoma (ALCL) cell lines was investigated in the Study N-0026077 [Report No. 1087264]. Analysis of different cellular models treated with NMS-1191372 showed a dose-dependent modulation of ALK phosphorylation with concomitant inhibition of the phosphorylation of STAT3, which is a major downstream transducer of ALK activation in this type of lymphoma.</p> <p>In Study N-0026079 [Report No. 1087265] the mechanism of action of NMS-1191372 in NCIH2228 cells, which bear the ALK rearrangement EML4-ALK was investigated. In vitro analysis revealed that NMS-1191372 induces a clear dose-dependent modulation of ALK phosphorylation in NCIH2228, with</p>

	<p>concomitant inhibition of the phosphorylation of AKT and MAPK proteins, which are downstream transducers of ALK in this tumor-derived cell line.</p> <p>To further characterize the mechanism of action of entrectinib, cell cycle distribution was evaluated by FACS analysis [Report No. 1087242]. Treatment-induced accumulation of cells in G1 24 hours post-treatment initiation was observed at all doses tested. Results confirm that inhibition of KM12 proliferation by NMS-1191372 is accompanied by potent modulation of markers of TRKA activity. Cell growth arrest and induction of cell death induced by NMS-1191372 in this tumor cell line is consistent with a mechanism of action of TRKA inhibition. Consistent with these data, both entrectinib and the metabolite M5 resulted in a G1 cell cycle arrest [Report No. 1089907]. Suppression of cell cycle was accompanied by an induction of apoptosis as indicated by an increase in caspase-3/7 activity. These data demonstrate that the mechanism of action of entrectinib is through inhibition of kinase activity of constitutively active fusion proteins that drive downstream pathway activity, resulting in cell growth arrest and induction of apoptosis.</p> <p>The anti-proliferative activity against the ROS1 oncogene was confirmed by a mechanism of action study that showed potent inhibition of ROS1 phosphorylation in ROS1 fusion-driven engineered Ba/F3 cells [Report No. 1087258]. Treatment with entrectinib induced a dose-dependent inhibition of ROS1 phosphorylation, which was more potent compared with crizotinib.</p>
drug dependence	Not applicable.
toxicity of metabolites	<p>Metabolite M5 was considered adequately characterized in routine toxicology studies.</p> <p>In addition, the effects of metabolite M5 on the hERG expressed in mammalian cells were evaluated at ambient temperature using the QPatch HT[®] (Sophion Bioscience A/S, Denmark), an automatic parallel patch clamp system [Report No. 1087275]. M5 was tested at 0.3, 1, 3, and 10 μM. Each test article concentration was tested in four cells (n=4). The duration of exposure to each test article concentration was approximately 3 minutes. The calculated IC₅₀ was approximately 10.4 μM.</p>
toxicity of impurities	<p>Although not specifically required per ICH S9 guideline (treatment of advanced cancer), a complete assessment of mutagenic impurities was conducted in accordance with the principles of ICH M7 guideline [ICH M7 2014].</p> <p>In the bacterial reverse mutation assays, RO7278382, RO7278380, and RO7278384 were tested using <i>S. typhimurium</i> tester strains TA98, TA100, TA1535, and TA97a and <i>E. coli</i> tester strain WP2 uvrA in the presence and absence of Aroclor-induced rat liver S9 [Reports No. 1087354, 1087355, 1087356]. The maximum dose for each compound tested was 1000 μg per well.</p>

	<p>RO7280631, RO7288150, and RO7288613 were also tested in bacterial reverse mutation assays using <i>S. typhimurium</i> tester strains TA97, TA98, TA100, TA1535, and TA102 in the presence and absence of s-Naphthoflavone/Phenobarbital-induced rat liver S9 [Reports No. 1085144, 1085149, 1085150]. The maximum dose for each compound tested was 5000 µg per well. Based on the assay results, it was concluded that RO7278382, RO7278380, RO7278384, RO7280631, RO7288150, and RO7288613 were negative in the bacterial reverse mutation assay, as no positive mutagenic responses were observed with any of the tester strains in either the presence or absence of S9 activation.</p>
other	<p>In an <i>in vitro</i> neutral red uptake phototoxicity assay in BALB/3T3 mouse fibroblasts (3T3 NRU PT), entrectinib was found to have phototoxic potential by the photo irritancy factor and mean photo effect [Report No. 1087359].</p> <p>In the follow-up <i>in vivo</i> rat study in Long-Evans pigmented rats, entrectinib was determined not to be phototoxic [Report No. 1087360]. However, microscopic findings in rats with or without exposure to light of neutrophil infiltrates of corneal stroma and single cell necrosis of the corneal epithelium at doses ≥ 100 mg/kg/day were considered entrectinib-related.</p>
5. Conclusions on non-clinical study	<p>Entrectinib is a potent inhibitor of the receptor tyrosine kinases TRKA (IC_{50}=1.7 nM), TRKB (IC_{50}=0.1 nM), TRKC (IC_{50}=0.1 nM),</p>

ROS1 ($IC_{50}=0.2$ nM), and ALK ($IC_{50}=1.6$ nM). Given the low nanomolar potency of entrectinib against all the TRK kinases, entrectinib is expected to have therapeutic utility across all tumors driven through dysregulation of these kinases.

Entrectinib demonstrated potent anti-proliferative effects across 13 NTRK fusion variants and one ROS1 fusion variant in engineered murine Ba/F3 cell lines with low nanomolar IC_{50} . Similarly, in human tumor cell lines and patient-derived tumor models harboring NTRK1, NTRK2, or NTRK3 fusions, entrectinib demonstrated potent anti-proliferative activity with low nanomolar potency and/or anti-tumor efficacy in mouse tumor models at daily doses greater than 5 mg/kg. Entrectinib anti-proliferative activity was directly correlated with inhibition of TRKA, TRKB, and TRKC phosphorylation, and the phosphorylation of key downstream mediators of the TRK signaling pathways (PLC γ , MAPK, and AKT). Additionally, entrectinib was shown to induce cell cycle arrest followed by the induction of apoptosis in NTRK1 fusion-positive cell lines.

In vivo, entrectinib was well tolerated and demonstrated dose-dependent anti-tumor activity in six distinct tumor types, covering eight gene fusions (TPM3-NTRK1, MPRI/NTRK1, ETV6-NTRK3, LMNA-NTRK1, BCAN1-NTRK1, ETV6-ROS1, SCD4-ROS1, CD74-ROS1). Treatment with entrectinib resulted in tumor regressions in mouse xenograft models of CRC (NTRK1 gene fusions), soft tissue sarcoma (NTRK1 gene fusion), NSCLC (NTRK1, ROS1, or ALK gene fusions), head and neck cancer (NTRK3 gene fusion), AML (NTRK3 gene fusion). Dedicated PK/PD studies demonstrated a clear relationship between inhibition of signaling downstream of the driver fusion protein and anti-tumor activity, with activity occurring at plasma exposures (based on AUC_{0-24}) below those achievable in the clinic.

Orally administered entrectinib was shown to inhibit tumor growth and prolong survival in intracranial BCAN-NTRK1 fusion-positive glioma models and in a TPM3-NTRK1 fusion-positive CRC model at plasma exposures (based on AUC_{0-24}) at around those achievable in the clinic, indicating that entrectinib may have a therapeutic role in patients with CNS metastatic disease.

The PK properties of entrectinib have been studied *in vitro* using animal and human tissues and expressed proteins, and *in vivo* in the species and strains used in the safety evaluation.

Analysis of brain samples from rats and dogs following repeated oral administration of entrectinib in the toxicology studies showed generally dose-related concentrations at 24 hours of entrectinib in the brain tissue. The brain/plasma ratios ranged from 0.6 to 1.5 in whole brain of the rats (100 to 200 mg/kg/day) and from 1.4 to 2.2 in various brain regions of dogs (30 to 60 mg/kg/day). The rat infusion study showed that a brain-to-plasma concentration ratio of 0.6 for entrectinib was achieved after 6-hour IV infusion of entrectinib while the plasma concentration was $\sim 1.4 \mu\text{M}$. The C_{free} concentration of $\sim 1 \text{ nM}$ was observed after 5–6 hour IV infusion of entrectinib to rats, which may be ~ 3 -fold lower than the estimated free brain concentration at steady state. These estimated free brain concentrations (1–3 nM) are at or above the IC_{50} for TRKs or ROS1. Consistently, a robust tumor inhibition and survival efficacy was observed in a TPM3–NTRK1-expressing intracranial tumor xenograft mouse model following 30 mg/kg q.d. oral doses with an average plasma concentration of $\sim 2 \mu\text{M}$ (estimated by $\text{AUC}_{0-24/\tau}$). These data suggest that entrectinib can penetrate into brain to achieve pharmacological effect at clinical relevant exposure.

M5 and M11 were the only two major circulating metabolites identified in human. M5 was found *in vitro* in hepatocytes and liver microsomes from all species studied as well as *in vivo* in both the toxicology species. M5 was shown to have similar inhibition activity as entrectinib against TRKA/B/C, ROS1, as well as similar potency in the cell-based assay. In addition, *in vitro* studies showed that M5 and entrectinib had similar protein binding ($> 99\%$) in plasma from human and animal species tested. Therefore, the contribution of M5 to *in vivo* activity should be determined on the basis of its systemic exposure relative to entrectinib.

CYP3A4 was observed to play a major role in the biotransformation of entrectinib and formation of M5 *in vitro*. Entrectinib may be metabolized by multiple human metabolic enzymes at much lower metabolic activities including CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5, and UGT1A4.

Entrectinib and M5 exhibited inhibition and induction potential toward CYP3A *in vitro*. Entrectinib and M5 also exhibited inhibitory potential on P-gp, BCRP, OATP1B1, and MATE1 *in vitro*.

From the data in the nonclinical package, a favorable benefit/risk

ratio is expected for entrectinib. The nonclinical safety assessment conducted with entrectinib showed effects on CNS (dose limiting), skin (dose limiting), liver, effects on hematology, GI tract (dose limiting), and QT/QTcF interval. Entrectinib was not mutagenic or clastogenic; it showed aneugenicity in an in vitro assay but not in an in vivo study in rats. Entrectinib affected embryofetal development in rats.

In conclusion, entrectinib is a CNS-penetrant molecule with demonstrated efficacy in nonclinical models that translates clinically into treatment of patients with solid tumors containing NTRK1/2/3, or ROS1 gene rearrangements (fusions). The ADME and toxicology program provides a well-characterized drug metabolism and pharmacokinetics/toxicity profile of entrectinib.

The overall nonclinical safety data for entrectinib support the daily administration under close medical management of a treating physician to the targeted patient populations with advanced cancer, including pediatric patients. These nonclinical data complement the clinical data and support entrectinib as an effective treatment for patients with NTRK fusion-positive locally advanced or metastatic solid tumors or ROS1-positive, metastatic NSCLC.

Applicant (Marketing Authorization Holder)

F. Hoffmann-La Roche Ltd




F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Peter Lindinger



F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Erika Eckel

ЗВІТ
про доклінічні дослідження

1. Назва лікарського засобу (за наявності - номер реєстраційного посвідчення)	РОЗЛІТРЕК® (ROZLYTREK®)
1) тип лікарського засобу, за яким проводилася або планується реєстрація	Лікарський засіб за повним досьє (автономне досьє), інший лікарський засіб, нова діюча речовина згідно пункту 1 (підпункту 1.1) розділу III Порядку наказу МОЗ України від 23 липня 2015 року № 460.
2) Проведені дослідження:	<input checked="" type="checkbox"/> так <input type="checkbox"/> ні якщо ні, обґрунтувати
Примітка: наступні кодові позначення, зазначені в звітах, використовувались для ідентифікації ентректинібу: RO7102122, RXDX-101, G03344900 або NMS-1191372	
2. Фармакологія:	
1) первинна фармакодинаміка	<p>Кіназна інгібуюча активність ентректинібу (RXDX-101) була встановлена за допомогою радіометричного аналізу кінази. Ентректиніб (кодова назва RXDX-01-0177) потенційно інгібував кіназу рецептора тропоміозину (TRK) А, TRKB, TRКС, протоонкогенкіназу ROS 1 (ROS1) та кіназу анапластичної лімфоми (ALK) із показниками IC₅₀ 1,7, 0,1, 0,1, 0,2 та 1,6 нМ відповідно [Звіти № 1087232, 1087233]. Скринінг селективності щодо кіназ продемонстрував, що селективність ентректинібу була обмежена TRKA, TRKB, TRКС, ROS1 та LK [Звіт № 1087233]. Окрім того, основний метаболіт ентректинібу M5 (кодова назва RXDX-01-0158) інгібував TRKA, TRKB, TRКС, ROS1 та ALK із показниками IC₅₀ 2,5, 0,1, 0,2, 0,2 та 1,9 нМ відповідно.</p> <p>Антипроліферативна активність ентректинібу вивчалась у двох масштабних клітинних аналізах та спеціальних дослідженнях життєздатності клітин в окремих лініях – носіях злиття генів NTRK або ROS1. Ентректиніб (NMS-1191372) початково вивчався на предмет антипроліферативної активності щодо панелі 160 клітинних ліній [Звіт № 1087234]. Лініями, що тестувались, переважно були лінії пухлинних клітин, отриманих у людини, та мали різне гістологічне походження, включаючи: 35 лейкозів/лімфом, 27 карцином легень, 24 колоректальні карциноми, 14 карцином молочної залози, 8 аденокарцином нирок, 8 меланом, 8 множинних мієлом, 7 карцином яєчників, 5 гліобластом, 4 аденокарциноми підшлункової залози, 3 карциноми передміхурової залози, 3 аденокарциноми шийки матки, 2 астроцити, 2 остеосаркоми, 2 нейробластоми, 1 карцинома сечового міхура і 1 гліосаркома. Також вивчались 6</p>


 Дітя - Маслова М. В.

клітинних ліній непухлинного походження. Клітини з експоненційним ростом оброблялись NMS-1191372 протягом 72 годин. У кінці цього інкубаційного періоду антипроліферативна активність оцінювалась на основі вмісту АТФ у випробовуваному зразку при порівнянні з контрольними зразками, які обробляли імітаційним контролем. Було виявлено, що NMS-1191372 інгібує проліферацію із середнім показником IC_{50} для панелі на рівні 2,76 мкМ, у діапазоні від 0,02 до 6,05 мкМ, із високою активністю (< 100 нМ) щодо обмеженого числа різновидів клітинних ліній, які включали лінії, які, як відомо, є конститутивними носіями активних форм ALK.

У другому масштабному клітинному аналізі [Звіт № 1090429] ентректиніб та його метаболіт М5 вивчались на предмет антипроліферативної активності в панелі 308 клітинних ліній, які складались із 269 клітинних ліній злоякісних пухлин дорослих людей та 39 клітинних ліній злоякісних пухлин дітей. Антипроліферативна активність ($IC_{50s} < 1$ мкМ) ентректинібу та М5 спостерігалась по відношенню до 16 унікальних клітинних ліній злоякісних пухлин, а також в 5 клітинних лініях, ідентифікованих як дублікати або лінії, отримані з однієї із 16 чутливих ліній.

Серед ідентифікованих чутливих клітинних ліній були 5 унікальних клітинних ліній зі злиттям NTRK, 4 клітинні лінії зі злиттям ROS1 і 5 клітинних ліній із дисрегуляцією ALK, а також клітинна лінія MV-4-11 FLT3-ITD, раніше ідентифікована як клітинна лінія, що відповідає на вплив ентректинібу. Ці дані співпадають із кіназною активністю ентректинібу та М5 з активністю щодо кіназ TRKs, ROS1 та ALK та слабшою активністю щодо FL T3. Спостерігався високий рівень кореляції між показниками IC_{50} для ентректинібу та М5 в усіх тестованих клітинних лініях ($n = 223$ клітинних ліній, коефіцієнт кореляції (r) Пірсона = 0,7762, $p < 0,0001$), а також в лініях із $qIC_{50s} < 1$ мкМ ($n = 20$ клітинних ліній, r Пірсона = 0,8946, $p < 0,0001$). Ці дані демонструють, що метаболіт М5 є еквівалентним ентректинібу в супресії клітинної проліферації. Окрім того ці дані демонструють, що ні ентректиніб, ні метаболіт М5 не демонструють випадкове інгібування клітинного росту в клітинних лініях, що не є носіями злиття генів NTRKs, ROS1 або ALK.

Із метою визначення та порівняння *in vitro* антипроліферативної активності ентректинібу щодо злиття генів NTRK, в Pro-B клітинах Ba/F3 мишей була отримана комплементарна ДНК злиття NTRK за допомогою лентивірусної експресійної системи [Звіт № 1087236]. Клітини Ba/F3, що експресують злиття генів NTRK та ростуть незалежно від інтерлейкіну 3 (ІЛ3) мишей, оброблялись серією розведеного

Доктор Анна Т.В.

ентректинібу та визначались значення IC_{50} . Ентректиніб демонстрував подібну від суб- до одноцифрової наномолярну антипроліферативну активність незалежно від ідентифікаційних характеристик партнерів по злиттю.

Проводились дослідження з вивчення *in vitro* антипроліферативної активності та *in vivo* протипухлинної активності ентректинібу в клітинній лінії недрібноклітинної карциноми легень людини (НДКРЛ), CUTO-3, що містить ген злиття MPRIP-NTRK1 [Звіт № 1087237]. Порівняно з кризотинібом, ентректиніб продемонстрував вищу активність у клітинних тестах, при цьому була продемонстрована IC_{50} у клітинах на рівні 1,6 нМ для ентректинібу порівняно з 153,5 нМ для кризотинібу. В дослідженні ксенотрансплантата *in vivo* ентректиніб добре переносився і пригнічення пухлини було надійним та залежало від дози. Семи групам тварин з імунодефіцитом (10 у групі) було імплантовано клітини CUTO-3 та оброблено наповнювачем (метилцелюлоза 0,5 %, Tween 80 1 % об/об) або 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 мг/кг ентректинібу перорально (РО) один раз на добу (q.d.), загалом 39 обробок. Порівняння об'єму пухлин показало, що групи, які отримують ентректиніб в дозі 3 мг/кг і вище, продемонстрували суттєву інгібіцію порівняно з наповнювачем, і при цьому групи, які отримували ентректиніб в дозі 1 мг/кг або менше не продемонстрували такої активності ($p \leq 0,0001$). Показники IC_{50} і IC_{90} були обчислені за допомогою отриманих даних щодо об'єму пухлини. Було виявлено, що показники IC_{50} і IC_{90} для ентректинібу в клітинних лініях CUTO-3 становили $1,5 \pm 0,2$ мг/кг і $3,5 \pm 1,2$ мг/кг відповідно. Було зроблено висновок, що ентректиніб в дозах ≥ 3 мг/кг демонструє суттєву протипухлинну активність щодо пухлин НДКРЛ CUTO-3 у людини, індукованих геном злиття MPRIP-NTRK1.

У дослідженні PC 17-007 [Звіт №1087247] було продемонстровано, що інгібіція TRK кінази ентректинібом відбувається з селективним впливом на доклінічні моделі індукованих злиттям NTRK злоякісних новоутворень. Були ідентифіковані та охарактеризовані дві клітинні лінії гострого мієлолейкозу (ГМЛ) людини, індуковані геном злиття ETV6-NTRK3 (IMS-M2 і M0-91). Ентректиніб продемонстрував високу активність у клітинному аналізі проліферації, з клітинними показниками IC_{50} на рівні 0,47 нМ для IMS-M2 і 0,65 нМ для M0-91. Фосфорилування білка злиття ETV6-TRKS, а також фосфорилування відомих ефекторів низхідної передачі TRKS, інгібувалось лікуванням ентректинібу залежним від дози способом. Чутливість до ентректинібу залежала від експресії білка злиття ETV6-TRKS. У моделях ксенотрансплантата обробка ентректинібом у клінічно значимих дозах призводила до

Александр Вішнев
Дру-Масон Т.В.

регресу пухлини, що супроводжувалось інгібіцією TRK-опосередкованого шляху передачі сигналу та елімінацією залишкових ракових клітин із кісткового мозку.

Проводились дослідження з метою оцінки *in vitro* антипроліферативної активності ентректинібу та інших наявних інгібіторів ROS1 у клітинній лінії НДКРЛ людини, CUTO-28, що містить ген злиття TPM3-ROS1 [Звіт № 1087687]. Порівняно з церитинібом та кризотинібом ентректиніб продемонстрував вищу активність у клітинному аналізі, із показником клітинної IC₅₀ на рівні 20,1 нМ для ентректинібу порівняно з 36,6 нМ для кризотинібу та 179,6 нМ для церитинібу.

Із метою оцінки клітинної активності ентректинібу та його основного активного метаболіту M5 щодо клітинної лінії колоректального раку (КРР) KM12, що є носієм гену злиття TPM3-NTRK1, були проведені дослідження порівняльної життєздатності клітин [Звіт № 1089907]. Оцінка клітинної активності включала визначення активності в 3-денному аналізі життєздатності клітин, аналіз клітинного циклу та індукцію апоптозу після обробки ентректинібом або M5. Відповідно до даних, отриманих при скринінгу клітин, ентректиніб і метаболіт M5 продемонстрували еквівалентну активність щодо життєздатності клітин із показником IC_{50s} на рівні 2,8 і 2,6 нМ відповідно. Ці дані демонструють, що метаболіт M5 ентректинібу є клітинно-активним метаболітом, експозиція якого може бути значимою для загальної протипухлинної активності ентректинібу.

Із метою оцінки активності ентректинібу *in vitro* та *in vivo* в ROS1-залежній клітинній моделі, ВаF3, ІЛ-3 залежна, про-В мишача клітинна лінія була трансформована білком злиття TEL-ROS1 [Звіт № 1087258]. Ентректиніб потужно інгібував клітинну проліферацію з показником IC₅₀ на рівні 5 нМ, у той час кризотиніб, що вивчався при аналогічних умовах, мав показник IC₅₀ на рівні 180 нМ. Припинення росту, індуковане ентректинібом, припинялось додаванням ІЛ-3, що підтверджує те, що інгібіція клітинної проліферації ентректинібом була специфічно спричинена інгібіцією онкогену ROS1.

Ентректиніб вивчався в панелі моделей ксенотрансплантата солідних та гематологічних пухлин, які представляють різні гістологічні типи, що є носіями злиття TRK або ROS1 із різними партнерами злиття.

Дослідження ефективності з підбору дози проводилось із застосуванням доз у діапазоні від 0,3 до 30 мг/кг з метою оцінки протипухлинної активності ентректинібу в моделі KM12 ксенотрансплантата КРР людини, що має ген злиття TPM3-NTRK1 [Звіт № 1087248]. Загалом препарат добре переносився і інгібіція пухлинного росту (TGI) була надійною та залежною від

Александр Вікторов
Друг-Александр М. В.

дозі. Шести групам тварин з імунодефіцитом (10 на групу) були імплантовані клітини KM12 і оброблені наповнювачем (метилцелюлоза 0,5 %, Tween 80 1 % об/об) або 30, 15, 3, 1,5 і 0,3 мг/кг ентректинібу перорально один раз на добу, загалом 14 обробок. Порівняння об'єму пухлини продемонструвало, що групи, які отримували 15 або 30 мг/кг ентректинібу, мали суттєву інгібіцію ($p \leq 0,05$) порівняно з наповнювачем, при цьому в групах, які отримували 3 мг/кг і меншу дозу ентректинібу, це явище не спостерігалось. Показники IC_{50} і IC_{90} , обчислені на основі даних щодо об'єму пухлини, становили 1,64 мг/кг і 11,64 мг/кг, відповідно, в день 17 та 2,35 мг/кг і 6,23 мг/кг, відповідно, в день 20.

У подальших дослідженнях оцінювалась протипухлинна активність ентректинібу в колоректальній підшкірній моделі пухлини KM12-люциферази (TRPM3-NTRK1) [Звіт № 1090136]. Ціллю цих досліджень було оцінити залежність активності росту підшкірної пухлин зі злиттям генів NTRK від дози ентректинібу при пероральному прийомі. Сукупні дані допомагають продемонструвати, що лікування ентректинібом призводило до залежної від дози протипухлинної ефективності, інгібіції TRK-опосередкованої активності та пропорційної дозі фармакокінетики. У частині ефективності цього дослідження (GNT20180522C) ентректиніб продемонстрував залежну від дози ефективність при застосуванні в дозах менше 5 мг/кг, що призводило до слабшої протипухлинної активності ($< 45\%$ TGI), при цьому дози 5 мг/кг і вище призводили до регресії пухлини ($> 100\%$ TGI). ФД аналіз TRK-опосередкованого шляху продемонстрував, що лікування ентректинібом призводило до модуляції шляху при застосуванні в дозах 5 мг/кг або вище, досягаючи максимальної інгібіції фосфоліпази C гамма 1 (pPLC γ 1), pAKT та рибосомального білка S6 (pS6) в дозах вище 30 мг/кг. Окрім того, ФК лікарського засобу оцінювалась в зразках плазми крові, отриманих під час вивчення прижиттєвої ефективності та компонентів ФД цих досліджень. Ці аналізи продемонстрували, що такі рівні ентректинібу в плазмі крові показували хорошу пропорційність дозі, що добре корелює з інгібіцією шляху, де експозиція $AUC_{24} \geq 20$ мкМ•год відповідає максимальному інгібуванню шляху. Окрім того, згідно з оцінкою, експозиція активного метаболіту M5 у плазмі крові становила приблизно 10 % ентректинібу. Ці дані показують, що ентректиніб демонструє хороший дозозалежний зв'язок ФК/ФД/ефективність у TRK-залежних пухлинних моделях, що ростуть підшкірно.

Дослідження № PC 17-001 [Звіт № 1087243] проводилось із метою оцінки протипухлинної активності ентректинібу в моделі ГМЛ людини, що має злиття ETV6-NTRK3. Чотирьом групам

Тереза Віссел
Dr. T. Visser M.D.

тварин з імунодефіцитом (10 у групі) були імплантовані клітини IMS-M2 і були оброблені наповнювачем (метилцелюлоза 0,5 %, Tween 80 1 % об/об), 3, 10 та 30 мг/кг ентректинібу перорально один раз на добу (загалом 21 обробка). Порівняння об'ємів пухлин показало, що в усіх групах лікування ентректинібом відмічалось зменшення росту пухлин. Загалом ентректиніб добре переносився.

Ентректиніб також вивчався в моделі M0-91 ГМЛ, що є носієм злиття генів ETV6-NTRK3 [Звіт № 1087244]. Це дослідження проводилось із метою оцінки протипухлинної активності ентректинібу в моделі ГМЛ людини, що має злиття ETV6-NTRK3. Чотирьом групам тварин з імунодефіцитом (10 у групі) були імплантовані клітини M0-91 та проводилась обробка наповнювачем, 3, 10 і 30 мг/кг ентректинібу перорально один раз на добу (загалом 18 обробок). Порівняння об'ємів пухлин показало, що в усіх групах лікування ентректинібом відмічалось зменшення росту пухлин. Загалом ентректиніб добре переносився. Ці дані показують, що усі дози ентректинібу мали сильний вплив на пухлинний ріст, призводячи до TGI > 100 % при вимірюваннях в усі дні. Обробка ентректинібом суттєво зменшувала об'єм пухлини порівняно з наповнювачем до дня 18.

Ентректиніб вивчався в моделі ксенотрансплантата раку голови та шиї, отриманого у людини (PDX), CTG-0798, носія злиття генів ETV6-NTRK3 [Звіт № 1087238]. Миші-носії пухлини CTG-0798 отримували ентректиніб у дозах 15 і 60 мг/кг перорально, два рази на добу (BID) протягом 21 дня. Ентректиніб продемонстрував суттєву протипухлинну ефективність при дозуванні 15 і 60 мг/кг у моделі CTG-0798, призводячи до регресії пухлини (146 % і 149 % TGI відповідно). Було зроблено висновок, що ентректиніб у дозі 15 мг/кг і 60 мг/кг має суттєву протипухлинну активність у моделях пухлин голови та шиї людини CTG-0798, коли лікування було розпочате при розмірі пухлини 100–300 мм³.

Подальше дослідження проводилось із метою оцінки доклінічної протипухлинної активності ентректинібу та його комбінації з траметинібом в моделі Champions TumorGraft™ CTG-0798 низького пасажу плоскоклітинного раку голови та шиї в мишей з ослабленим імунітетом. Мишам були імплантовані підшкірно в ліву бокову поверхню фрагменти пухлини моделі CTG-0798 та щоденно (один раз на добу) протягом 57 днів (n = 8) через шлунковий зонд (перорально) вводили наповнювач, ентректиніб 15 мг/кг, траметиніб 1 мг/кг або комбінацію ентректинібу (15 мг/кг) та траметинібу (1 мг/кг). Вплив на ріст пухлини вивчався шляхом визначення відсотка TGI, числа повної регресії (CR), числа часткової регресії (PR) і виживаності без пухлини (TFS). Переносимість оцінювалась за втратою маси

Третьяков Віктор

Третьяков Т.В.

тіла, летальністю та клінічними ознаками пов'язаних із лікуванням небажаних явищ. Лікування ентректинібом (TGI = 116 %, $p < 0,001$), траметинібом (TGI = 63 %, $p < 0,01$) та комбінацією ентректинібу та траметинібу (TGI = 116 %, $p < 0,001$) мало суттєву протипухлинну активність порівняно із застосування наповнювача як контролю в моделі CTG-0798. Група отримання наповнювача як контролю та група лікування траметинібом не досягли PR, CR або TFS. До 119 дня, кінця періоду подальшого спостереження, у групі лікування ентректинібом спостерігались 1 PR і 7 TFS, а у групі комбінованого лікування ентректиніб/траметиніб – 8 TFS. Не спостерігалось суттєвої відмінності в об'ємі пухлини між 3 групами лікування. Ентректиніб, траметиніб та їх комбінація добре переносились у цьому дослідженні.

Це дослідження проводилось із метою оцінки протипухлинної активності ентректинібу в саркомі PDX, що мала злиття TPM3-NTRK1 [Звіт № 1087257]. Загалом препарат добре переносився та інгібіція пухлини була надійною. Двом групам тварин з імунодефіцитом (10 у групі) була імплантована PDX та проводилась обробка наповнювачем або 30 мг/кг ентректинібу перорально один раз на добу (всього 28 обробок). Лікування 30 мг/кг ентректинібу призводило до суттєвої та тривалої регресії пухлини з > 100 % TGI при вимірюванні в усі дні.

Дослідження ефективності з визначенням діапазону доз проводилось з метою вивчення протипухлинної активності ентректинібу в саркомі PDX, в якій було виявлене злиття TPM3-NTRK1 [Звіт № 1087246]. Загалом препарат добре переносився та інгібіція пухлини була надійною і залежала від дози. Семи групам тварин з імунодефіцитом (10 у групі) були імплантовані клітини G002 та проводились обробка наповнювачем або 30, 10, 3, 1, 0,3 і 0,1 мг/кг ентректинібу перорально один раз на добу (всього 20 обробок). Порівняння об'ємів пухлин показало, що у групах отримання 3, 10 або 30 мг/кг ентректинібу відбувалась суттєва інгібіція при порівнянні із наповнювачем, при цьому в групах дозування ентректинібу 0,1, 0,3 і 1 мг/кг це не спостерігалось ($p \leq 0,05$). Показники IC_{50} і IC_{90} були обчислені за допомогою отриманих даних щодо об'єму пухлини. Було виявлено, що показники IC_{50} і IC_{90} для ентректинібу в клітинній лінії G002 становили 2,318 мг/кг і 3,921 мг/кг відповідно. На заключення, ентректиніб у дозах ≥ 3 мг/кг демонстрував суттєву *in vivo* протипухлинну активність щодо PDX G002, моделі, яка як відомо має злиття генів TPM3-NTRK1.

Ентректиніб далі вивчався в моделі CTG-0848 НДКРЛ PDX, що мав злиття CD74-ROS1 [Звіт № 1087260]. Миші-носії пухлини CTG-0848 отримували ентректиніб у дозі 30 і 60 мг/кг перорально два рази на добу протягом 29 днів. Лікування

Тереза В. Сесел
Тереза В. Сесел

ентректинібом добре переносилось і призводило до суттєвої регресії пухлини при застосування ентректинібу в дозі 30 мг/кг (TGI=134 %, $p < 0,001$) і 60 мг/кг (TGI=131 %, $p < 0,001$).

Ентректиніб вивчався в додатковій моделі PDX, позитивного на злиття ROS1, LU-01-0414, початково отриманого за результатами хірургічної резекційної біопсії у пацієнта з НДКРЛ, і для якого було підтверджене злиття SCD4-ROS1 [Звіт № 1087259]. У цій моделі було проведено дослідження ефективності діапазону доз ентректинібу від 1,5 до 45 мг/кг, перорально два рази на добу протягом 21 або 49 днів. Лікування ентректинібом добре переносилось і призводило до залежної від дози інгібіції пухлинного росту. Лікування ентректинібом у дозах 1,5 і 5 мг/кг призводило до затримки росту пухлини (44 % і 70 % TGI відповідно), у той час як дози 15 і 45 мг/кг призводили до стійкої регресії пухлини (111 % і 113 % TGI відповідно).

Для кращого розуміння залежності ефективності від дози ентректинібу при інтракраніальних пухлинах, модель KM12-люциферази (TPM3-NTRK1) колоректального раку була інокульована інтракраніально, та були проведені дослідження ефективності діапазону доз 1, 5, 15 і 60 мг/кг два рази на добу та 10 і 30 мг/кг один раз на добу [Звіт № 1090134]. Без лікування у мишей, яким були інокульовані клітини KM12-люциферази, спостерігався ріст пухлини та загибель через 15–20 днів. Тому ріст пухлини моніторувався шляхом біолюмінесценції та оцінювалась виживаність протягом 28 днів. Лікування ентректинібом добре переносилось і призводило до залежної від дози інгібіції росту інтракраніальної пухлини та покращення виживаності тварин. Дози вище 5 мг/кг два рази на добу або 10 мг/кг один раз на добу призводили до інгібіції росту та прогресування пухлини, однак повна супресія росту пухлини досягались лише при дозуванні 60 мг/кг два рази на добу. Окрім того, усі тварини, які отримували ентректиніб у дозах вище 15 мг/кг два рази на добу або 30 мг/кг один раз на добу, вижили протягом 28-денного вікна дозування порівняно з усіма тваринами у групі отримання наповнювача, які померли від пухлин до 16 дня. ФК лікарського засобу оцінювалась у зразках плазми, отриманих під час оцінки ефективності під час життя, та за компонентами ФД цих досліджень. Ці аналізи продемонстрували рівні ентректинібу в плазмі крові, які мали хорошу пропорційність до дози, що добре корелювала з інгібіцією шляху, де експозиція $AUC_{24} \geq 20$ мкМ•год відповідала максимальному інгібуванню шляху. Окрім того, згідно з оцінкою, експозиція активного метаболіту M5 у плазмі крові становила приблизно 10 % ентректинібу. Ці дані показують, що ентректиніб демонструє хороший дозозалежний зв'язок

*Джерело: Вісник
ДІА - Інформація № 18.*

	<p>ФК/ФД/ефективність у моделі інтракраніального росту TRK-залежної пухлини.</p> <p>Ці дані є однорідними з повторним дослідженням, в якому оцінювався ентректиніб у дозі 60 мг/кг два рази на добу, який продемонстрував повну супресію росту пухлини впродовж вікна дозування [Звіт № 1087694]. При двох густинах інокуляції клітин ентректиніб у дозі 60 мг/кг суттєво підвищував виживаність тварин. Миші у групі отримання наповнювача померли протягом 12 днів після початку лікування, миші у групі отримання ентректинібу вижили протягом до 33 днів. Миші добре переносили сполуку, однак KM12-luc інтракраніальні пухлини можуть спричиняти значну втрату маси тіла в групах отримання наповнювача на пізній стадії.</p> <p>Ентректиніб (G03344900.1-4; GI-17829) вивчався за допомогою профілювання Thermo Fisher Scientific's SelectScreen™ у панелі 293 кіназ при 100 нМ для оцінки відносної селективності молекули [Звіт № 1089804]. У цьому скринінгу застосовувались три платформи скринінгу, включаючи 201 кіназу, які підлягали скринінгу за допомогою платформи Z'-LYTE, 71 кіназу, які підлягали скринінгу за допомогою зв'язуючої платформи LanthaScreen і 21 кіназу, які підлягали скринінгу за допомогою платформи Adapta. Сумарно ці аналізи продемонстрували, що ентректиніб потужно інгібував лише 6 кіназ > 95 % (ALK, ROS1, TXK, TRKA, TRKB і TRKC), 2 кінази > 80 %, (CSF1R і JAK2), 4 кінази > 60 % (ITK, LTK, MuSK і TYK2) і 18 кіназ > 40 % (ARK5, AXL, BTK, BMX, FGFR2, FER, FGR, FLT3, FYN, HPK1, IGF1R, IRR, JAK1, PEAK1, RET, SRC_N1, TNK1 і YES). Решта 256 кіназ при скринінгу кіному продемонструвала мінімальну інгібіцію ентректинібом, демонструючи відносну селективність порівняно з більшістю кіному. Ці результати співпадають із попередніми дослідженнями інгібіції кінази, що продемонстрували потужну інгібіцію TRKA, TRKB, TRKC, ROS1 та ALK. Ці дані також співпадають із селективною інгібіцією клітинних ліній злоякісних новоутворень, дисрегульованих шляхом злиття генів NTRK, ROS1 або ALK, однак не широко серед інших клітинних ліній раку або нормальних клітинних ліній.</p>
2) вторинна фармакодинаміка	<p>Ентректиніб аналізувався в панелі 293 кіназ для оцінки відносної селективності молекули по відношенню до дуже різноманітного набору протеїнкіназ, а також серин-треонінових підродин. Ентректиніб потужно інгібував лише ALK, ROS1, TXK, TRKA, TRKB і TRKC >95 %, демонструючи відносну селективність порівняно з більшою частиною кіному [1089804]. Ці результати співпадають із попередніми дослідженнями інгібіції кіназ, які продемонстрували потужну інгібіцію TRKA, TRKB, TRKC, ROS1 і ALK. Ці дані також співпадають із селективною інгібіцією клітинних ліній злоякісних</p>

Теректор Віктор
Доктор - Масюк Т.В.

	<p>новоутворень із дисрегуляцією у вигляді злиття генів NTRK, ROS1 або ALK, однак не широко серед інших клітинних ліній раку або нормальних клітинних ліній.</p> <p>У скринінгових аналізах <i>in vitro</i> вивчався вплив однієї концентрації (10 М) ентректинібу та його основного метаболіту М5 на зв'язування з лігандом 89 мішеней (рецептори, іонні канали та транспортери [1089509, 1089510, 1089511, 1089512]. Результати цих аналізів показують суттєве зв'язування ($\geq 50\%$) при концентраціях, що суттєво перевищують клінічно значиму вільну експозицію в плазмі (вільна $C_{\max,ss} \sim 0,007$ мкМ) для вихідної речовини та/або М5 (вільна $C_{\max} \sim 0,004$ мкМ) в ~ 1400- і 2500-раз, відповідно, проти декількох мішеней ($\alpha 1A$, $2A$, $2C$; $CB2$; $D1$, $D2S$, $D3$, $D5$; (DOP); GR; sigma2; OX; H1; H2; kappa; M1, 4, 5; [MOP], PPAR, 5-HT1B, $2A$, $2B$, $5a$, 6, 7; sst4, COX2; L-типу Ca^{2+} канали [дигідропіридин, верапаміл, дилтіазем, фенілакіламін і бензотіазепінові ділянки], калієві канали hERG і натрієвий канал (ділянка 2); норадреналін, серотонін, дофамін, 5-HT і транспортери холіну).</p>
3) фармакологія безпеки	<p>Серцево-судинна система</p> <p>Ентректиніб вивчався на предмет впливу на струм калієвих каналів hERG за допомогою стабільно трансфікованих клітин HEK293 в умовах фіксації потенціалу [1087271]. Залежна від концентрації інгібіція каналів IK_r виникала при усіх концентраціях наступним чином: 16% ($0,05$ мкМ), 45% ($0,5$ мкМ), 65% ($1,5$ мкМ) і 90% (15 мкМ). Розрахований показник IC_{50} $0,6$ мкМ свідчить про потенційне спричинення подовження QT при 86-кратному збільшенні порівняно з незв'язаним середнім $C_{\max,ss}$ ($0,007$ мкМ) у людини. Ефекти метаболіту М5, основного циркулюючого метаболіту в людини та собаки, на hERG, експресовані у клітинах ссавців, вивчалися при кімнатній температурі за допомогою QPatch HT® (Sophion Bioscience A/S, Данія), автоматичної паралельної системи фіксації потенціалу [1087275]. М5 вивчався при $0,3$, 1, 3 і 10 мкМ ($n=4$). Обчислений показник IC_{50} становив близько $10,4$ мкМ. Однак обмеження розчинності при 3 і 10 мкМ могли призвести до недооцінки інгібіції hERG.</p> <p>У дослідженні, що не проводилось за стандартами належної лабораторної практики (GLP) 0231-2007 [Звіт № 1087272] 3 самки собак, виміряні за допомогою телеметричного обладнання в свідомому стані, одноразово перорально отримували наповнювач (сесія 1) або 300 мг/кг ентректинібу (сесія 2) з інтервалом 7 днів [1087272]. NMS-1191372 не мав якого-небудь впливу на частоту серцевих скорочень та інтервали ЕКГ, включаючи QT. На підставі результатів доза 300 мг/кг була визначена як доза, яка не спричиняє негативної реакції (NOEL).</p>

Сергій Віталійович
 Д.А. - Максим Д.В.

У дослідженні телеметрії, виконаному відповідно до вимог GLP, собаки (2/стать), виміряні за допомогою телеметричного обладнання, отримували зростаючу дозу ентректинібу 0, 60 і 120 мг/кг (період вимивання 1 тиждень) [1087273]. Одноразова доза була обрана на основі результатів 4-тижневого дослідження токсичності у разі повторних введень [1087335], де оцінка ЕКГ, що проводилась на 11 день у групі дозування 120 мг/кг/добу, виявила подовження QTcF. У дослідженні телеметрії, виконаному відповідно до вимог GLP, параметри серцево-судинної системи та температура тіла повідомлялись, починаючи з 60 хвилин перед лікуванням до 7 годин після лікування.

Ентректиніб жодним чином не впливав на системний артеріальний тиск, частоту серцевих скорочень, інтервали ЕКГ (включаючи QT та QTc) або температуру тіла в будь-якій досліджуваній дозі; таким чином, NOEL для параметрів серцево-судинної системи та температури тіла становила 120 мг/кг, із розрахованою C_{max} у діапазоні від 3,1 до 7,0 мкМ на підставі даних експозиції в день 1, отриманих у 4-тижневому дослідженні [1087335].

В умовах цього експерименту NOEL для NMS-1191372 щодо параметрів серцево-судинної системи та температури тіла у собак породи бігль становила 120 мг/кг.

Пошукове дослідження проводилось з метою вивчення кореляції час/доза між клінічними ознаками з боку ЦНС та подовження QT, що спостерігались в 4-тижневому 2 x 2 інтермітуючому дослідженні із системною експозицією ентректинібу [1087338]. Ентректиніб застосовували перорально один раз на добу самкам собак (4/групу) у дозі 80 або 120 мг/кг/добу протягом 7 днів із наступним 11-денним періодом відновлення. Помірне збільшення інтервалів QT та QTcF (порівняно з даними до тестування) спостерігалось у фазу відновлення в дні 8 і 9 у 1 тварини при дозуванні 120 мг/кг/добу (остання доза в день 7, C_{max} =7,08 мкМ). До дня 11 вплив на інтервал QT та/або QTcF більше не спостерігався.

Також див. розділ про повторне дозування щодо впливу на подовження QT після повторного дозування в дослідженнях GLP.

Дихальна система

У дослідженні GLP групам із 8 самок щурів давали одноразову пероральну дозу 0, 50, 100 або 200 мг/кг ентректинібу [1087274]. Параметри з боку дихальної системи, включаючи дихальний об'єм, хвилинний об'єм, частоту дихальних рухів, максимальну швидкість вдиху, максимальну швидкість видиху, час вдиху, час

Александр Бірнелл
Dr. Alex Birnell T.V.

видиху, час релаксації та індекс PenH (індекс бронхоспазму), були отримані під час плетизмографії усього тіла. Не спостерігались значимі ефекти при будь-якій застосованій дозі; NOEL для функції дихання становила 200 мг/кг.

Центральна нервова система

Модифікований загальний поведінковий тест Ірвіна та оцінка температури тіла були включені в дні 1 і 14 дозування під час першого 2-тижневого періоду лікування 4-тижневого GLP 2×2 інтермітуючого дослідження токсичності у щурів при повторному дозуванні [Звіт № 1087346]. Групи з 5 самок щурів отримували ентректиніб перорально по 0, 50, 100 або 200 мг/кг/добу. Не спостерігалось змін у загальній поведінці в день 1 прийому, однак після 14 днів повторного дозування в усіх тварин у групі дозування 200 мг/кг/добу спостерігалась аномальна хода та очевидне почервоніння протягом 3 годин після дозування. Відповідне середнє значення C_{max} при дозуванні 200 мг/кг/добу становило 4,6 мкМ в день 1 і 9,0 мкМ в день 42 (день 14 другого 2-тижневого періоду лікування). Не спостерігалось значимої змін температури тіла в будь-якій групі дозування. В умовах цього дослідження NOEL для загальної поведінки та температури тіла становила 100 і 200 мг/кг/добу відповідно.

Пошукове 7-денне дослідження повторного дозування у собак проводилось із метою вивчення кореляції між час/доза та клінічними ознаками з боку ЦНС і подовженням QT, що спостерігались в 4-тижневому 2 x 2 інтермітуючому дослідженні із системною експозицією ентректинібу [Звіт № 1087338]. Ентректиніб застосовували перорально один раз на добу самкам собак (4/групу) в дозі 80 або 120 мг/кг/добу протягом 7 днів з наступним 11-денним періодом відновлення. Небажані явища з боку ЦНС спостерігались у 2 із 4 тварин у групі дозування 120 мг/кг/добу. Тремор, гіпоактивність, похитування та незначна або помірна дискоординація передніх та задніх кінцівок спостерігались у 1 тварини в період з 7 по 12 день (індивідуальна C_{max} : 7,08 мкМ, AUC: 144 мкМ•год в день 7). У тварини з меншою експозицією лише незначна або помірна дискоординація задніх кінцівок спостерігалась у дні 10 і 11, та незначне похитування спостерігались у день 10 (індивідуальна C_{max} : 4,23 мкМ, AUC₀₋₂₄: 92,7 мкМ•год у кінці періоду лікування).

Від незначних до виражених залежні від дози ознаки шлунково-кишкової токсичності, включаючи м'який стул та діарею (при обох рівнях дозування) та блювання (лише при дозуванні 120 мг/кг) спостерігались в усіх тварин (більш тяжкі та з вищою частотою у тварин із дозуванням 120 мг/кг із ознаками

Александр Віршич
Директор - Аналіз Т.В.

	<p>з боку ЦНС) та розрішилась протягом 2–3 днів без дозування. Від мінімального до дещо прогресуючого зниження маси тіла спостерігалось у всіх тварин без зв'язку із дозуванням. У 2 тварин у групі дозування 120 мг/кг/добу із небажаними явищами з боку ЦНС спостерігалось від слабкого до вираженого зменшення споживання їжі.</p> <p>Додаткову інформацію щодо впливу ентректинібу на ЦНС див. у розділі повторного дозування.</p>
4) фармакодинамічні взаємодії	Дослідження фармакодинамічної взаємодії з іншими лікарськими засобами не проводились.
3. Фармакокінетика:	
1) аналітичні методики та звіти щодо їх валідації	<p>З метою визначення концентрації ентректинібу та M5 у плазмі крові щурів та собак у всіх дослідженнях GLP були застосовані валідовані біоаналітичні методики рідинної хроматографії з тандемною мас-спектрометрією (LC-MS/MS) [Звіти № 1087313, 1087314, 1087315, 1087318, 1087319, 1087320, 1087321]. Методики LC-MS/MS, що застосовувались в не-GLP доклінічних дослідженнях були валідовані або кваліфіковані [Звіт № 1087269].</p> <p>Також були розроблені невалідовані LC-MS/MS методики, які використовувались для аналізу зразків плазми та головного мозку під час початкових чи пошукових ФК досліджень у мишей, щурів і собак. Окрім того, визначалися рівні радіоактивності у зразках крові, плазмі, сечі та фекалій із досліджень балансу маси у щурів та собак. Застосовані методики коротко описані в звітах досліджень.</p>
2) всмоктування	<p><u>Всмоктування та фармакокінетика</u></p> <p>Ентректиніб швидко всмоктувався після одноразового перорального прийому, із середнім часом досягнення максимальної концентрації (T_{max}) приблизно через 2–3 години після дозування. Абсолютна пероральна біодоступність ентректинібу варіювала від 31 до 76 % у різних ФК дослідженнях у тваринних моделях [Звіти № 1087276, 1087277, 1087278, 1087301, 1087302]. 3- або 6-кратне збільшення дози призводило до збільшення C_{max} і середньої $AUC_{0-\infty}$, що свідчить про пропорційне або дещо більше пропорційного збільшення концентрації NMS-1191372 при дозуванні [Звіти № 1087277, 1087278].</p> <p>Після одноразового внутрішньовенного (в/в) введення ентректинібу в дозі 10 мг/кг мишам, щурам і собакам ентректиніб продемонстрував низький або помірний кліренс плазми та великий об'єм розподілу в рівноважному стані (V_{ss}). Середній термінальний $t_{1/2}$ становив приблизно 3,6, 3,5 і 11,9 години у мишей, щурів та собак відповідно.</p>

Александр Вітальєв
В.В. - Мельник Т.В.

	<p>Після повторного щоденного перорального дозування ентректинібу у мишей, щурів та собак системна експозиція ентректинібу збільшувалась приблизно пропорційно дозі при фармакологічно значимому діапазоні дозування. Після прийому п'яти щоденних пероральних доз 29,2, 58,4 і 87,6 мг/кг у мишей, ентректиніб виводився із системного кровообігу із середніми значеннями $t_{1/2}$ приблизно 4,3, 5,3 і 6,5 години відповідно. Середня T_{max} ентректинібу варіювала від 1 до 4 годин. [Звіт № 1087310]. Фармакокінетика ентректинібу у щурів та собак вивчалась у ряді досліджень токсичності повторного дозування.</p> <p>Експозиція M5 визначалась у деяких ФК дослідження [Звіти № 1087301, 1087302] і співвідношення AUC метаболіт-до-вихідної речовини становило $\sim 0,05$ у щурів та до ~ 2 у собак.</p> <p>В умовах дослідження 17IGNYP2R2 (SR-17-012) [Звіт № 1087481] ентректиніб не може бути класифікований як високопроникний, і його середня ефективна проникність від апікальної до базолатеральної (А-до-В) (Papp) була меншою ніж для референтної сполуки міноксидилу з високою проникністю при супутньому застосуванні, при відсутності чи присутності циклоспорину А (CsA), інгібітору транспортерів лікарських засобів. При 0,1 мкМ проникність ентректинібу (Papp [А-до-В] у присутності циклоспорину А: $1,07 \pm 0,11$ або $3,72 \pm 1,36 \times 10^{-6}$ см/сек порівняно з проникністю міноксидилу (Papp [А-до-В]: $5,25 \pm 0,499 \times 10^{-6}$ см/сек). Ентректиніб проявляв коефіцієнт ефлюксу на рівні 4,22 при відсутності циклоспорину А, який зменшувався до 0,808 у присутності циклоспорину А.</p> <p>Одне дослідження [Звіт № 1087692] проводилось із метою порівняння профілю фармакокінетики (ФК) після перорального прийому двох різних серій RXDX-101 (лікарська форма суспензія та лікарська форма розчин). Було зроблено висновок, що RXDX-101 швидко абсорбувався в самців собак породи бігль після перорального дозування. Порівняно із суспензіями, застосування лікарської форми розчин призводило до суттєвого зниження експозиції RXDX-101 у собак.</p> <p>Експозиція ентректинібу та M5 у плазмі крові також вивчалась у 13-тиневому дослідженні ювенільної токсичності у щурів після перорального щоденного дозування ентректинібу під час постнатального дня (PND) 7 і PND 97 [Звіт № 1087245]. Виявилось, що експозиція зростала приблизно пропорційно дозі при діапазоні доз, що вивчались, у PND 7 і помірно зменшувалась на PND 97 для ентректинібу та M5, що відображало збільшення кліренсу в дорослому віці. Відношення AUC M5-до-вихідної речовини було подібним до такого, що спостерігалось у дорослих щурів.</p>
3) розподіл	Зв'язування з білками плазми крові та розподіл у клітинах крові

Тереза Вітніс
Анастасія М.В. Дідух

In vitro зв'язування з білками плазми крові оцінювалось за допомогою рівноважного діалізу. Зв'язування ентректинібу (RO7102122, NMS-1191372) та метаболіту М5 (RO7278378) із білками визначалось у плазмі крові людини та у плазмі крові видів тварин, які використовувались у доклінічних дослідженнях (голі безтимусні миші, щурі, собаки та мавпи), у середовищі гепатоцитів та в різних концентраціях мікросом печінки людини. Було виявлено, що ентректиніб і М5 у значній мірі зв'язуються з білками плазми *in vitro* в усіх досліджуваних видів, включаючи людину (фракція зв'язана > 99 %) без очевидної залежності від концентрації [Звіти № 1087282, 1088992, 1087285]. Не спостерігалась виражена відмінність у зв'язуванні з білками плазми між різними видами.

Незв'язані фракції ентректинібу також визначались у водних розчинах людського сироваткового альбуміну (HSA) при 45 г/л і в α 1-кислотному глікопротеїні (AGP) при 0,7 г/л [Звіт № 1088992]. Незв'язані фракції становили $1,3 \pm 0,1$ %, $1,8 \pm 0,6$ % і $0,3 \pm <0,1$ % в HSA, AGP та суміші HSA/AGP відповідно. Цей результат свідчить, що ентректиніб має подібне високе зв'язування із HSA та AGP, і обидва разом забезпечують подібні показники зв'язування.

Розподіл в плазмі/крові вихідної речовини та М5 оцінювався в крові здорових людей, щурів породи Вістар та C57bl/6j мишей у випробовуваній концентрації 3 мкМ [Звіт № 1088992]. Ентректиніб та М5 продемонстрували розподіл у клітини крові зі співвідношенням розподілу кров/плазма на рівні 1,3 і 1,0, відповідно, у крові людини *in vitro*.

Розподіл у тканинах

Після одноразового перорального прийому радіоізотопно-міченого ентректинібу в дозі 20 мг/кг розподіл радіоактивності в тканинах вивчався методом кількісної автографії всього тіла (QWBA) і продемонстрував подібні результати у самців щурів лінії Спрег-Дулі (альбіноси) і щурів лінії Лонг-Еванс (пігментовані), у яких пов'язана з лікарським засобом радіоактивність була широко розповсюдженою [Звіт № 1087284]. Концентрації радіоактивності в тканинах повільно знижались після досягнення середнього рівня C_{max} , що становить приблизно половину оцінюваної залишкової радіоактивності в тканинах протягом 72 годин після дозування. У пігментованих щурів було виявлене зв'язування ентректиніб-пов'язаної радіоактивності з тканинами ока, що містять меланін. Загальна радіоактивність у тканинах ЦНС, захищених гематоенцефалічним бар'єром (ГЕБ), була менше межі виявлення (179 нг еквіваленту [^{14}C]ентректинібу у грамі, 320 нМ).

Проникнення в головний мозок у мишей, щурів та собак

Терешко В. В.
Док. - Масен Т. В.

	<p>Після перорального прийому одноразової дози ентректинібу 20 мг/кг у щурів ентректиніб та M5 були виявлені в гомогенатах головного мозку, при цьому C_{max} у головному мозку становила 151 нМ і 8,43 нМ, відповідно, із відношенням AUC головний мозок/плазма крові на рівні 0,219 і 0,315, відповідно [Звіт № 1087283]. Вище відношення AUC головний мозок/плазма крові ніж C_{max} свідчить про триваліший період напіввиведення M5 із головного мозку.</p> <p>Ентректиніб продемонстрував дуже сильний залежний від часу вплив на зв'язування з полярними ліпідами головного мозку в аналізі зв'язування з ліпідною мембраною (LIMBA) [Звіт № 1090266]. Через 45 хвилин незв'язана фракція становить > 44 %, у той час як незв'язана фракція через 18 годин інкубації становить лише 0,8 %. Цей сильний залежний від часу ефект необхідно вивчати далі. Незв'язана фракція через 18 годин, скоригована на лізосомальне захоплення, становила 0,41 %.</p> <p>Дослідження в/в інфузії у щурів проводилось із метою визначення концентрації ентректинібу в головному мозку та спинномозковій рідині (CSF) по відношенню до концентрації в плазмі крові при ймовірно рівноважному стані, а також із метою зрозуміти відхилення в penetрації в головний мозок після введення одноразової дози (відношення головний мозок/плазма крові на рівні ~0,2) і множинних доз (відношення головний мозок/плазма крові на рівні 0,6–1,5) [Звіт № 1090366]. Концентрація ентректинібу в головному мозку/плазмі крові на рівні 0,6 досягала при концентрації в плазмі крові 1,4 мкМ після 6-годинної інфузії ентректинібу щурам, навіть рівноважний стан все ще не був досягнутий. Концентрації в спинномозковій рідині та розраховані вільні концентрації в головному мозку становили близько 1–3 нМ, що охоплює цільову IC_{50s} для TRKs і ROS1.</p>
4) метаболізм	<p>Метаболізм ентректинібу вивчався <i>in vitro</i> в гепатоцитах, мікросомах печінки, CYP людини, що експресують комплементарну ДНК, рекомбінантній UDP-глюкуронозилтрансферазі (UGTs) людини та <i>in vivo</i> у щурів і собак, а також у дослідженні ADME у людини [Звіт № 1090091].</p> <p>Ентректиніб продемонстрував помірний метаболізм в інкубації мікросом печінки та гепатоцитах людини [Звіти № 1087479, 1087704, 1090424, 1087298]. Основні метаболіти, що спостерігались <i>in vivo</i>, були утворені шляхом оксидації та N-деметилування ентректинібу та N-глюкуронізації [Звіт № 1087483]. Найбільш значимим основним циркулюючим метаболітом у плазмі крові людини становив M5, утворений шляхом деметилування, та M11, N-кон'югат глюкуроніду ентректинібу. Інші окисні метаболіти відіграють незначну роль у плазмі крові <i>in vivo</i> [Звіти № 1087296, 1087297]. Дослідження в</p>

Трешинко Віктор
 Директор — Ентректинібу П.В.

	<p>довгостроковій культурі гепатоцитів людини показало, що M5 характеризувався приблизно вдвічі повільнішим метаболізмом ніж ентректиніб [Звіт № 1090334].</p> <p>У щурів M5 та M12 були двома найпоширенішими метаболітами, виявленими <i>in vivo</i>. M12 вірогідно є специфічним для щурів N-кон'югатом глюкуроніду ентректинібу, що утворюється в кишечнику, оскільки він виявлявся в плазмі крові після перорального прийому, однак не після в/в введення або <i>in vitro</i> в гепатоцитах [Звіт № 1087296]. У собак M5 був основним циркулюючим метаболітом [Звіт № 1087297].</p> <p>З метою ідентифікації <i>in vitro</i> основного метаболізуючого ферменту у людини, які відповідають за метаболізм ентректинібу (випробовувана речовина NMS-01191372), була виконана інкубація із CYP ферментами людини, що експресують комплементарну ДНК (CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 і CYP3A5) та інкубація із мікосомами печінки людини [Звіт № 1087482]. На підставі отриманого показника кліренсу можна зробити висновок, що CYP3A4 був основним ферментом, відповідальним за метаболізм NMS-01191372. Окрім того, на підставі відсотку залишкових даних, CYP2C19 (79 %), CYP2C9 (85 %), CYP2C8 (86 %) та CYP1A1 (90 %) задіяні в метаболізмі NMS-01191372.</p>
5) виведення	<p>Спеціальні дослідження виведення не проводились. Характер процесу виведення оцінювався в дослідженнях у щурів [Звіт № 1087302] та собак [Звіт № 1087301] після прийому одноразової дози [¹⁴C]ентректинібу. В щурів і собак виведення з калом було основним шляхом виведення [¹⁴C]ентректиніб-пов'язаної радіоактивності після перорального або в/в застосування.</p>
6) фармакокінетичні взаємодії (доклінічні)	<p><u><i>In vitro</i> інгібіція ферментів CYP людини ентректинібом та метаболітом M5</u></p> <p>У попередніх дослідженнях <i>in vitro</i> ентректиніб та M5 демонстрували інгібуючий потенціал щодо CYP3A4/5, CYP2D6, та CYP2C8/9 [Звіти № 1087287, 1087289, 1089383]. Ентректиніб (RO7102122) інгібував активність CYP3A4 із показником IC₅₀ на рівні 2,04 мкМ [Звіт № 1089383]. Показники IC₅₀ для M5 (RXDX-101-M5) для прямої інгібіції CYP2B6, CYP2C8, CYP2D6 та CYP3A4/5 становили 17, 4,9, 21, 15 і 12 мкМ відповідно [Звіт № 1087289].</p> <p>Метою дослідження 0370-2013 [Звіт № 1087295] було вивчити <i>in vitro</i> потенціал залежної від часу інгібіції (TDI) ентректинібу (NMS-1191372) по відношенню до основних ізоформ цитохрому P450 (CYP450) у людини: CYP1A2, CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 та CYP2D6. Випробовувана речовина при концентрації 50 мкМ продемонструвала низький потенційний ризик щодо TDI, з активністю значення рівня втрати близьким до</p>

Тереза Вітман
 Тереза Вітман Т.В.

фіксованого порогового значення (25 %) лише для CYP2B6 (23,5 %). Виявилось, що ентректиніб (RXDX-101) спричиняє незначну або не спричиняє пряму або залежну від часу інгібіцію CYP2B6 [Звіт № 1087300].

In vitro індукція ферментів CYP людини ентректинібом та метаболітом M5

Ентректиніб демонстрував потенціал щодо індукції CYP3A4/5, CYP1A2 або CYP2C19 *in vitro*. Випробовувана речовина NMS 1191372 була зданою суттєво впливати на експресію іРНК CYP1A2 (у 7 раз при 10 мкМ) і CYP3A4 (у 2 рази та 29 раз при 1 мкМ та 10 мкМ відповідно), при цьому демонструючи будь-які суттєві ефекти щодо CYP2B6 [Звіт № 1087293]. Обробка культивованих гепатоцитів людини за допомогою до 10 мкМ ентректинібу (RXDX-101) призводила до залежного від концентрації збільшення рівня експресії іРНК CYP2C8, CYP2C9 та CYP3A4. При 10 мкМ середній відсоток позитивного контролю для збільшення рівня іРНК CYP2C8, CYP2C9 та CYP3A4 за допомогою RXDX-101 становив 90,2, 109 та 47,9 % відповідно [Звіт № 1087299].

Потенціал M5 (RXDX-101-M5) до індукції щодо експресії або активності ферментів цитохрому P450 (CYP) вивчався в трьох культурах первинних кріоконсервованих гепатоцитів людини [Звіт № 1087288]. Обробка культивованих гепатоцитів людини за допомогою 10 мкМ RXDX-101-M5 не призводила до індукції ферментативної активності CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4/5 або рівнів іРНК CYP1A2. Однак, обробка культивованих гепатоцитів людини за допомогою 10 мкМ RXDX-101-M5 призводила до індукції переважно залежного від концентрації збільшення рівнів експресії іРНК CYP2B6 та CYP3A4. При 10 мкМ середній відсоток позитивного контролю для збільшення рівня іРНК в CYP2B6 та CYP3A4 становив 26,5 і 16,5 % відповідно.

Транспортер-опосередкована взаємодія з ентректинібу та метаболіту M5 *in vitro* з іншими лікарськими засобами

Ентректиніб є слабким субстратом глікопротеїну проникнення P-гр у гризунів та людини, що має незначний вплив на рівень ВВВ для ентректинібу [Звіт № 1088452], і при цьому було показано, що M5 є субстратом P-гр та білка резистентності раку молочної залози (BCRP) *in vitro* [Звіт № 1087292].

In vitro дослідження транспортерів свідчать про потенційний інгібуючий ефект ентректинібу та M5 щодо P-гр, BCRP, поліпептиду-переносника органічних аніонів (OATP) 1B1 та MATE1. У присутності ентректинібу (RXDX-101), P-гр, BCRP та OATP1B1 інгібувались із показником IC₅₀ на рівні 1,33, 3,02 і 6,46 мкМ відповідно. OATP1B3, транспортер органічних аніонів

Андрій Віталійович
Др. мед. наук Т. В.

	<p>(OAT) 1 та OAT3 не інгібувались більше ніж на 50 % у присутності до 30 мкМ RXDX-101 [Звіт № 1087291].</p> <p>Спостерігалась недостатня інгібіція транспортер органічних катіонів (ОСТ) 1 ентректинібом для встановлення показника IC_{50}, тому значення IC_{50} перевищило 30 мкМ для ОСТ1. Для МАТЕ1 максимальна спостережувана інгібіція становила 88,4 %. IC_{50} для ентректинібу була встановлена на рівні 1,10 мкМ. Для МАТЕ2-К максимальна спостережувана інгібіція становила 57,5 %, що є даними визначення лише в єдиний момент часу, що демонструють інгібіцію вище 50 %, тому IC_{50} неможливо визначити точно, однак показник IC_{50} був визначений на рівні 19,4 мкМ. Для експортуючої помпи жовчних кислот (BSEP) максимальна спостережувана інгібіція становила 84,9 %; показник IC_{50} був встановлений на рівні 13,3 мкМ [Звіт № 1087486].</p> <p>Щодо M5 (RXDX-101-M5) для OAT1, OAT3, OAT1, OAT2, OATP1B1, OATP1B3 та BSEP спостерігалась недостатня інгібіція для встановлення показника IC_{50}, тому показник IC_{50} становить вище 30 мкМ для кожного з цих транспортерів. Для МАТЕ1 та МАТЕ2-К максимальна спостережувана інгібіція становила 96,9 % і 90,3 % відповідно. Показники IC_{50} були встановлені на рівні 0,642 мкМ і 3,14 мкМ відповідно. Для BCRP та P-гр максимальна спостережувана інгібіція становила 80,8 % і 84,6 % відповідно. Показники IC_{50} були встановлені на рівні 8,35 мкМ і 10,1 мкМ відповідно [Звіт № 1087486].</p> <p>У дослідженні 30222 [Звіт № 1090527] ентректиніб (RO7102122) був охарактеризований на предмет його інгібуючого потенціалу щодо OATP1B1 із маркерними субстратами пітавастатином та розувастатином. Отримані результати виявили, що RO7102122 інгібує OATP1B1 із показником IC_{50} на рівні 3,89 мкМ та 4,22 мкМ при застосуванні пітавастатину та розувастатину відповідно.</p>
7) інші фармакокінетичні дослідження	<p>Інші дослідження, що проводились під час відкриття та ранньої стадії розробки з метою отримання пошукової інформації щодо подальшого спостереження досліджень, включають оцінку ФК у собак за допомогою 2 поліморфних форм ентректинібу [Звіт № 1087279], ФК ентректинібу в собак після їжі та натще [Звіти № 1087280, 1087281], дослідження метаболічного профілювання із застосуванням ВЕРХ разом із УФ та мас-спектрометрією з високим розрішенням (HRMS) у плазмі крові собак після перорального введення ентректинібу [Звіт № 1087484], вивчення ФК ентректинібу у голих мишей [Звіт № 1087303] та в різних моделях мишей-носіїв пухлин [Звіти № 1087304, 1087306, 1087307, 1087312].</p>
4. Токсикологія:	

Тетяна Віссюк
Т.В. - Масюк Т.В.

1) токсичність у разі одноразового введення	<p>Однодозове, пероральне не-GLP дослідження токсичності ентректинібу проводилось у щурів лінії Спрег-Доулі [1087336] та одного собаки породи бігль [1087337]. У щурів (n=5/стать/групу) дози 60, 120 та 240 мг/кг не спричиняли яких-небудь клінічних ознак [1087336]. Клінічні патологічні зміни включали збільшення числа тромбоцитів при дозуванні 240 мг/кг і збільшення рівнів фосфору та загального білірубину у самок при дозуванні 240 мг/кг.</p> <p>Зменшення екстремедулярного гемопоезу також спостерігалось у селезінці самців щурів при дозуванні 240 мг/кг. Максимальною переносимою дозою вважалась доза ≥ 240 мг/кг .</p> <p>У собаки (n=1), який отримав одноразову дозу 300 мг/кг не спостерігались клінічні ознаки чи зміни ЕКГ [1087337]. Спостерігалось мінімальне збільшення лактатдегідрогенази та креатинкінази. Максимальною переносимою дозою вважалась доза ≥ 300 мг/кг.</p> <p>Ентректиніб добре переносився в дозах до найвищої у щурів та собак без небажаних знахідок.</p>
2) токсичність у разі повторних введень	<p>Дослідження токсичності у разі повторних введень включали 14-денне пошукове дослідження у мишей, 14-денне дослідження з пошуку діапазону дози та 4-тижневе (інтермітуюче та щоденне дозування) та 13-тижневе дослідження у щурів лінії Спрег-Доулі та собак породи бігль. Оцінка відновлення була включена в усі дослідження у щурів та собак. Обстеження включали: клінічні спостереження, масу тіла, споживання їжі, офтальмологічне обстеження, клінічну лабораторну діагностику (біохімічний аналіз сироватки, гематологія, параметри коагуляції та загальний аналіз сечі), макроскопічні патологічні зміни, вага органів, гістопатологічні обстеження та аналіз токсикокінетики (ТК), окрім випадків, коли зазначено. Додаткові обстеження включали ЕКГ у дослідженнях у щурів та модифікований тест Ірвіна в 4-тижневому дослідженні 2×2 інтермітуючого дозування у щурів.</p> <p>Ентректиніб був у формі випуску в 0,5 % (маса/об) метилцелюлози в деіонізованій воді чи зворотньоосмотичній воді та давався перорально мишам, щурам або собакам до об'єму 10 мл/кг. Контрольні тварини отримували 0,5 % (маса/об) метилцелюлози.</p> <p>У 14-денному пошуковому дослідженні у мишей ентректиніб в дозі 0, 120 або 240 мг/кг/добу застосовували перорально один раз на добу CD-1 самкам мишей [Звіт № 1087345]. Смертність не спостерігалась. В однієї тварини у групі дозування 240 мг/кг/добу спостерігалось транзиторне незначне зменшення активності в дні 3 і 4. Спостерігалось від мінімального до незначного збільшення рівня креатиніну та сечовини, натрію, хлоридів та калію в сироватці крові, а також від мінімального до незначного зменшення рівнів амілази та ліпази, загального</p>

Терешко Віктор
В. В. Мясной Т. В.

холестерину та тригліцеридів у сироватці крові при дозуванні 240 мг/кг/добу. Не були ідентифіковані пов'язані із випробовуваною речовиною зміни під час проведення обмеженого гістопатологічного обстеження у тварин, які отримували високі дози (печінка, підшлункова залоза, селезінка, тимус, брижові лімфатичні вузли, стегнова кістка з кістковим мозком, шлунок, тонка кишка, товста кишка). Рівень відсутності спостережуваних небажаних ефектів (NOAEL) для ентректинібу становив 240 мг/кг/добу.

У 14-денному дослідженні з пошуку діапазону доз щурі (З/стать/групу) отримували 0, 100, 200 або 400 мг/кг/добу ентректинібу перорально протягом 14 послідовних днів із наступним 1-тижневим періодом відновлення [1087347].

Три додаткові тварини/стать/групу застосовувались із метою оцінки токсикокінетики та зворотності. Один самець в основній групі та одна самка в групі ТК при дозуванні 400 мг/кг/добу померли на день 8 із клінічними ознаками зниження активності та задишки, що призвела до припинення цього рівня дозування в дні 7 і 9 у самок та самців відповідно. Основні гістопатологічні зміни в померлих тварин включали вакуолізацію клітин печінки із некрозом окремих клітин, лімфоїдним виснаженням тимусу, селезінки та лімфатичних вузлів і зниження клітинності кісткового мозку та вакуолізацію кортикального шару нирок. При дозі ≥ 100 мг/кг/добу: (AUC₀₋₂₄ самці/самки=37,5/68,9 мкМ·годину; C_{max} самці/самки = 2,33/3,64 мкМ).

Порушення координації спостерігалось у 1 самки, яка отримувала 100 мг/кг/добу до кінця періоду лікування та в усіх тварин, які отримували дозу 200 мг/кг/добу (дні 4-5). Зміни були повністю зворотними після 1-тижневого періоду відновлення. Гематологічні зміни включали від незначного до помірного збільшення числа ретикулоцитів, тромбоцитів і лейкоцитів та незначне зменшення числа еритроцитів та гематокриту у самців при дозуванні 400 мг/кг/добу та у самок при дозуванні ≥ 100 мг/кг/добу. Усі гематологічні зміни супроводжувались частковим відновленням. Зміни в клінічних біохімічних показниках включали пов'язане із дозою збільшення рівнів АСТ та АЛТ при усіх рівнях дозування. При дозуванні ≥ 200 мг/кг/добу: (AUC₀₋₂₄ самці/самки = 78,9/167 мкМ·год; C_{max} самці/самки = 4,12/7,72 мкМ) у окремих тварин спостерігалась втрата маси тіла чи зменшення приросту маси тіла. Спостерігалось незначне збільшення рівня сечовини без відповідної зміни рівня креатиніну в сироватці при дозуванні 200 мг/кг/добу.

У печінці спостерігалось від незначної до вираженої вакуолізація клітин печінки та пов'язаний некроз/некроз окремих клітин при

Березина Вікторія
В.В. - Анастасія Т.В.

дозуванні 200 мг/кг/добу в самок та дозуванні 400 мг/кг/добу в обох статей. Ці зміни корелюють зі збільшенням рівнів АЛТ та АСТ. Спостерігалось зниження клітинності кісткового мозку та лімфоїдне виснаження тимусу, селезінки та лімфатичних вузлів при дозуванні ≥ 200 мг/кг/добу, однак із більшою частотою та тяжкістю у самців. При дозуванні 400 мг/кг/добу: (AUC_{0-24} самці/самки = 158/189 мкМ·год; St_{max} самці/самки = 7,40/9,35 мкМ) дозування було припинене в дні 7 і 9 для самок та самців через важкі клінічні ознаки зниження активності та задишки. Виражене зменшення споживання їжі спостерігалось у самок. У нирках деяких тварин спостерігалась вакуолізація клітин канальцевого епітелію кори. Повна регресія змін в нирках відбувалась після періоду відновлення, при цьому зміни в печінці та лімфоїдній тканині були частково зворотними після 7-денного періоду відновлення.

У цьому дослідженні доза 200 мг/кг/добу (AUC_{0-24h} самці/самки = 78,9/167,1 мкМ·год; St_{max} самці/самки = 4,12/7,72 мкМ) вважалась максимальною переносимою дозою.

У дослідженні 0163-2009 [Звіт № 1087346] ентректиніб (NMS-1191372) застосовувався перорально щурам (лінії Спрег-Доулі) при дозуванні 0, 50, 100 та 200 мг/кг/добу (15/стать/групу) протягом 4 тижнів із інтермітуючою схемою дозування (два тижні лікування – два тижні відпочинку – два тижні лікування). Період відновлення тривав 4 тижні. Випробовувана речовина спричиняла смертність у самок під час анестезії для забору крові, а також впливала на ЦНС і печінку при дозуванні 200 мг/кг/добу (AUC_{0-24} у день 42 111 або 192 мкМ·год у самок та самців відповідно). Пов'язані із дозою ефекти спостерігались в селезінці, брижових та нижньощелепних лімфатичних вузлах та шкірі при дозуванні 50 мг/кг/добу. Повна регресія відбулась після періоду відновлення, за винятком селезінки. Доза 100 мг/кг/добу може вважатись максимальною переносимою дозою. Ця доза відповідає в день 42 середній AUC_{0-24} на рівні 54 або 111 мкМ·год у самців та самок відповідно.

Метою 4-тижневого дослідження токсичності [Звіт № 1087348] було оцінити токсичність та встановити ТК ентректинібу (RXDX-101) при щоденному введенні щурам через шлунковий зонд протягом щонайменше 4 тижнів і оцінити зворотність, персистенцію чи відстрочений початок будь-яких ефектів після 2-тижневої фази відновлення. Прийом RXDX-101 у дозах 25, 50 та 100 мг/кг/добу призводив до пов'язаної із дозою частоти та тяжкості уражень шкіри та рішення припинити дозування у групі, що отримувала 100 мг/кг/добу, та виконати аутопсію раніше на предмет ТК та токсичності у тварин в групі на день 24. Ураження шкіри, більш тяжкі у самок щурів, проявлялись як

Александр Вітальєв

Д.В. - Мясников Т.В.

парша/відкрите ураження шкіри та вологі ураження зі звиразкуванням у деяких випадках, які співпадали зі зменшенням маси тіла та споживання їжі при дозуванні 100 мг/кг/добу в самок і корелювали мікроскопічно з мінімальним або вираженим акантозом, ерозією/виразкою, поверхневим ексудатом епідермісу, крововиливом та/або змішаним запаленням клітин. Зміни з боку шкіри також відображаються у клінічних патологічних змінах, що свідчать про запальну відповідь, зокрема збільшення числа лейкоцитів та тромбоцитів, а також зміни білка сироватки крові (низьке співвідношення альбуміні/глобуліни та висока концентрація глобулінів). Інші пов'язані з RXDX-101 зміни включали зменшення маси клітин червоної крові та мінімальні або легкого ступеня макроскопічні зміни нижньощелепних слинних залоз (збільшення секрету, 100 мг/кг/добу), селезінки (лімфоїдне виснаження, застій та екстремедулярний гемопоез, усі дози). Після періоду відновлення від 15 (50 мг/кг/добу) до 20 днів (100 мг/кг/добу) спостережувані ефекти зникли частково або повністю. На основі цих змін 25 мг/кг/добу вважалась NOAEL, що відповідало середній C_{max} на рівні 1,17/1,51 мкМ (самці/самки) та AUC_{0-24} на рівні 11,3/18,4 мкМ•год (самці/самки) у день 28 фази дозування.

У 13-тижневому дослідженні самці та самки щурів (10–15/стать/групу) отримували ентректиніб (RXDX-101) щоденно перорально по 0, 7,5, 15 або 30 мг/кг/добу протягом до 13 тижнів із наступним 8-тижневим періодом відновлення (15 і 30 мг/кг/добу) [Звіт № 1087349]. Застосування досліджуваного препарату переносилось недобре при рівні дозування ≥ 15 мг/кг/добу. Небажані пов'язані із RXDX-101 клінічні спостереження включали ураження шкіри зі звиразкуванням, що потребували ветеринарного лікування, припинення дозування або раннього умертвлення при застосуванні дози ≥ 15 мг/кг/добу. Ураження шкіри мали корелюючі клінічні патологічні зміни, що свідчать про запальну відповідь та мікроскопічні зміни. Також спостерігалось пов'язане з дозою збільшення регенерації еритроцитів та екстремедулярний гемопоез у селезінці (зі збільшенням маси селезінки) та підвищеною клітинністю кісткового мозку. Жодна з цих змін не спостерігалась у тварин у кінці 8-тижневого періоду відновлення, що свідчить про їх зворотність. З огляду на незначну величину змін та/або їх зворотність, жодна із клінічних патологічних змін, змін маси селезінки чи мікроскопічних спостережень, інших ніж тяжкі ураження з боку шкіри, не вважались небажаними. Таким чином, доза 7,5 мг/кг/добу вважається NOAEL, що відповідає середній C_{max} і AUC на рівні 0,631 мкМ та 5,98 мкМ•год, відповідно, у

Ентректиніб Вірссоб

Докл. Манаєв Т.В.

самців та 0,629 мкМ і 6,71 мкМ•год, відповідно, у самок в день 91 фази дозування.

У 14-денному дослідженні з пошуку діапазону дози у самок собак породи бігль [Звіт № 1087340] ентректиніб (NMS-1191372) при пероральному щоденному прийомі в дозах 30, 60 і 120 мг/кг та два рази на добу протягом 7 днів у дозі 120 мг/кг два рази на добу, не спричиняв смертності. Порушення координації, хитання, тремор та гіпоактивність спостерігались після отримання п'яти доз у тварин, які отримували дозу 120 мг/кг два рази на добу. При гістопатологічному обстеженні не були виявлені цільові органи за умов даного дослідження. Незначне накопичення NMS-1191372 щодо AUC_{0-24} спостерігалось після повторного дозування. На основі спостережуваних клінічних ознак доза 120 мг/кг/добу, що відповідає AUC_{0-24} на рівні 63,4 мкМ у день 14, може вважатись максимальною переносимою дозою.

У дослідженні 0157-2009 [Звіт № 1087335] ентректиніб (NMS-1191372) застосовували перорально собакам породи бігль у дозах 30 або 60 мг/кг відповідно до наступного графіку: два тижні щоденного лікування – два тижні перерви – два тижні щоденного лікування, і в дозі 120 мг/кг/добу щоденно протягом 11 (самці) або 10 (самки) днів; додаткова група отримувала наповнювач відповідно до графіку дозування. NMS-1191372, що застосовувався перорально протягом 10 або 11 днів в дозі 120 мг/кг/добу, та у вигляді двох 14-денних циклів з 14-денним інтервалом у дозі 30 та 60 мг/кг/добу, спричиняв симптоми ураження ЦНС, починаючи з дози 60 мг/кг/добу в обох статей; ці ознаки були особливо тяжкими при дозуванні по 120 мг/кг/добу (AUC_{0-24} : 147–159 мкМ•годин після повторного введення), і зрештою призвели до передчасного умертвлення або смертності більшості самок, і до переривання лікування при цьому рівні дозування. Іншим органом-мішенню була печінка, з боку якої спостерігались окремі випадки гепатоклітинного некрозу в дозі 120 мг/кг/добу. Системна експозиція зросла втричі після повторного прийому в дозі 120 мг/кг/добу. При застосованих умовах у даному дослідженні доза 60 мг/кг/добу ($AUC_{0-24}=37,3-37,8$ мкМ•год після повторного прийому) може вважатись максимальною переносимою дозою.

У дослідженні 8324196 [Звіт № 1087342] ентректиніб (RXDX-101) застосовували перорально в дозі 0, 15, 30 або 60/45 мг/кг/добу у 3 собак/стать/групу протягом 4 тижнів. Окрім того, 2 тварини/стать/групу були включені в контрольну групу і групу 60/45 мг/кг/добу з метою оцінки відновлення протягом 2-тижневого періоду. У тварин, які отримували дозу 60 мг/кг/добу, пов'язані із RXDX-101 небажані явища включали високу частоту блювання та діареї (із відповідною зміною маси тіла та

Тереза В. В.
Доктор мед. наук Д. В.

споживання їжі) плюс рання смерть однієї самки в день 9, що призвело до переривання та зменшення дози до 45 мг/кг/добу. Подібні клінічні спостереження відмічались в інших групах, однак вони не досягли рівня несприятливого впливу через те, що загальне благополуччя тварин не постраждало. Інші пов'язані з RXDX-101 зміни включали збільшення інтервалу QTc у лікованих групах самок, клінічні патологічні зміни (включаючи такі, що узгоджуються із запальною відповіддю та меншою концентрацією альбуміну) та/або анатомічні патологічні зміни (включаючи шкіру/підшкірну клітковину та пряму кишку) у тварин, які отримували ≥ 15 або ≥ 30 мг/кг/добу. Зміни, що спостерігались при дозуванні ≤ 30 мг/кг/добу не вважались несприятливими через те, що вони були легкого ступеня тяжкості, були зворотними, мали низьку частоту або інших відповідних змін, та/або не впливали на загальне благополуччя тварин. На основі цих змін NOAEL для RXDX-101 становить 30 мг/кг/добу, що відповідає середній згрупованій за статтю C_{max} на рівні 1,38 мкМ і AUC_{0-24} на рівні 9,31 мкМ•год для RXDX-101 і C_{max} на рівні 0,79 мкМ і AUC_{0-24} на рівні 8,83 мкМ•годину для метаболіту M5 на день 28 фази дозування.

У дослідженні 8330794 [Звіт № 1087343] ентректиніб (RXDX-101) застосовувався перорально в дозі 0, 7,5, 15 або 30 мг/кг/добу у самців та самок собак (4–6 тварини/стать/групу) протягом 13 тижнів із наступним 8-тижневим періодом відновлення. Застосування випробовуваного лікарського засобу не спричиняло смертності, однак призводило до деяких клінічних змін. Один самець, який отримував дозу 15 мг/кг/добу, був умертвлений під час незапланованого інтервалу в день 33 через проблему з поведінкою і смерть не вважалась пов'язаною із випробовуваною речовиною. Клінічні спостереження включали візуальні патологічні зміни у калі у тварин, які отримували дозу 30 мг/кг/добу, і ураження подушечок стоп у тварин, які отримували $\geq 7,5$ мг/кг/добу. Ці клінічні спостереження були зворотними під час фази відновлення. Однак, візуальні патологічні зміни у калі із супутньою втратою маси тіла та зниженням споживання їжі призводили до припинення дозування у двох тварин, які отримували 30 мг/кг/добу, і вважались несприятливими. Зміни, виявлені при клінічній лабораторній діагностиці включали від мінімального до легкого ступеня збільшення числа лейкоцитів зі збільшенням абсолютного числа нейтрофілів та/або моноцитів у самців, які отримували $\geq 7,5$ мг/кг/добу, та самок, які отримували 15 або 30 мг/кг/добу. Ці зміни асоціювались із мінімальним збільшенням загального рівня білка, фібриногену та зменшенням співвідношення альбуміни/глобуліни та корелювало з мікроскопічними змінами у вигляді ерозії/звиразкування та/або

Dr. [Signature]
Dr. [Signature]

	<p>запалення прямої кишки (тварини, які отримували ≥ 15 мг/кг/добу), легенях та шкірі (тварини, які отримували 30 мг/кг/добу). Усі патологічні зміни клінічних показників та мікроскопічні зміни в прямій кишці, стопах/подушечках стоп та легенях були зворотними після 8-тижневої фази відновлення. Тому рівень дозування 30 мг/кг/добу вважається найвищою нетяжкою токсичною дозою (HNSTD) і 15 мг/кг/добу як NOAEL. Рівень дозування 15 мг/кг/добу відповідав RXDX-101 показникам C_{max} і AUC_{0-24} на рівні 0,476 мкМ і 3,39 мкМ•год у самців, і 0,673 мкМ і 5,04 мкМ•год у самок, відповідно, в день 91.</p>
3) генотоксичність: in vitro	<p>Стандартне комплексне дослідження генотоксичності <i>in vitro</i> включало аналіз зворотних мутацій у бактерій [Звіт № 1087350], не-GLP аналіз на мікроядра в лімфоцитах периферичної крові людини (HPBL) [Звіт № 1087351], GLP аналіз на мікроядра в HPBL, включаючи аналіз флуоресцентної гібридизації <i>in situ</i> (FISH) [Звіт № 1087352].</p> <p>Ентректиніб продемонстрував негативний результат у тесті Еймса та не індукував статистично значиме збільшення мікроядер у початковому не-GLP HPBL тесті. У GLP <i>in vitro</i> аналізі на мікроядра спостерігалось статистично значиме збільшення частоти мікроядер після 24 годин інкубації при відсутності метаболічної активації. Подальший аналіз FISH свідчив, що мікроядра в основному були позитивними на центромери, що свідчить про анеугенний механізм утворення мікроядер.</p>
генотоксичність in vivo (включаючи додаткову оцінку з токсикокінетики)	<p>Ентректиніб (RXDX-101) вивчався на предмет його потенціалу генотоксичності <i>in vivo</i> в кометному аналізі стосовно індукції пошкодження ДНК у клітинах печінки та в аналізі на мікроядра стосовно кластогенної активності в кістковому мозку щурів [Звіт № 1087353]. В умовах цього дослідження RXDX-101, який вводили через шлунковий зонд у дозах до та включаючи 2000 мг/кг/добу, не індукував суттєвого збільшення пошкодження ДНК у клітинах печінки чи кісткового мозку порівняно із застосуванням наповнювача як контролю. Тому було зроблено висновок, що RXDX-101 продемонстрував негативні результати в <i>in vivo</i> кометному аналізі та аналізі на мікроядра.</p>
4) Канцерогенність:	<p>Ентректиніб показаний для лікування пацієнтів із поширеним раком. Відповідно до керівництва ICH S9 дослідження канцерогенності не проводились.</p>
довгострокові дослідження	-
короткострокові дослідження або дослідження середньої тривалості	-
додаткові дослідження	-

Терешкоу Віктор
Дир. - Масюк Т.В.

5) Репродуктивна токсичність та токсичний вплив на розвиток потомства:	
вплив на фертильність і ранній ембріональний розвиток	<p>У керівництві ICH S9 зазначено, що дослідження впливу на фертильність і ранній ембріональний розвиток не є необхідними для підтримки заявки на реєстрацію лікарського засобу такого як ентректиніб (показаний для лікування пацієнтів із поширеним раком). Тому такі дослідження не проводились.</p> <p>Вплив на чоловічі та жіночі репродуктивні органи у зрілих тварин вивчався в дослідженні токсичності повторних пероральних доз у щурів та собак, при цьому не були виявлені пов'язані із лікуванням гістопатологічні відхилення.</p>
ембріотоксичність	<p>Метою дослідження з пошуку діапазону дози [Звіт № 1087362] було оцінити потенціал до спричинення ентректинібом (RXDX-101) токсичності для ембріофетального розвитку у щурів та визначити рівень дозування для остаточного дослідження токсичності для ембріофетального розвитку у щурів. Ентректиніб вводився перорально групам із 8 вагітних щурів під час періоду органогенезу (з 6 по 17 день гестації) при дозуванні 0, 25, 50, 100 і 200 мг/кг/добу. Під час періоду лікування у самок у групі дозування 200 мг/кг/добу спостерігалось зниження середнього приросту маси тіла при відсутності зниження середнього рівня споживання їжі. Зниження середньої маси плода також спостерігалось в усіх групах RXDX-101, що відповідало меншій масі вагітної матки. Зменшення маси плода у групах дозування 100 та 200 мг/кг/добу було статистично значимим. Пов'язані із RXDX-101 зовнішні вади розвитку або відхилення з боку плода не спостерігались при застосуванні будь-якого рівня дозування. На підставі цих результатів рівні дозування 12,5, 50 і 200 мг/кг/добу будуть обрані для застосування в остаточному дослідженні RXDX-101 ембріофетального розвитку при введенні через пероральний зонд вагітним щурам Crl:CD(SD).</p> <p>У дослідженні впливу на ембріофетальний розвиток ентректиніб (RXDX-101) застосовувався перорально групам із 25 вагітних щурів у період органогенезу (з 6 по 17 день гестації) при дозуванні 0, 12,5, 50 і 200 мг/кг/добу [Звіт № 1087361]. Кесарів розтин був виконаний на 20 день гестації. Токсичність для материнського організму була очевидною при застосуванні дози 200 мг/кг/добу, що було підтверджено несприятливими клінічними ознаками, а також зниженням маси тіла та відповідним зниженням середнього споживання їжі, що спостерігалось загалом протягом періоду гестації. Не спостерігались ознаки токсичності для материнського організму при дозуванні 12,5 та 50 мг/кг/добу. На підставі цих результатів рівень дозування 50 мг/кг/добу був обраний як NOAEL для</p>

Трешчер Віталій

Д.А. Фісачок Т.В.

	<p>токсичності для материнського організму, коли RXDX-101 вводили через пероральний зонд вагітним щурам Crl:CD(SD). Зниження середньої маси плода спостерігалось у групах дозування 50 та 200 мг/кг/добу. Цей вплив на масу тіла плода відповідав меншій середній масі вагітної матки та збільшенню частоти зовнішніх вад розвитку та вад розвитку скелета при дозуванні 200 мг/кг/добу, а також зниженню окостеніння скелета плода при дозуванні 50 та 200 мг/кг/добу. На підставі цих результатів рівень дозування 12,5 мг/кг/добу був обраний як NOAEL для токсичності для ембріофетального розвитку. Відповідна експозиція RXDX-101 для материнського організму (AUC_{0-24}) на 17 день гестації становила 41,5 мкМ•год при NOAEL для материнського організму на рівні 50 мг/кг/добу та 10,2 мкМ•год при NOAEL для ембріофетального розвитку на рівні 12,5 мг/кг/добу.</p>
<p>пренатальна та постнатальна токсичність</p>	<p>У керівництві ICH S9 зазначено, що дослідження пренатальної та постнатальної токсичності не є необхідними для підтримки заявки на реєстрацію лікарського засобу такого як ентректиніб (показаний для лікування пацієнтів із поширеним раком). Тому такі дослідження не проводились.</p>
<p>дослідження, при яких препарат вводиться потомству (нестатевозрілим тваринам) та/або оцінюється віддалена дія</p>	<p>Ці дослідження включали 6-денне дослідження переносимості та ТК [Звіт № 1087702], 4-тижневе дослідження з пошуку дози [Звіт № 1087703] та 13-тижневе остаточне дослідження ювенільної токсичності з дозуванням, починаючи з постнатального дня (PND) 7 по PND 97 із наступним 4-тижневим періодом відновлення [Звіт № 1087245].</p> <p>У першому з цих досліджень ентректиніб (RXDX-101) вводився ювенільним самкам щурів лінії Спрег-Доулі у вигляді одноразової дози на PND 7 (групи 1, 3 і 5) або повторних доз у PND 7–12 (групи 2, 4 і 6) при дозуванні по 25, 50 і 100 мг/кг/добу, відповідно. Після повторного дозування з PND 7 по 12 доза 25 мг/кг/добу добре переносилась ювенільними самками щурів. Доза 50 мг/кг/добу призводила до клінічних ознак незначної дегідратації та помірного зменшення приросту маси тіла. Найвища доза 100 мг/кг/добу призводила до клінічних ознак від незначної до помірної дегідратації та холодного відчуття на дотик, а також тяжкої втрати маси тіла. На підставі цих даних рівні дозування 0 (контроль), 25, 50 і 75 мг/кг/добу були рекомендовані для дослідження токсичності при визначенні діапазону доз у ювенільних щурів.</p> <p>Цілями дослідження з пошуку діапазону доз було встановити ефекти RXDX-101 при введенні через пероральний зонд протягом 28 днів ювенільним щурам Crl:CD(SD) лінії Спрег-Доулі, починаючи з PND 7 по 34 і отримати інформацію щодо вибору рівня дозування для подальшого дослідження ювенільної токсичності. Окрім того визначались параметри токсикокінетики</p>

Тереза Вітале
Dr. Teresa Vitale T.V.

000063

RXDX-101 та метаболіту M5. На заключення, пероральне введення RXDX-101 один раз на добу ювенільним щурам лінії Спрег-Доулі в період PND 7–34 у дозах 25, 50 і 75 мг/кг/добу призводило до смерті та перевищення максимальної переносимої дози. Небажані клінічні ознаки, зменшення середньої маси тіла та приросту маси тіла та/або зменшення споживання їжі спостерігались при дозуванні > 25 мг/кг/добу. Смертність та тяжкі токсичні реакції призводили до передчасного умертвлення тварин у групах дозування 50 мг/кг/добу (PND 21–22) та 75 мг/кг/добу (PND 15 і 17). При завершенні дослідження спостерігалось зниження параметрів еритроцитів та лейкоцитів у самців та самок при дозуванні 25 мг/кг/добу, разом із збільшенням протромбінового часу та відповідним зменшенням активованого протромбінового індексу та фібриногену. Незначне зниження рівнів альбуміну, загального білка та глобуліну спостерігалось у самок та самців при дозуванні 25 мг/кг/добу, а також незначне зниження рівнів креатиніну, лужної фосфатази, аланінамінотрансферази, глюкози, холестерину, калію, тригліцеридів та аспартатамінотрансферази. Не спостерігалось макроскопічних уражень, пов'язаних із RXDX-101, однак зниження абсолютної маси органів та співвідношення маси органів до граничної маси тіла та маси головного мозку відображало зменшення середньої маси тіла та приросту маси тіла. Не спостерігались відмінності в залежності від статі в експозиції RXDX-101 та M5. Виявилось, що експозиція RXDX-101 збільшувалась пропорційно дозі в PND 7 при дозуванні 25–75 мг/кг/добу. Концентрації на PND 21 були вищими, ніж на PND 7 при дозуванні 50 мг/кг/добу. Експозиція M5 не змінювалась в залежності від рівня дозування (PND 7) і була меншою ніж для вихідної речовини. На основі цих даних рівні дозування 0 (контроль), 4, 8 і 16 мг/кг/добу були обрані для остаточного дослідження токсичності у ювенільних щурів.

У 13-тижневому дослідженні GLP ентректиніб вводили перорально щоденно через зонд ювенільним щурам лінії Спрег-Доулі [CrI:CD(SD)], починаючи з PND 7 по 97, у дозі 4, 8 і 16 мг/кг/добу із 4-тижневою фазою відновлення до PND 125 [Звіт № 1087245]. Наступні параметри та кінцеві точки оцінювались у цьому дослідженні: життєздатність, клінічні ознаки, маса тіла, зміна маси тіла, споживання їжі, статеве дозрівання, офтальмологічне обстеження, оцінка нейроповедінки (набір функціональних тестів, рухова активність, акустична реакція переляку, водний тест Морріса), оцінка токсикокінетики (RXDX-101 та метаболіт M5), відхилення клінічних тестів (гематологія, коагуляція, клінічна біохімія, загальний аналіз сечі), макроскопічні зміни при аутопсії, маса органів, довжина стегна та гістопатологічні та нейрогістопатологічні обстеження. На

Директор
Д.А. - [Signature]

	<p>заключення, RXDX-101 добре переносився у ювенільних щурів при дозуванні 8 мг/кг/добу, однак призводив до смертності при дозуванні 16 мг/кг/добу. NOAEL для цього дослідження була встановлена на рівні 4 мг/кг/добу на підставі даних щодо затримки розвитку, клінічних ознак, що включали судоми, порушення ходи, зниження активності, тремор, утруднене дихання, виснаження, низька посадка та збільшення частоти дихальних рухів (дихання) і вплив на набір функціональних тестів (FOB) та водний тест при застосуванні у вищих дозах. Асоційованими середніми показниками AUC_{0-24} та C_{max} для RXDX-101 при дозуванні 4 мг/кг/добу на PND 7 були 7,48 мкМ•год і 6,05 мкМ•год та 0,456 мкМ і 0,341 мкМ у самців та самок відповідно. Асоційованими середніми показниками AUC_{0-24} та C_{max} для RXDX-101 при дозуванні 4 мг/кг/добу на PND 97 були 2,20 мкМ•год і 3,12 мкМ•год та 0,288 мкМ і 0,398 мкМ у самців та самок відповідно.</p>
6) місцева переносимість	<p>Ентректиніб (NMS-1191372) наносився на шкіру спини трьом самкам новозеландських білих кроликів у дозі 500 мг/тварину у вигляді одноразової 4-годинної обробки [Звіт № 1087357]. Оброблена зона спостерігалась на предмет еритеми та утворення струпів або набряку в кінці періоду нанесення та через 1, 24, 48 та 72 години у подальшому. На обробленій шкірі будь-якої тварини подразнення не спостерігалось.</p> <p>Ентректиніб (NMS-1191372) вводили в кон'юнктивальний мішок правого ока трьом самкам новозеландських білих кроликів у дозі 100 мг/тварину у вигляді одноразового 1-годинного нанесення [Звіт № 1087358]. Оброблене око оглядали за допомогою ручної щілинної лампи через 1, 24, 48 і 72 години після нанесення на предмет пошкодження або подразнення рогівки, райдужки та кон'юнктиви, необроблене око слугувало контролем. Транзиторне гостре подразнення з міжіндивідуальною варіабельністю спостерігалось на обробленому оці у всіх тварин, із повним відновленням протягом 3–7 днів після інстиляції. Не спостерігалось ознак системного впливу лікування.</p>
7) додаткові дослідження токсичності:	
антигенність (утворення антитіл)	-
імунотоксичність	-
дослідження механізмів дії	<p>З метою оцінки механізму дії ентректинібу в клітинних лініях зі злиттям генів NTRK вивчалось фосфорилування білка злиття TRK та низхідних трансдукторів TRK-опосередкованої передачі сигналу, включаючи PLCγ, протеїнкіназу В (АКТ) та мітогенактивовану протеїнкіназу (MAPKs) за допомогою оброблених ентректинібом клітин KM12 колоректального раку людини, залежних від злиття NTRK1 [Звіт № 1087242].</p>

Тереза Вірссел
В.В. - Мислен Т.В.

	<p>Відповідно до потужних антипроліферативних ефектів ентректиніб повністю інгібував фосфорилування TRKA в концентрації 10 нМ та вище із супутньою інгібіцією фосфорилування основних низхідних трансдукторів.</p> <p>Механізм дії ентректинібу (NMS-1191372) у клітинних лініях ALK-залежної анапластичної великоклітинної лімфоми (ALCL) людини вивчався в дослідженні N-0026077 [Звіт № 1087264]. Аналіз різних клітинних моделей, оброблених NMS-1191372, показав залежну від дози модуляцію фосфорилування ALK із супутньою інгібіцією фосфорилування STAT3, який є основним низхідним трансдуктором активації ALK при лімфомі цього типу.</p> <p>У дослідженні N-0026079 [Звіт № 1087265] вивчався механізм дії NMS-1191372 у клітинах NCIH2228, які є носіями ALK реаранжування EML4-ALK. Аналіз <i>in vitro</i> виявив, що NMS-1191372 індукує чітку залежну від дози модуляцію фосфорилування ALK у NCIH2228 із супутньою інгібіцією фосфорилування білків AKT та MAPK, які є низхідними трансдукторами ALK у цій клітинній лінії, отриманій із пухлини.</p> <p>Для подальшого характеризування механізму дії ентректинібу розподіл клітинного циклу вивчався в аналізі FACS [Звіт № 1087242]. Індукована лікування кумуляція клітин у фазі G1 через 24 години після початку лікування спостерігалась для усіх випробовуваних доз. Результати підтверджують, що інгібіція проліферації KM12 за допомогою NMS-1191372 супроводжується потужною модуляцією маркерів активності TRKA. Зупинка клітинного росту та індукція смерті клітин, спричинена NMS-1191372 у цій пухлинній клітинній лінії відповідає механізму дії інгібіції TRKA. Відповідно до цих даних, ентректиніб і метаболіт M5 призводили до зупинки клітинного циклу в фазі G1 [Звіт № 1089907]. Супресія клітинного циклу супроводжувалась індукцією апоптозу, про що свідчить збільшення активності каспази-3/7. Ці дані демонструють, що механізм дії ентректинібу полягає в інгібіції кіназної активності конститутивно активних білків злиття, що керують активністю низхідного шляху передачі сигналу, призводячи до зупинки росту клітин та індукції апоптозу.</p> <p>Анти-проліферативна активність щодо онкогену ROS1 була підтверджена механізмом дії в дослідженні, що показало потужну інгібіцію фосфорилування ROS1 в розроблених клітинах Ba/F3, що керуються злиттям ROS1 [Звіт № 1087258]. Лікування ентректинібом індукувало залежне від дози фосфорилування ROS1, що було більш потужним порівняно з кризотинібом.</p>
лікарська залежність	Не застосовно.

Терешко Віктор
Донг-Вієтнам Т.В.

токсичність метаболітів	<p>Метаболіт М5 вважався належним чином охарактеризованим у рутинних токсикологічних дослідженнях.</p> <p>Окрім того, вплив метаболіту М5 на експресію hERG у клітинах ссавців вивчався при кімнатній температурі за допомогою QPatch HT[®] (Sophion Bioscience A/S, Данія), автоматичній паралельній системі фіксації потенціалу [Звіт № 1087275]. М5 вивчався при концентрації 0,3, 1, 3 і 10 мкМ. Кожна концентрація випробовуваної речовини вивчалась у чотирьох клітинах (n=4). Тривалість експозиції кожною концентрацією випробовуваної речовини становила близько 3 хвилин. Обчислений показник IC₅₀ становив близько 10,4 мкМ.</p>
токсичність домішок	<p>Хоча спеціально не вимагається керівництвом ІСН S9 (лікування поширеного раку), була виконана повна оцінка мутагенних домішок відповідно до принципів керівництва ІСН М7 [ІСН М7 2014].</p> <p>В аналізі зворотних мутацій у бактерій RO7278382, RO7278380 та RO7278384 вивчались за допомогою тестових штамів <i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535 і TA97a та тестового штаму <i>E. coli</i> WP2 uvrA у присутності чи відсутності Арохлор-індукованої фракції S9 печінки щурів [Звіти № 1087354, 1087355, 1087356]. Максимальна доза для кожної випробовуваної речовини становила 1000 мкг/лунку.</p> <p>RO7280631, RO7288150 і RO7288613 також вивчались в аналізі зворотних мутацій у бактерій за допомогою тестових штамів <i>S. typhimurium</i> TA97, TA98, TA100, TA1535 та TA102 у присутності чи відсутності s-Нафтофлаворн/Фенобарбітал-індукованої фракції S9 печінки щурів [Звіти № 1085144, 1085149, 1085150]. Максимальна доза для кожної випробовуваної речовини становила 5000 мкг/лунку. На основі отриманих результатів було зроблено висновок, що RO7278382, RO7278380, RO7278384, RO7280631, RO7288150 і RO7288613 продемонстрували негативний результат в аналізі зворотних мутацій у бактерій, оскільки не спостерігалась позитивна мутагенна відповідь у будь-якому тестовому штамі в присутності чи відсутності активації S9.</p> <p>4-тижневе дослідження у щурів із застосуванням чистого RO7278383 (RXDX-0003023) було виконане з метою кількісного визначення найвищого рівня RO7278383, оскільки ця домішка спостерігалась у рівнях між ідентифікацією за ІСН Q3A та межею кількісного визначення (0,10–0,15 %) у ранніх серіях розробки діючої речовини, виробленої за допомогою ранніх версій процесу виробництва діючої речовини [Звіт № 1087339]. При застосуванні процесу виробництва діючої речовини в комерційних цілях рівень RO7278383 є суттєво нижчим від межі ідентифікації відповідно до ІСН Q3A. Тому RO7278383 буде контролюватись відповідно до зазначеного у специфікації</p>

Тереза Віссел
Dr. Terese Wissel T.B.

	<p>граничного значення на рівні межі ідентифікації ($\leq 0,10\%$) і в діючій речовині. Пероральне введення RO7278383 у дозах 0, 0,33 або 1,0 мг/кг/добу самцями та самками щурів (10/стать/групу дозування) протягом 4 тижнів переносилося добре. Не спостерігались ефекти при застосуванні будь-якої випробовуваної дози в цьому дослідженні. Таким чином, NOEL RO7278383 для 4-тижневого дозування у щурів становив 1,0 мг/кг/добу.</p>
інше	<p>У <i>in vitro</i> аналізі зв'язування нейтрального червоного в BALB/c 3T3 фібробластах мишей (3T3 NRU PT) було виявлено, що ентректиніб має потенціал до фототоксичності за допомогою коефіцієнту фотоподразнення та середнім фотоэффектом [Звіт № 1087359].</p> <p>У дослідженні подальшого спостереження <i>in vivo</i> у пігментованих щурів лінії Лонг-Еванс було встановлено, що ентректиніб на має фототоксичної дії [Звіт № 1087360]. Однак, мікроскопічні зміни у щурів з чи без експозиції світлом у вигляді інфільтрації нейтрофілами строми рогівки чи некрозу окремих клітин епітелію рогівки в дозах ≥ 100 мг/кг/добу були розцінені, як пов'язані із ентректинібом.</p>
5. Висновки щодо доклінічного вивчення	<p>Ентректиніб є потужним інгібітором рецептору тирозинкіназ TRKA ($IC_{50}=1,7$ нМ), TRKB ($IC_{50}=0,1$ нМ), TRKC ($IC_{50}=0,1$ нМ), ROS1 ($IC_{50}=0,2$ нМ) і ALK ($IC_{50}=1,6$ нМ). З огляду на активність ентректиніб у низьких наномолярних концентраціях щодо усіх TRK кіназ, очікується, що ентректиніб буде мати терапевтичну цінність при усіх пухлинах, що характеризуються дисрегуляцією цих кіназ.</p> <p>Ентректиніб продемонстрував потужну антипроліферативну дію при різних варіантах злиття 13 NTRK та одному варіанті злиття ROS1 у сконструйованій мишачій клітинній лінії Ba/F3 із низькою наномолярною IC_{50}. Подібним чином, у пухлинних клітинних лініях людини та пухлинних моделях, отриманих у людини, які є носіями злиття NTRK1, NTRK2 чи NTRK3, ентректиніб продемонстрував потужну антипроліферативну дію з активністю при низьких наномолярних концентраціях та/або протипухлинною ефективністю в мишачих пухлинних моделях при щоденних дозах, що перевищують 5 мг/кг. Антипроліферативна активність ентректинібу безпосередньо корелювала з інгібіцією фосфорилування TRKA, TRKB і TRKC та фосфорилуванням основних низхідних медіаторів TRK-опосередкованих шляхів передачі сигналу (PLCγ, MAPK та AKT). Окрім того було показано, що ентректиніб індукує зупинку клітинного циклу з наступним апоптозом позитивних на злиття NTRK1 клітинних ліній.</p> <p><i>In vivo</i> ентректиніб добре переносився та продемонстрував залежну від дози протипухлинну активність ви шести різних</p>

Александр Вітальєв
 Директор - Інститут Т.В.

типах пухлин, що охоплюють злиття восьми генів (TPM3-NTRK1, MPRIPNTRK1, ETV6-NTRK3, LMNA-NTRK1, BCAN1-NTRK1, ETV6-ROS1, SCD4-ROS1, CD74-ROS1). Лікування ентректинібом призводило до регресу пухлини в мишачих моделях ксенотрансплантата колоректального раку (злиття генів NTRK1), саркоми м'яких тканин (злиття генів NTRK1), НДКРЛ (злиття генів NTRK1, ROS1 або ALK), раку голови та шиї (злиття генів NTRK3), ГМЛ (злиття генів NTRK3). Спеціальні ФК/ФД дослідження продемонстрували чіткий зв'язок між інгібіцією низхідного шляху передачі сигналу драйверного білка злиття та протипухлинною активністю, і при цьому активність спостерігалась при експозиції в плазмі (на основі AUC₀₋₂₄) нижче такої, що досягалась в клініці.

Було показано, що ентректиніб при пероральному прийомі інгібує пухлинний ріст та подовжує виживаність в інтракраніальних моделях гліоми BCAN-NTRK1, позитивної на злиття, та в позитивних на злиття TPM3-NTRK1 моделях колоректального раку при експозиції в плазмі (на основі AUC₀₋₂₄) приблизно такої, що досягається в клініці, що свідчить про те, що ентректиніб може мати терапевтичне значення у пацієнтів із метастатичним ураженням ЦНС.

ФК властивості ентректинібу вивчались *in vitro* з використанням тваринних тканин та тканин людини та експресованих білків, та *in vivo* у видів та штамів, які використовувались для оцінки безпеки.

Ентректиніб легко всмоктувався після прийому всередину та був біодоступним в усіх видів тварин, які використовувались для охарактеризування його токсичності. Після перорального прийому системна експозиція ентректинібу загалом біла пропорційною дозі при фармакологічно значимому діапазоні доз. Після багаторазового щоденного прийому не спостерігалось або спостерігалось низьке накопичення експозиції ентректинібу в плазмі крові (переважно $\leq \sim 2x$) у мишей, щурів або собак. Основний циркулюючий метаболіт, M5, спостерігався у мишей, щурів та собак із співвідношенням AUC M5-до-вихідної речовини на рівні $\sim 0,1$, $\sim 0,05$ і ~ 2 , відповідно, після повторного дозування в дослідженнях ФК та GLP токсикологічних дослідженнях.

Аналіз зразків головного мозку щурів і собак після повторного перорального введення ентректинібу в токсикологічних дослідженнях показав загалом пов'язану з дозою концентрацію через 24 години після прийому ентректинібу в тканині головного мозку. Співвідношення головний мозок/плазма крові варіювало від 0,6 до 1,5 в усьому головному мозку щурів (від 100 до 200 мг/кг/добу) і від 1,4 до 2,2 у різних зонах головного мозку собак (від 30 до 60 мг/кг/добу). У дослідженні інфузійного

Терешко Віктор

Директор - Маслова Т.В.

введення було показано, що співвідношення головний мозок/плазма крові 0,6 для ентректинібу було досягнуто після 6-годинної внутрішньовенної інфузії ентректинібу і при цьому концентрація в плазмі крові становила $\sim 1,4$ мкМ. Концентрація у спинномозковій рідині ~ 1 нМ спостерігалась після 5–6-годинної в/в інфузії ентректинібу у щурів, що може бути в ~ 3 рази менше очікуваної вільної концентрації в головному мозку в рівноважному стані. Ці очікувані вільні концентрації в головному мозку (1–3 нМ) дорівнюють або перевищують IC_{50} для TRK або ROS1. Однорідно надійна інгібіція пухлини та ефективність щодо виживаності спостерігалась у мишачій моделі ксенотрансплантата інтракраніальної пухлини, що експресує TPM3–NTRK, після дозування 30 мг/кг перорально один раз на добу із середньою концентрацією в плазмі крові на рівні ~ 2 мкМ (розраховано на основі $AUC_{0-24/h}$). Ці дані свідчать, що ентректиніб може проникати в головний мозок для досягнення фармакологічного ефекту при клінічно значимій експозиції.

M5 та M11 були лише двома основними циркулюючими метаболітами, ідентифікованими у людини. M5 був виявлений *in vitro* в гепатоцитах і мікосомах печінки усіх видів, що вивчались, та *in vivo* в обох видах у токсикологічних дослідженнях. Було показано, що M5 має подібну ентректинібу інгібіторну активність щодо TRKA/B/C, ROS1, а також подібну активність у клітинному аналізі. Окрім того, *in vitro* дослідження показали, що M5 та ентректиніб мають подібне зв'язування з білками ($> 99\%$) у плазмі крові людини та видів тварин, що вивчались. Таким чином, вклад M5 в *in vivo* активність необхідно визначати на основі його системної експозиції відносно до ентректинібу.

Виявилось, що CYP3A4 має основне значення в біотрансформації ентректинібу та утворенні M5 *in vitro*. Ентректиніб може метаболізуватись множинними метаболічними ферментами людини при набагато меншій метаболічній активності, включаючи CYP1A1, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A5 і UGT1A4.

Ентректиніб та M5 демонстрували потенціал до інгібіції та індукції CYP3A *in vitro*. Ентректиніб і M5 також демонстрували потенціал до інгібіції P-gp, BCRP, OATP1B1 та MATE1 *in vitro*.

На підставі даних, отриманих у доклінічних дослідженнях, очікується сприятливе співвідношення користь/ризик для ентректинібу. Доклінічна оцінка безпеки, виконана для ентректинібу, продемонструвала вплив на ЦНС (дозолімімуючий), шкіру (дозолімімуючий), печінку, вплив на параметри крові, ШКТ (дозолімімуючий) та інтервал QT/QTcF. Ентректиніб не демонстрував мутагенного чи кластогенного

Dr. [Signature]

[Signature] T. B.

000070

	<p>впливу; препарат продемонстрував анеугенність в аналізі <i>in vitro</i>, однак не в дослідженні <i>in vivo</i> у щурів. Ентректиніб впливав на ембріофетальний розвиток у щурів.</p> <p>На заключення ентректиніб є молекулою, що пенетрує в ЦНС, із продемонстрованою ефективністю в доклінічних моделях, що клінічно проявляється в лікуванні пацієнтів із солідними пухлинами-носіями реаранжування (злиття) гену NTRK1/2/3 або ROS1. ADME та токсикологічна програма забезпечують добре охарактеризований метаболізм і профіль фармакокінетики/токсичності ентректинібу.</p> <p>Загалом дані з доклінічної безпеки для ентректинібу підтримують щоденне застосування під ретельним медичним спостереженням лікуючим лікарем у пацієнтів із поширеним раком, у тому числі у дітей. Ці доклінічні дані узгоджуються з клінічними даними та підтримують застосування ентректинібу як ефективного лікування пацієнтів із позитивними на злиття NTRK локально поширеними або метастатичними солідними пухлинами або ROS1-позитивним метастатичним НДКРЛ.</p>
--	--

Заявник (власник реєстраційного посвідчення)

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд

Підпис
Пітер Ліндінгер
Відділ із міжнародних регуляторних питань

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Базель, Швейцарія

Підпис
Еріка Екель
Відділ із міжнародних регуляторних питань

Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд
Базель, Швейцарія

Stefano Vignati

Dr. Massimo T. B.

Clinical Trial Report

1. Name of the medicinal product (number of registration certificate, if available)	ROZLYTREK®
2. Applicant	F.Hoffmann-La Roche Ltd Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland
3. Manufacturer	F.Hoffmann-La Roche Ltd Wurmisweg, 4303 Kaiseraugst, Switzerland
4. Trials conducted:	<input checked="" type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no If not, substantiate
1) type of the medicinal product, by which registration was conducted or planned	Medicinal product with complete dossier (stand-alone dossier), other medicinal product, new active substance according to item 1 (sub-item 1.1) of section III of the Procedure of Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 23.07. 2015 № 460.
5. Full name of the Clinical Trial, clinical trial code	<p>Population Pharmacokinetics and Pharmacokinetics-Pharmacodynamics Data Analysis Report. November 30, 2018. The data from Studies RXDX-101-01/GO40784 (also known as STARTRK-1), RXDX-101-02/GO40782 (also known as STARTRK-2), and RXDX-101-03/CO40778 (also known as STARTRK-Next Generation [NG]) were analyzed. Protocol No. RXDX-101-01 (STARTRK-1). A Phase 1, Multicenter, Open-label Study of Oral Entrectinib (RXDX-101) in Adult Patients with Locally Advanced or Metastatic Cancer Confirmed to be Positive for NTRK1, NTRK2, NTRK3, ROS1, or ALK Molecular Alterations.</p> <p>Protocol No. GO40782 (STARTRK-2): An Open-Label, Multicenter, Global Phase II Basket Study of Entrectinib for the Treatment of Patients with Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors that Harbor NTRK1/2/3, ROS1, or ALK Gene Rearrangements.</p> <p>Protocol No. RXDX-101-03/CO40778 (STARTRK-NG). A Phase 1/2, Open-Label, Dose-Escalation and Expansion Study of Entrectinib (RXDX-101) in Children and Adolescents with Recurrent or Refractory Solid Tumors and Primary CNS Tumors, with or without TRK, ROS1, or ALK Fusions.</p>
6. Clinical trial phase	Study STARTRK-1: Phase I. Study STARTRK-2: Phase II. Study STARTRK-NG: Initiated as a Phase I/Ib, updated to a phase I/II
7. Period of the clinical trial	Study STARTRK-1: First enrollment: 30 July 2014; Data cutoff date: 31 May 2018. Study STARTRK-2: First Patient Enrolled: 16 November 2015;

	<p>Clinical data cut-off: 31 May 2018. Study STARTRK-NG: First Patient Screened: 02 May 2016; Primary Data cut-off: 31 May 2018.</p>
8. Countries where the clinical trial was conducted	<p>Study STARTRK-1: 11 centers in the United States, Spain, and South Korea. Study STARTRK-2: 84 investigative sites in 15 countries globally: Australia, Belgium, France, Germany, Hong Kong, Italy, Japan, Korea, The Netherlands, Poland, Singapore, Spain, Taiwan, United Kingdom, USA. Study STARTRK-NG: USA (8 centers).</p>
9. Number of study participants	<p>The final PK dataset used for model development consists of 3655 entrectinib and 3588 M5 plasma concentrations collected from 276 cancer patients in studies RXDX-101-01, RXDX-101-02 and RXDX-101-03.</p>
10. Goal and secondary objectives of the clinical trial	<p>The objectives of the population PK analysis were to:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Describe the PK of entrectinib and M5 in patients with advance/metastatic solid tumors. • Explore and quantify the potential influence of covariates (including co-medication with pH modifiers and formulation) that contribute significantly to the between-patient variability in PK parameters of entrectinib and M5. • Determine individual estimates for secondary PK parameters (e.g. area under the time-concentration curve over 24 hours at steady state) to be used in the exposure-efficacy and safety analyses. • Predict pediatric dose (using F2A formulation) to match the adult target exposure accounting for (i) the expected differences in PK in children (>4 years old) due to allometric scaling, (ii) the expected differences in formulation between adults (F2A) and children (F1). • Illustrate (visually) the presence or absence of a marked difference in exposure levels obtained with dose of 600 mg QD in the following cases: <ul style="list-style-type: none"> ○ Asian-Japanese versus other patients, ○ Mild, moderate or severe renal impaired patients versus non-impaired patients, ○ Mild, moderate or severe hepatic impaired patients versus non-impaired patients, ○ Patients co-medicated with moderate or strong CYP3A inducers versus patients without such co-medication. ○ Patients co-medicated with moderate or strong CYP3A inhibitors versus patients without such co-medication. <p>The objectives of the exposure-efficacy and safety analyses were to:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Determine whether the variability in tumor size, duration of QT interval and the occurrence of serious or treatment-emergent

	<p>adverse events could be attributed to the variability in entrectinib and M5 exposure.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Characterize the relationship between tumor shrinkage or tumor growth inhibition and entrectinib and M5 exposure, in (i) ROS1-positive NSCLC adult patients and (ii) in NTRK fusion-positive adult patients. • Characterize the relationship between best overall response, as well as duration of response, and entrectinib and M5 exposure, in (i) ROS1-positive NSCLC adult patients and (ii) in NTRK fusion-positive adult patients. • In the RXDX-101-02 study, characterize the relationship between entrectinib and/or M5 concentration and ΔQTcF and predict concentration that will cause >10 ms in ΔQTcF if applicable. • Characterize the relationship (or the shape of the relationship based on the model) between entrectinib and/or M5 exposure and treatment-emergent Grade 3 or 4 adverse events. • Characterize the relationship (or the shape of the relationship based on the model) between entrectinib and/or M5 exposure and serious adverse events.
11. Design of the clinical trial	<p>To investigate (i) the pharmacokinetic (PK) characteristics of entrectinib and its main metabolite M5, (ii) the exposure-efficacy, and (iii) the exposure-safety relationships in patients with advanced solid tumors, a model-based approach was used.</p> <p><i>Pharmacokinetic Model.</i> Models with one and two open compartments were considered to describe the pharmacokinetic profiles of entrectinib and M5. For the absorption phase, a first-order, zero-order, and/or sequential zero and first order absorption rate with or without a lag absorption time were proposed to be tested. The compartmental models were to be parameterized in terms of clearance(s) and volume(s) of distribution.</p> <p>A joint model capturing the PK of both entrectinib and M5 was defined as a default preferred option as both were highly correlated active moieties.</p> <p>To avoid identifiability issues, it was assumed that the entire parent was metabolized into M5 so the elimination rate of entrectinib was equal to the formation rate of M5. All the absorption and disposition related parameters were very well estimated with relative standard error of estimate (RSE) $< 15\%$.</p> <p><i>Efficacy and Safety Datasets.</i> Three PD analysis datasets were prepared based on the individual study data. One contains the efficacy data (Sum of lesion diameters [SLD] dataset); one contains the QTc data (QT dataset) and the last one contains the adverse events data (AE dataset).</p>
12. Main inclusion criteria	<p>The population PK analysis includes cancer patients with advanced/metastatic solid tumors from studies RXDX-101-01, RXDX-101-02, and RXDX-101-03. Patient data was included in the</p>

	<p>population PK analysis if it contained sufficient dosing information and at least one adequately documented and quantifiable entrectinib or M5 concentration per patient.</p> <p>Patients were considered as “evaluable” for the exposure-efficacy analysis if they had at least one pre-treatment and one on-treatment RECIST1.1 assessment and met the defined criteria as outlined in the efficacy analysis sub-groups below.</p> <p>The analysis was run in two separate sub-groups of patients:</p> <ul style="list-style-type: none"> • ROS1 NSCLC: ROS1 fusion-positive adult patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer, <ul style="list-style-type: none"> ○ who have received at least one dose of entrectinib, ○ with measurable disease at baseline as determined by investigator per RECIST v1.1, ○ and without prior ROS1 inhibitor treatment (e.g. crizotinib). • NTRK: Adult patients with locally advanced or metastatic solid tumors that harbor NTRK1/2/3 gene fusions, <ul style="list-style-type: none"> ○ who have received at least one dose of entrectinib ○ and with measurable disease at baseline as determined by investigator per RECIST v1.1, ○ and without prior NTRK inhibitor treatment (e.g., LoxoR).
13. The investigational medicinal product, method of administration, strength	<p>In study RXDX-101-01, formulation F1 of entrectinib was used in Cohorts 1-6 (100 mg/m²/day to 400 mg/m²/day and 600 mg to 800 mg flat) while F2A was used in Cohort 7 (600 mg flat).</p> <p>In Study RXDX 101-02, entrectinib was administered orally, at a dose of 600 mg once daily in repeated 4-week cycles. The primary formulation used in the study was F2A. The F1 formulation was used in a limited number of patients, who were later moved to the F2A formulation.</p> <p>In the adult population (studies RXDX-01-101 and RXDX-01-102), doses higher than 600 mg were not used for model development.</p> <p>In Study RXDX-101-03, patients were treated with F2B formulation of entrectinib at the dose of 250 mg/m² and with F1 formulation of entrectinib for dose above 250 mg/m². Entrectinib was administered orally with food, once daily, in repeated 4-week cycles.</p>
14. Comparator, dose, method of administration, strength	Not applicable.
15. Concomitant therapy	No data available.
16. Efficacy evaluation criteria	<p>The assessment of exposure-efficacy was done on the basis of data collected in adults. Therefore, only data collected in studies RXDX-101-01 and RXDX-101-02 were considered here.</p> <p>In RXDX-101-01 and RXDX-101-02, tumor assessments were performed at screening, at the end of Cycle 1 (week 4 ±2 days), every 8 weeks (±7 days) thereafter, regardless of treatment delays resulting from toxicity, and at the end of treatment (if more than 4 weeks have passed since the last imaging assessment). Tumor size was defined according to RECIST 1.1 as the sum of longest lesion diameters for a maximum of 5 target lesions.</p>

	<p>The best overall response (BOR) was defined as the best radiological overall response recorded from the start of treatment until disease progression, based on RECIST1.1.</p> <p>The duration of response (DOR) was calculated – only for responders – as the elapsed time (in days) between the date of first objective response (CR or PR) and the date of first documented radiographic disease progression or date of death due to any cause, whichever is the earliest event. For patients without disease progression and who have not die within 30 days of the last dose of study treatment, DOR was censored at the last tumor assessment date prior to any date of subsequent anticancer therapy.</p>
17. Safety evaluation criteria	<p>In the US and Japan centers of study RXDX-101-02, patients had triplicate ECGs recorded and analyzed centrally. The safety variable of interest was the baseline-adjusted and Fridericia heart-rate-corrected QT interval, called $\Delta QTcF$.</p> <p>Adverse Events (AEs). AE data were available in all patients who received at least one dose of entrectinib in studies RXDX-101-01, RXDX-101-02, and RXDX-101-03. The severity grade of the AEs was defined according to the NCI CTCAE 4.0.</p>
18. Statistical methods	<p>Population Pharmacokinetic Analysis</p> <p>Statistical Model</p> <p><i>Between-Patient Variability Model</i></p> <p>The difference between individuals in a model parameters (θ) was regarded as random quantities and was modeled in terms of eta (η) variables. Each η variable was assumed to have a mean of zero and a variance ω^2 which could be estimated. This variance described the between-patient variability of the PK parameter, and the distribution of the individual PK parameter values around the typical population value was assumed to be normal. The between-patient variability was reported in terms of coefficient of variation (CV).</p> <p><i>Residual Error Model</i></p> <p>The differences between observed plasma concentrations and the model predicted plasma concentrations were regarded as random quantities and were modeled in terms of epsilon (ϵ) variables. Each ϵ variable was assumed to have a mean equal to zero and a variance σ^2 which could be estimated. Three different error models were to be tested to model the residual variability: additive error model; multiplicative error model and combined additive-multiplicative error model. The magnitude of the residual variability is equal to σ and is expressed as a concentration in an additive error model and as a coefficient of variation in a multiplicative error model. Transformations such as the both-sides transformations was allowed to be used if deemed appropriate.</p> <p><i>Covariate Analysis</i></p> <p>Once the base structural model was established, non-structural covariates were tested in a stepwise manner. To this aim, the stepwise covariate model (SCM) building procedure in PsN was considered,</p>

possibly involving linearization. In this case, covariates could be part of the potential predictors if they were significant at the $p < 0.01$ level, but could only be retained in the final covariate model if they were significant at the $p < 0.001$ level.

The covariate-parameters pairs described in Table 1 were tested as part of the population PK building process.

Table 1. Covariate-parameter pair to be tested as part of the population PK building process

Covariate	PK parameter
Body weight	Clearance (CL) and volumes (V) using allometry theory. At the final stage, perform a sensitivity analysis of the power coefficients.
Formulation	Absorption related parameters (i.e. Frel, KA, ALAG1 and/or D1)
pH modifiers	Absorption related parameters (i.e. Frel, KA, ALAG1 and/or D1)

Exposure-Efficacy Analyses

An exploratory analysis was conducted to investigate if there was a correlation between entrectinib and M5 exposure and efficacy. AUC_{ss} was used as metric of exposure.

A nonlinear mixed-effect model was used to assess the relationship between exposure and SLD.

It was assumed that the random effects were log-normally distributed with means equal to 0 and a covariance matrix G, whereas the residuals (e_{ij}) were normally distributed with mean 0 and variance R.

The influence of prior treatment with tyrosine-kinase inhibitors (yes/no), primary brain tumor (yes/no), and CNS metastasis at baseline (presence/absence) on the model parameters, KS and KG, were considered for formal testing, using a likelihood ratio test. If the test was significant, the covariate(s) were kept in the final model.

Model parameters were estimated using restricted maximum likelihood.

Exposure-Safety Analyses

Exposure-QTc Relationships

The exposure-QTc relationship was studied separately for entrectinib parent and M5. The concentration of entrectinib (respectively parent and M5) at times matching the ones of the QTc measurement for each patient was used as metric of drug exposure.

$\Delta QTcF$ was plotted versus (observed) concentration.

A linear mixed-effect model was used to assess the relationship between exposure and QTc.

It was assumed the random effects were normally distributed with

	<p>means equal to 0 and an unstructured covariance matrix G, whereas the residuals (e_{ij}) were normally distributed with mean 0 and variance R.</p> <p>Model parameters were estimated using restricted maximum likelihood.</p> <p>The decision to classify the risk of a drug was based on the upper bound of the two-sided 90% confidence interval for model-derived $\Delta QTcF$. An upper bound >10 ms in adult patients treated with 600 mg QD would be considered as problematic.</p> <p><i>Exposure-AE Relationships</i></p> <p>Graphical analyses were performed to investigate whether the occurrence of safety events could be attributed to the variability in entrectinib and M5 exposure.</p> <p>Logistic regressions were used to investigate the exposure-AE relationships. Linear function describing the effect of exposure was considered.</p>
19. Demographic characteristic of study population (gender, age, race, etc.)	<p>The age of the adult patients ranged from 15 to 86 years and the body weight ranged from 31.6 to 130 kg. Regarding pediatric patients, the age and body weight ranged from 4 to 20 years and from 13.3 to 79.2 kg, respectively.</p>
20. Efficacy results	<p>Population PK Analysis</p> <p>The zero-order absorption process of entrectinib was estimated to last about 1.35 hours and the absorption half-life was estimated to be 0.686 hours. The relative bioavailability (Frel) for formulations F2A and F2B compared to F1 was fixed to 1 in adult patients. For a typical patient of 70 kg, the entrectinib CL/F and V/F were estimated to be 19.6 L/h and 551 L, respectively. Therefore, for the typical patient, the elimination half-life of entrectinib was 19.5 hours.</p> <p>For a typical patient treated with a dose of 600 mg QD, the entrectinib accumulation ratio was estimated to be 1.89. For M5, the accumulation ratio was estimated to be 1.91.</p> <p>Moderate between-patient variability was estimated for CL/F, Frel (i.e. relative bioavailability of entrectinib with a population value fixed to 1), and CLM/F (30.8%, 40.1%, and 54.6%, respectively). However, greater between-patient variability was estimated for KA (122%) and for the additive component of the residual variability (132%). These parameters were also estimated with high precision (i.e. RSE < 10%).</p> <p>A combined multiplicative and additive error model was used for both entities. The magnitudes of the proportional error were moderate, with 29.3% for entrectinib and 32.1% for M5, respectively. However, the magnitudes for the additive errors were large compared to the lower limit of quantification (LLOQ) of 3.57 nM for each entity (i.e. 108 and 34.7 nM for entrectinib and M5, respectively). The large additive error may contribute to slightly over-predicting some of the low concentrations following the first dose. These large residual error terms may be attributed to intra-patient variability</p>

across visits and to some inconsistencies in the time collection of the sparse PK data.

Covariates Assessment of Entrectinib

The base model assumed the apparent clearance and volume of distribution changed as a function of body size. This hypothesis was challenged by removing the allometric coefficients on CL/F and V/F. This structural modification increased the Akaike Information criterion (AIC) (and Bayesian information criterion [BIC]) by 56 points.

The inclusion of the effect of pH modifiers on KA or Frel did not reduce the AIC or BIC into a significant extent and thus, this covariate was not included in the model.

The inclusion of a formulation effect on KA did not reduce AIC and increased BIC by 6 points. Furthermore, the inclusion of a formulation effect on Frel reduced the AIC by 3 points and increased the BIC by 3 points. Therefore, according to the BIC and AIC criteria a formulation effect was not retained in the model neither on KA nor on relative bioavailability (Frel). Nevertheless, the plot of η_{Frel} vs. the covariate 'STUDY' indicated that the study RXDX-101-03 appears to have lower relative bioavailability compared to studies RXDX-101-01 and RXDX-101-02. The difference in η_{Frel} between ST3 and the other two studies was much larger than the difference in η_{Frel} observed between adults treated with the F1 formulation (mean (η_{Frel}) = -0.0399, SD (η_{Frel}) = 0.322) and adults treated with the F2A or F2B formulation (mean (η_{Frel}) = 0.0802, SD (η_{Frel}) = 0.291). In addition, the plot of the relationship between observations and population predictions stratified per study also suggested the model over-predicts the concentrations in study RXDX-101-03. Therefore, it was proposed to correct this over-prediction by implementing the formulation effect only on study RXDX-101-03.

The inclusion of this fixed effect decreased the objective function value (OFV) by 9 units; it also decreased the AIC by 7 points and the BIC by 1 points.

There was substantial noise in the data for some patients included in the population PK analysis. Nevertheless, (i) the quality of the goodness-of-fit plots for both entrectinib and M5, (ii) the adequate precision of the parameters and (iii) the satisfactory results of the prediction corrected visual predictive checks indicated that the model developed was sufficient to properly and simultaneously describe the PK profiles of both entities in adult and pediatric patients. Thus, the model developed was considered suitable to support the dosing rationale in pediatric patients with the adult formulation (F2A) and for estimating exposure parameters for the exposure-efficacy and exposure-safety analyses.

Using the final population PK model, it was predicted that the administration of a dose of 300 mg/m² would allow pediatric patients with body weights ranging from 15 to 50 kg to have drug exposure

levels similar to the ones observed in 70 kg adults treated with entrectinib at 600 mg QD.

PK in specific patient subgroups

Overall, the data suggest comparable exposure between all the scenarios. Patients with mild or moderate renal impairment appear to have slightly higher exposure compare to patients with normal renal function. Nevertheless, the variability around the central tendency is similar and the 95% confidence intervals of the mean are overlapped at all times and for both entities. With that being said, given the imbalance in the categories, interpretation of these plots should be done with caution.

Secondary PK Parameters to be used in the Exposure/Response analysis

The post hoc for entrectinib and M5 for each patient receiving doses up to 800 mg in studies RXDX-101-01, RXDX-101-02 and up to 1100 mg in study RXDX-101-03 were also used to derive secondary PK parameters following per protocol dosing. Doses higher than 800 mg were administrated only to one out of the 18 patients previously removed. Therefore, the secondary PK parameters were derived in a total of 293 (276+17) cancer patients. Summary statistics of the secondary PK parameters derived for entrectinib and M5 to be used in the exposure/response analysis are presented in Table 2.

Table 2. Summary statistics of the secondary PK parameters to be used in the exposure/response analysis

Parameter	N	Mean	Median	Min	Max	SD
AUCD1 [nM x h]	293	43421	38281	5932	17480	23624
AUCss [nM x h]	293	81394	72267	13410	31021	43688
CmaxD1 [nM]	293	2535	2266	313	10236	1483
Cmaxss [nM]	293	4444	3925	670	17670	2361

The individual predicted AUCss values of the 293 cancer patients were ranked and binned into 5 categories of (approximately) equal size:

- Q1 (n=59): [13.4, 50.5) x103 nM*h
- Q2 (n=59): [50.5, 64.6) x103 nM*h
- Q3 (n=58): [64.6, 81.1) x103 nM*h
- Q4 (n=59): [81.1, 105.3) x103 nM*h
- Q5 (n=58): [105.3, 310.2] x103 nM*h

Exposure-Tumor Size Analysis

ROS1+ NSCLC Patient Analysis

Among the 44 patients included in the ROS1+ NSCLC evaluation set, a total of 39 patients were retained in the exposure tumor size analysis.

In this subgroup of 39 patients, the distribution of AUCss was no different than the one observed in the rest of the population used to develop the population PK model. The summary statistics for AUCss in this subgroup were not markedly different from the ones observed in the rest of the population.

Among the 39 patients involved in the analysis, 33 (85%) were categorized as partial responders. Patients were allocated to the previously defined 5 categories of predicted AUCss. The proportion of PR patients was neither increasing nor decreasing monotonically going from the lower to the higher categories of exposure.

Adding CR and PR patients, the responders rate was equal to 87.2% (34 patients out of 39), with an exact 95%CI ranging between 72.6% and 95.7%.

The median DOR in responder ROS1+ NSCLC patients was equal to 338 days. It was a trend to lower DOR with higher exposure in the studied range.

The SLD values (n=355) show a steep decrease indicating a tumor shrinkage for most of the patients. The assessment of correlation between tumor kinetic parameters estimates and exposure (AUCss for both entrectinib and M5) showed a large inter-patient variability. The slope estimates for the linear model characterizing the trend in KS and KG as function of $\log_{10}(\text{AUCss})$ were equal to 7.11 for $\log(\text{KS})$ (with a 95%CI including 0 and ranging between -5.96 and 20.2) and 1.08 for $\log(\text{KG})$ (with a 95%CI including 0 and ranging between -0.526 and 2.68). It could be inferred that the higher the exposure, the larger the KS value; but it is a shallow trend.

NTRK fusion positive patient analysis

Among the 53 patients included in the ROS1+ NSCLC evaluation set, a total of 50 patients were retained in the exposure tumor size analysis. In this subgroup of 50 patients, the distribution of AUCss was no different than the one observed in the rest of the population used to develop the population PK model. The summary statistics for AUCss in this subgroup were not markedly different from the ones observed in the rest of the population.

Among the 50 patients involved in the analysis, 27 (54%) were categorized as partial responders. The proportion of PR patients was neither increasing nor decreasing monotonically going from the lower to the higher categories of exposure. Adding CR and PR patients, the responders rate was equal to 62% (31 patients out of 50), with an exact 95% CI ranging between 47.2% and 75.3%. The median AUCss (in $\text{nM} \times \text{h}$) is equal to 73.3×10^3 in responders vs. 82.0×10^3 in non-responders.

The median DOR in responder NTRK fusion positive patients was equal to 217 days. The exploratory graphic indicate no marked trend

	<p>towards prolonged DOR with higher exposure in the studied range.</p> <p>The SLD values (n=343) showed a steep decrease indicating a tumor shrinkage for most of the patients. In a few patients, the profile shows a relapse after an initial shrinkage.</p> <p>The assessment of correlation between tumor kinetic parameters and exposure (AUC_{ss} for both entrectinib and M5) showed a large inter-patient variability. The slope estimates for the linear model characterizing the trend in KS and KG as function of log₁₀(AUC_{ss}) were equal to -5.69 for log(KS) (with a 95%CI including 0 and ranging between -17.2 and 5.84) and 0.412 for log(KG) (with a 95%CI including 0 and ranging between -2.09 and 2.91). It could be concluded that there is no evidence of a relationship between exposure and amplitude or duration of tumor shrinkage.</p>
21. Safety results	<p>Concentration-QT analysis</p> <p>Entrectinib did not cause a clinically relevant change in QTcF. There were minor fluctuations in mean absolute QTcF values over time; the maximum mean QTcF change from baseline was -18 ms (upper one-sided 95% CI: -7.8 ms) observed pre-dose at cycle 16. The upper one-sided 95% CI was below +10 ms at any time during the treatment period.</p> <p>The majority of patients (92.5%) had maximum post-baseline QTcF values ≤450 ms. The remaining 7.5% (n=8) have values ranging between 450 and 491 ms. No patient had an on-treatment QTcF interval >500 ms.</p> <p>Similarly, the majority of patients (86%) had maximum QTcF positive change from baseline of ≤30 ms. The remaining 14% had values ranging between +30 and +60.7 ms.</p> <p>The data do not show evidence of prolonged QT-interval with higher concentration of entrectinib after correction for time effect and individual baseline QTcF value.</p> <p>Same results were obtained with M5 concentration in place of entrectinib concentration.</p> <p>Exposure-Adverse events analysis</p> <p>A total of 298 patients from studies RXDX-101-01, RXDX-101-02, and RXDX-101-03 were enrolled in the AE analysis among which 293 had available secondary PK metrics. Patients were categorized in 5 groups of equal size (N=58 or 59) depending on their respective secondary PK parameter values.</p> <p>Overall, the data support the hypothesis of a statistically significant relationship between drug exposure and occurrence of at least one treatment-emergent AE with NCI CTC Grade ≥3.</p> <p>Overall, the data did not support the hypothesis of a statistically significant relationship between drug exposure and occurrence of at least one serious AE.</p>

22. Conclusion

The main results from the population PK analysis and exposure-response analyses were the following:

- The plasma concentration-time course for both entrectinib and M5 in cancer patients were best described by a one-compartment for each entity with first-order elimination and with a sequential zero- and first-order absorption processes.

- The elimination half-life of entrectinib was estimated to be 19.5 hour and the PK of M5 was found to be formation rate limited.

- The mean AUC accumulation ratio of both entrectinib and M5 following 600 mg QD dosing was estimated to be approximately 1.9.

- Body weight was found to influence the apparent clearance (CL/F) and apparent volume of distribution (V/F) for both entrectinib and M5. This intrinsic baseline covariate was included in the model in accordance with the principles of allometric scaling by using a coefficient of 0.75 and a coefficient of 1.0 for clearance and volume related parameters, respectively.

- Pediatric cancer patients receiving formulation F1 had 28.2% lower bioavailability compared to the adult cancer patients who received the F2A formulation.

- Aside from the body weight effect in general, and the formulation effect in pediatrics, no other covariate had a marked influence on entrectinib and M5 PK.

- A dose of 300 mg/m² in the pediatric population with body weights ranging from 15 to 50 kg was predicted to produce similar exposure compared to the administration of 600 mg flat dose QD in adults.

- Both in NTRK fusion positive and ROS1+ NSCLC patients, the extent of efficacy was similar across the observed range of drug exposure suggesting that a plateau of efficacy has been reached at the dose of 600 mg QD.

- Higher exposure was not associated with higher risk of QT prolongation however the analysis was limited as no time-matched baseline correction of QTcF could be made.

- Higher frequency of serious adverse events or grade 3 or above AE (as defined by CTCAE v4.03) were observed at higher exposure (combined for entrectinib and M5). The frequency of these events was significantly increased at exposure levels typically attained with doses equal to or exceeding 800 mg QD.

Applicant (Marketing Authorization Holder)

F. Hoffmann-La Roche Ltd


F. Hoffmann-La Roche Ltd
International Regulatory
Basel, Switzerland
Peter Lindinger


F. Hoffmann-La Roche L.
International Regulator
Basel, Switzerland
Erika Eckel