2.6.6 毒性試験の概要文の目次

略語一覧 3
2.6.6.1　まとめ 5
2.6.6.2　単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.1　ラット単回投与毒性試験 10
2.6.6.2.2　イヌ単回投与毒性試験 10
2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 11
2.6.6.3.1　マウス反復投与毒性試験 11
2.6.6.3.1.1　マウス 2 週間混餌投与予備毒性試験 11
2.6.6.3.1.2　マウス 13 週間混餌投与毒性試験 12
2.6.6.3.2　ラット反復投与毒性試験 13
2.6.6.3.2.1　ラット 2 週間反復投与予備毒性試験 13
2.6.6.3.2.2　ラット 4 週間反復投与毒性試験（2 週間休薬） 14
2.6.6.3.2.3　ラット 13 週間反復投与毒性試験 16
2.6.6.3.2.4　ラット 26 週間反復投与毒性試験 17
2.6.6.3.3　イヌ反復投与毒性試験 19
2.6.6.3.3.1　イヌ 2 週間反復投与予備毒性試験 19
2.6.6.3.3.2　イヌ 4 週間反復投与毒性試験 20
2.6.6.3.3.3　イヌ 13 週間反復投与毒性試験 22
2.6.6.3.3.4　イヌ 39 週間反復投与毒性試験 23
2.6.6.4　遺伝毒性試験 25
2.6.6.4.1　*In vitro* 遺伝毒性試験 25
2.6.6.4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験 25
2.6.6.4.1.2　マウスリンフォーマ TK 試験 25
2.6.6.4.2　*In vivo* 遺伝毒性試験 26
2.6.6.4.2.1　雄マウス腹腔内投与骨髄小核試験 26
2.6.6.4.2.2　雄ラット小核試験（ラット 26 週反復投与毒性試験内実施） 26
2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 27
2.6.6.5.1　マウス 2 年間混餌投与がん原性試験 27
2.6.6.5.2　ラット 2 年間経口投与がん原性試験 30
2.6.6.6　生殖発生毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 32
2.6.6.6.1　受胎能及び初期胚発生試験 32
2.6.6.6.1.1　ラット受胎能及び初期胚発生試験 32
2.6.6.6.2　胚・胎児発生試験 32

2.6.6.6.2.1　ラット胚・胎児発生毒性試験 32
2.6.6.6.2.2　ウサギ胚・胎児発生毒性試験 33
2.6.6.6.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 35
2.6.6.6.3.1　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する用量設定試験 35
2.6.6.6.3.2　ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 36
2.6.6.6.4　幼若動物毒性試験 37
2.6.6.6.4.1　幼若ラット 4 週間反復投与用量設定試験 37
2.6.6.6.4.2　幼若ラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験（4 及び 8 週間休薬） 38
2.6.6.7　局所刺激性試験 41
2.6.6.8　その他の毒性試験 41
2.6.6.8.1　抗原性 41
2.6.6.8.2　免疫毒性 41
2.6.6.8.3　機序検討 41
2.6.6.8.3.1　雄 Long Evans ラット 2 週間反復投与予備毒性試験 41
2.6.6.8.3.2　雄 Long Evans ラット 13 週間反復投与毒性試験 42
2.6.6.8.4　依存性 43
2.6.6.8.5　代謝物 43
2.6.6.8.6　不純物 44
2.6.6.8.7　In vitro 3T3 NRU（ニュートラルレッド取り込み）光毒性試験 44
2.6.6.9　考察及び結論 45
2.6.6.10　図表 61
引用文献一覧 62

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
AUC	Area under the plasma concentration vs time curve, Area under the plasma concentration vs time curve from zero to infinity	濃度 - 時間曲線下面積、 投与 0 時間から無限大時間までの濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{0-24}	Area under the plasma concentration vs time curve from zero to 24 hours	血漿中の投与 0 時間から 24 時間までの濃度 - 時間曲線下面積
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシン一リン酸
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣細胞
C_{max}	Maximum concentration (in plasma)	血漿中最高濃度
$C_{max,u}$	Maximum concentration of unbound fraction	血漿中最高非結合型濃度
CTX I	C-terminal telopeptide of type I collagen	Ⅰ型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
CTX II	C-terminal telopeptide of type II collagen	Ⅱ型コラーゲン架橋 C-テロペプチド
EC_{50}	Half maximal effective concentration	50%有効濃度
ECG	electrocardiogram	心電図
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
fu	fraction unbound	血漿中非結合型分率
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HFrEF	Heart Failure with reduced Ejection Fraction	駆出率の低下した慢性心不全
ICH	International Council for Harmonisation of Techinical Requirement for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IP	Intraperitoneal	腹腔内
LOEL	Lowest observed effect level	最小影響量
LH	Luteinizing hormone	黄体ホルモン
MoE	Margin of exposure	曝露マージン
MRHD	Maximum recommended human dose	最高推奨臨床用量
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐量
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
NRU	Neutral red uptake	ニュートラルレッド取り込み
PDE	Phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク

略語	英語名称	日本語名称
PIF	Photo-irritation-factor	光毒性係数
PINP	Procollagen type I N-terminal propeptide	Ⅰ型プロコラーゲン-N-プロペプチド
PTH	Parathyroid hormone	副甲状腺ホルモン
QT	Time between start of Q wave and end of T wave in the ECG	QT 間隔
QT_{cB}	QT interval corrected according to Bazett's formula	Bazett 補正 QT 間隔
QT_{cF}	QT interval corrected according to Fridericia's formula	Fridericia 補正 QT 間隔
RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone system	レニン･アンジオテンシン･アルドステロン系
RBC	Red blood cell	赤血球
sGC	Soluble guanylate cyclase	可溶性グアニル酸シクラーゼ
SS	Steady state	定常状態
t_{max}	Time to reach C_{max}	血漿中最高濃度到達時間
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
UVA	Ultraviolet A	長波長紫外線
v/v/v	Volume/volume/volume	－

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

ベルイシグアト（BAY 1021189 又は MK-1242）は、成人の慢性心不全の治療薬として開発されている可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激薬である。現行の試験ガイドライン及び規制要件に従って、ベルイシグアトの長期使用に伴う毒性及びトキシコキネティクスプロファイルを明らかにし、本化合物のヒトへの経口投与を支持するため、非臨床毒性試験でベルイシグアトを評価した。これらの試験の一覧を表 2.6.6.1- 1 に示し、結果を以下に記載する。

慢性心不全の治療に使用される予定の最高推奨臨床用量（MRHD）は、10mg の 1 日 1 回経口投与である。非臨床リスク評価及び安全域の算出は、母集団薬物動態モデルを用い、MRHD における曝露量（AUC）に基づいて行った。

臨床での投与経路と同様、動物の毒性試験においても経口投与を用いた。患者への長期投与を支持するため、ラットで最長 26 週間、イヌで最長 39 週間の連日投与による反復投与毒性試験を実施した。ラットとイヌは、ベルイシグアトの薬理作用に反応することが確認されており、薬物動態が許容可能で、これらの動物種及びヒトの代謝プロファイルが類似していることに基づいて、それぞれげっ歯類及び非げっ歯類として選択した。

また、医薬品規制調和国際会議（ICH）の標準的な一連の遺伝毒性試験〔細菌を用いた変異原性試験及びマウスリンフォーマ試験（*in vitro*）、並びにマウス骨髄及びラット末梢血小核試験（*in vivo*）〕及び生殖発生毒性試験（ラットの受胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギの胚・胎児発生に関する試験、ラットの出生前及び出生後の発生に関する試験、並びにラットの幼若動物毒性試験）を実施した。

更に、マウスがん原性試験の用量及び投与媒体を選択するため、短期間の予備試験を含む、投与期間を最長 13 週間とする用量設定試験を実施した。ベルイシグアトを長期投与する 2 年間がん原性試験は、ラット及びマウスを用いて実施した。

加えて、*in vitro* 光毒性試験及び有色ラットを用いた最長 13 週間投与による機序検討試験も実施した。

重要な試験はすべて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。すべての試験は Bayer 社（ドイツ）の毒性部門又は [redacted] 社（英国）で実施した。

表 2.6.6.1- 1 毒性試験一覧

Duration/ Study Type	Route	Species	Dose Levels (mg/kg/day*)	NOAEL (mg/kg/day)	Location in CTD/Report No. (GLP Status)
Repeat-dose toxicity					
2-week with TK	Oral, Diet	Mouse, CD-1	0, 100, 300, 1000 ppm corresponding to 0, 17, 53, 166 (males); 0, 28, 79, 257 (females))	1000 ppm	4.2.3.2.1/ PH-38271 (Non-GLP)
13-week with TK	Oral, Diet	Mouse, CD-1	0, 5, 15, 50	50	4.2.3.2.2/ PH-38233 (GLP)
2-week, TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 10, 30, 100 for 14 days 0, 100 for 3 days	10	4.2.3.2.3/ PH-40501 (Non-GLP)
4-week with 2-week recovery & TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 15, 30, 60	<15	4.2.3.2.4/ PH-36714 (GLP)
13-week with TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 3, 10, 30	10	4.2.3.2.5/ PH-37470 (GLP)
26-week with TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 3, 10, 30	30	4.2.3.2.6/ PH-37899 (GLP)
2-week with TK	Oral, gavage	Dog, Beagle	0, 1, 3, 10	10	4.2.3.2.7/ PH-40741 (Non-GLP)
4-week with TK	Oral, gavage	Dog, Beagle	0, 2.5, 7.5, 25/15	2.5	4.2.3.2.8/ PH-36756 (GLP)
13-week with TK	Oral, gavage	Dog, Beagle	0, 1.25, 2.5, 5	5	4.2.3.2.9/ PH-37477 (GLP)
39-week with TK	Oral, gavage	Dog, Beagle	0, 0.5, 1.5, 5	5	4.2.3.2.10/ R-9363 (GLP)
Genotoxicity					
Microbial mutagenesis assay	*In vitro*	*Salmonella typhimurium* strains TA 1535, TA 100, TA 1537, TA 98 and TA 102	≤5000 µg/plate +/- S9 (precipitation ≥2500 µg/plate)	Negative	4.2.3.3.1.1/ A51658 (GLP)
Mouse lymphoma test	*In vitro*	Mouse lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ cell line	3-hour: +/- S9: 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL; 24-hour -S9: 10, 25, 50, 100 µg/mL (precipitation ≥100 µg/mL)	Negative	4.2.3.3.1.2/ A52063 (GLP)
Micronucleus induction assay	IP (2 doses)	Mouse, NMRI	0, 31.25, 62.5, 125	Negative	4.2.3.3.2.1/ A51623 (GLP)
Micronucleus assay included in 26-week study with TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 3, 10, 30	Negative (30)	4.2.3.2.6/ PH-37899 (GLP)

Duration/ Study Type	Route	Species	Dose Levels (mg/kg/day*)	NOAEL (mg/kg/day)	Location in CTD/Report No. (GLP Status)
Carcinogenicity					
104-week with TK	Oral, Diet	Mouse, CD-1	0, 5, 15, 50, 150 (males) 0, 6, 20, 60, 250 (females)	150** (male) 250** (female)	4.2.3.4.1.1/ R-13312 (GLP)
104-week with TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 2, 6, 20	6**	4.2.3.4.1.2/ R-13305 (GLP)
Reproductive & developmental toxicity					
Fertility & early embryonic development	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 5, 15, 50	50 (Fertility & Early Embryonic Development); 15 (Systemic tolerability)	4.2.3.5.1.1/ PH-37948 (GLP)
Embryo-fetal development with TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 5, 15, 50	5 (Maternal Tox); 50 (Developmental Tox)	4.2.3.5.2.1/ PH-38325 (GLP)
Embryo-fetal development with TK	Oral, gavage	Rabbit, New Zealand White	0, 0.75, 2.5, 7.5	0.75 (Maternal & Developmental Tox)	4.2.3.5.2.2/ PH-38326 (GLP)
Pilot pre- & postnatal development	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 30, 50	<30	4.2.3.5.3.1/ R-11952 (Non-GLP)
Pre- & postnatal development	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 7.5, 15, 30	7.5	4.2.3.5.3.2/ R-12839 (GLP)
Juvenile animals, pilot 4-week with TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 3, 10, 30	10	4.2.3.5.4.1/ PH-38809 (Non-GLP)
Juvenile animals, pivotal 4-week and 13-week (with 4-week or 8-week recovery) & TK	Oral, gavage	Rat, Wistar	0, 1, 3, 10	3	4.2.3.5.4.2/ PH-39764 (GLP)
Other toxicity studies					
Mechanistic study in pigmented rats, pilot 2-week with TK	Oral, gavage	Rat, Long-Evans	0, 10, 30	30	4.2.3.7.3.1/ PH-38568 (Non-GLP)
Mechanistic study in pigmented rats, pivotal 13-week with TK	Oral, gavage	Rat, Long-Evans	0, 10, 30	30	4.2.3.7.3.2/ PH-38403 (GLP)
Phototoxicity, 3T3 NRU test	*In vitro*	Mouse fibroblasts (3T3.A31)	Up to 60 µg/ml	Non-phototoxic	4.2.3.7.7.1/ PH-36774 (GLP)

TK = toxicokinetics; GLP = Good Laboratory Practice; NMRI = Naval Medical Research Institute; NOAEL = no observed adverse effect level; NRU = neutral red uptake
* except 2-week mouse feeding study: dose level unit = ppm
** dose with no test article-related neoplastic findings

- 非臨床安全性プロファイルの要約を以下に示す。

  - すべての動物種で、ベルイシグアト反復投与後の毒性プロファイルの特徴として、細胞に cGMP 濃度上昇をもたらす sGC 刺激の過度な薬理作用が認められた。

  - マウスでは、cGMP 濃度の上昇に起因する平滑筋弛緩により、消化管運動への影響が認められた。また、血管拡張及び血行動態作用に続発する有害でない摂水量の増加、それに関連したクレアチニン及び尿素の減少並びにわずかな血液希釈が認められた。

  - ラットでは、毒性プロファイルの特徴として、血行動態及び消化管への影響と、それらに続発した変化が認められた。また、成長期のラットでは、骨代謝及び骨形態の変化が認められた。2 週間の休薬期間を設けた 4 週間反復投与試験で、すべての所見が回復又は回復傾向を示した。完全に成長した成体ラットやイヌにおいて、骨の病理組織学的所見や骨バイオマーカーの変化が認められなかったことから、成長期のラットにみられた骨所見は、成人患者集団において重要なものではないと考えられる。

  - イヌでは、毒性プロファイルの特徴として、マウス及びラットと同様に消化管及び血行動態への影響と、それらに続発する変化が認められた。

  - 毒性に定性的又は定量的に顕著な雌雄差は認められなかった。

  - 受胎能及び初期胚発生に対するベルイシグアトの影響は認められなかった。

  - 母体忍容性、胚・胎児発生、並びに出生前及び出生後早期の発生に関して、ベルイシグアトの薬理作用の影響が認められた。
    ラット及びウサギで、ベルイシグアトの催奇形性は認められなかった。

  - 幼若ラットにおいて、成長期のラット又は成体ラットに比べて新たな標的臓器は認められず、発達への影響もみられなかった。

  - 標準的な一連の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験において、遺伝毒性は認められなかった。

  - *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み（NRU）光毒性試験において、光毒性は認められなかった。

  - マウス 2 年間がん原性試験において、発がん性は認められなかった。

  - ラット 2 年間がん原性試験では、統計学的に有意でない良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫の増加傾向と、それぞれの過形成病変が高用量の雄で観察された。これらの所見は、2 年間にわたる持続的な血圧低下によるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系（RAAS）とアドレナリン作動系の代償性及び反復性の活性化に起因し、以下の理由からヒトに関連するとは考えられない。(1) ラットはこれら 2 種の腫瘍発生に対する感受性が高いことが知られている 、(2) 臨床用量に比してかなりの高用量（MRHD の AUC_u 比で 41 倍）でのみ認められ、発生機序が判明している（他の降圧薬でもみられており、ヒトへの外挿性が低いことが知られている）、(3) 十分な安全域がある（MRHD の AUC_u 比で 12 倍まで認められていない）。
    すなわち、ラット及びマウスのがん原性試験結果から、MRHD であるベルイシグアト 10mg に、ヒトへの発がんリスクがないことが示唆された。

- ヒト血漿中のベルイシグアトの主要代謝物である M-1（BAY 1222707）は、N-グルクロン酸抱合体であり、sGC に対する薬理活性やオフターゲット作用はみられなかった。

ベルイシグアトの広範な非臨床安全性評価により、オフターゲット毒性がないことが明らかになった。非臨床安全性プロファイルの主な特徴として、細胞内 cGMP 濃度上昇に起因するベルイシグアトの過度な薬理作用が認められた。遺伝毒性、光毒性、生殖発生毒性、幼若動物毒性及びがん原性試験において、懸念される所見は認められなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 ラット単回投与毒性試験

げっ歯類を用いたベルイシグアトの単回投与毒性試験は実施していないが、ラットを用いた反復投与毒性試験の中で最高用量（100mg/kg/日）を投与した 2 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.1）の成績から、単回経口投与時の影響を考察した。

2 週間反復投与毒性試験において、ベルイシグアトの 0、10、30 及び 100mg/kg/日をラットに強制経口投与した。100mg/kg/日群の雄 1 例が 4 日目に死亡した（死亡発見）。死因はベルイシグアトの血圧低下作用による状態悪化の可能性が高いと考えられた。いずれの群においても投与初日に一般状態の変化は観察されず、投与初期（3 日目まで）の変化は 100mg/kg 群で 2 日目から認められた立毛のみであった。投与初期に動物が死亡しなかったことから、ラットにおける単回経口投与時の概略の致死量は 100mg/kg より大きいと考えられた。

2.6.6.2.2 イヌ単回投与毒性試験

非げっ歯類を用いたベルイシグアトの単回投与毒性試験は実施していないが、イヌを用いた反復投与毒性試験の中で最高用量（25mg/kg/日）を投与した 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.3.2）の成績から、単回経口投与時の影響を考察した。

4 週間 GLP 反復投与毒性試験において、ベルイシグアトの 0、2.5、7.5 及び 25mg/kg/日（投与開始時用量）をビーグル犬に強制経口投与した。投与初期（1 週目）に死亡例は認められず、投与 1 週目にみられた一般状態の変化は、全用量群の強い脈動（stronger pulse baets）、7.5mg/kg/日以上の群の嘔吐、25mg/kg 群の振戦（雌 1 例）であった。以上の成績から、イヌにおける単回経口投与時の概略の致死量は 25mg/kg より大きいと考えられた。

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1　マウス反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1　マウス 2 週間混餌投与予備毒性試験

参照項目 4.2.3.2.1　　PH-38271

非 GLP 予備毒性試験において、各群雌雄各 6 例の CD-1 マウスに、100、300 及び 1000ppm のベルイシグアトを 2 週間混餌投与した。投与期間中の被験物質の平均投与量は、体重及び摂餌量に基づき、雄で 0、17、53 及び 166mg/kg/日、雌で 0、28、79 及び 257mg/kg/日であった。トキシコキネティクス（TK）の検討のためにサテライト群を設け、11 日目に各時点 3 例から採血した。

一般状態を毎日観察した。体重、摂餌量及び摂水量は、定期的に測定した。臨床検査用の血液は、試験終了付近の時点で採取した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。

検討した最高濃度まで忍容性は良好であった。ベルイシグアト投与に関連した死亡例は認められず、体重及び摂餌量に被験物質投与に関連した影響は認められなかった。一般状態の変化として、全用量群の雄と 1000ppm 群の雌で腹囲の増加が認められ、平滑筋弛緩による消化管運動への影響によるものと考えられた。

摂水量のわずかな増加が 1000ppm 群の雌及び全用量群の雄に認められたが、これは有害でなく、被験物質投与に関連した血管拡張作用に続発した変化と考えられた。これに付随して、1000ppm 群の雌でクレアチニンの軽度の減少が、雌雄で尿素の軽度の減少が認められた。血液学的検査では、300ppm 及び 1000ppm 群（雌のみ）における赤血球及びヘマトクリットの軽度な減少と、100ppm 以上の群の雌における、用量依存性のない MCH 値の軽度な増加がみられた。この試験で認められたわずかな血液希釈は、他の血管拡張薬でも同様の報告があることから[1)]、被験物質の血行動態作用に続発する変化であり、明らかな用量依存性が認められず、対照群との差もごくわずかであったことから、毒性学的意義はないと考えられる。

器官重量に関して、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。剖検では、被験物質投与による毒性学的に意義のある変化は認められなかった。1000ppm の高用量群の雌 2 例に盲腸拡張が認められたが、関連する病理組織学的変化がみられなかったことから、有害でないと考えられた。

病理組織学的検査では、1000ppm 群の雄で軽微～軽度な適応性の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。1000ppm 群の一部の雌の卵巣に黄体のわずかな減少が認められたが、性周期に影響はみられなかった。これらの所見はいずれも軽度であり有害ではないと考えられた。

TK データを表 2.6.6.3- 1 に要約する。雄の曝露量〔$AUC_{(0\text{-}24)\ norm}$〕は、雌よりもわずかに高かった（1.39～1.58 倍）。11 日目の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、ほぼ用量に比例して増加した。夜の摂餌量が多かったことに関連して、午前 7 時か午後 11 時のいずれかが T_{max} であった。雄の曝露量が雌よりもわずかに高かった（1.39～1.58 倍）。

表 2.6.6.3- 1 マウス 2 週間混餌投与予備毒性試験における定常状態の曝露量（11 日目）

		Males			Females		
Diet conc.	[ppm]	100	300	1000	100	300	1000
Dose[a]	[mg/kg]	17	46	167	24	72	241
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	27900	77800	242000	28800	75900	230000
$AUC_{(0-24)\ norm}$	[kg·h/L]	1.67	1.68	1.45	1.20	1.06	0.952
C_{max}	[µg/L]	1780	5230	14200	1730	4500	14500
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.107	0.113	0.0849	0.0716	0.0629	0.0600
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	95.1	100	97.4	100	100	100
t_{max}	[h]	7	23	7	23	23	7

[a] Based on daily substance intake of satellite animals

本試験で認められたすべての影響はベルイシグアトの薬理作用の二次的な変化と考えられ、有害でなかったことから、無毒性量（NOAEL）は 1000ppm（雄は 166mg/kg/日、雌は 257mg/kg/日に相当）と推定された。

2.6.6.3.1.2 マウス 13 週間混餌投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.2 PH-38233

マウスがん原性試験の用量選択のため、各群雌雄各 10 例の CD-1 マウスに目標用量 0、5、15 及び 50mg/kg/日のベルイシグアトを 13 週間混餌投与した。動物は、試験開始時に 6 週齢であった。TK の検討用にサテライト群を設け、2 日目、5 週目及び投与終了付近（76 日目）の各時点 3 例から採血を行った。用量は、2 週間混餌投与予備毒性試験成績（2.6.6.3.1.1）及び MRHD での推定曝露量を考慮して設定した。投与期間中の被験物質の平均投与量は、体重及び摂餌量に基づき、雄で 0、4.96、14.78 及び 49.65mg/kg/日、雌で 0、5.01、15.77 及び 49.57mg/kg/日であった。

一般状態を 1 日 2 回観察した。体重、摂餌量及び摂水量は毎週記録した。臨床検査は 12 及び 13 週目に実施した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量の測定後に病理組織学的検査を実施した。

マウスにおけるベルイシグアトの忍容性は 50mg/kg/日まで良好であり、オフターゲット毒性や用量制限毒性の徴候はみられなかった。死亡例は認められず、ベルイシグアト投与による体重増加への影響もみられなかった。一般状態や摂餌量にも、投薬の影響は認められなかった。

摂水量は、雌雄とも全用量群で増加し、ベルイシグアトの血行動態作用による二次的な変化と考えられた。また、50mg/kg/日群の雌におけるクレアチニン及び尿素のわずかな減少、5 及び 15mg/kg/日群の雄におけるクレアチニンのわずかな減少（高用量では認められない）に関連していた。これらの変化は軽度であり有害でなく、ベルイシグアト投与に関連した血管拡張作用による二次的な変化と考えられた。これ以外の生化学的検査には、ベルイシグアト投与に関連した影響は認められなかった。病理学的検査では、最高用量 50mg/kg/日まで剖検及び病理組織学的異常所見は認められなかった。

TK データを表 2.6.6.3- 2 に要約する。ベルイシグアトの 76 日目の曝露量（AUC 及び C_{max}）は用量比例的に増加した。2 日目及び 35 日目に比べて 76 日目の曝露量に大きな変化はみられなかった。雄の曝露量は雌よりもわずかに高かった（1.47～1.67 倍）。

表 2.6.6.3- 2 マウス 13 週間混餌投与毒性試験における定常状態の曝露量（76 日目）

		Males			Females		
Nominal Dose	[mg/kg]	5	15	50	5	15	50
Actual Dose[a]	[mg/kg]	4	12	48	5	11	50
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	10800	36100	128000	7340	19500	89400
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	2.61	2.95	2.64	1.57	1.77	1.79
C_{max}	[µg/L]	559	1820	6710	370	941	4430
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.136	0.149	0.139	0.0792	0.0855	0.0885
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	82.4	88.8	71.8	100.0	86.5	65.6
t_{max}	[h]	14.0	14.0	5.00	0	5.00	5.00
R_{A3}		0.7	0.8	0.9	0.9	0.7	1.0
R_{A1}		0.9	0.9	1.0	0.9	0.7	1.2

[a] Based on daily substance intake of satellite animals
$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,Day\ 2.}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 2.}$

本試験で認められたすべての影響がベルイシグアトの薬理作用による二次的な変化と考えられ、有害でなかったことから、NOAEL は 50mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.2 ラット反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1 ラット 2 週間反復投与予備毒性試験

参照項目 4.2.3.2.3 PH-40501

非 GLP 反復投与予備毒性試験において、各群雌雄各 5 例の Wistar ラットに、0、10、30 及び 100mg/kg/日のベルイシグアトを 2 週間反復強制経口投与した。対照群及び高用量群は 3 日間投与後に安楽死させる群も設定した。TK 用サテライト群を設け、1 日目と投与終了付近に各時点 3 例から採血した。ベルイシグアトはエタノール／Solutol HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。動物は、投与開始時に 6～8 週齢であった。

一般状態を定期的に観察した。体重、摂餌量及び摂水量を定期的に記録した。臨床検査（血液学的検査及び生化学的検査）は 14 日目に実施した。3 日間投与後又は試験終了時に生存動物を安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。試験終了時に、肝臓の酵素活性を測定するための検体を採取した。

10 及び 30mg/kg/日群は 2 週間投与しても死亡例はなく良好な忍容性が認められたが、100mg/kg/日群では血行動態及び消化管への影響により最大耐量（MTD）を超え、4 日目に雄 1 例が死亡した。100mg/kg/日群では体重が減少し（雄で最大 20%、雌で最大 13%）、器官重量の変化（肝臓、胸腺、脾臓、前立腺及び精嚢重量低下）、肝脂肪の減少（トリグリセリド低下と関連する）や前立腺／精嚢又は子宮の萎縮などの病理組織学的所見を含む二次的な所見を伴う全身状態の悪化（振戦、立毛、下痢など）が認められた。ベルイシグアトの血行動態作用による状態悪化の所見として、30mg/kg/日以上の群の雄で立毛が認められた。更に、100mg/kg 群において、腎臓（雄 2 例の尿細管肥大／過形成及び雌 1 例の尿細管萎縮／拡張）及び肝臓（雌雄の胆管明瞭化）に軽微な変化がみられた。

10 又は 30mg/kg/日では、ベルイシグアトの作用機序による心血管系及び消化管に対する影響、並びに血行動態に関連した変化として、10mg/kg/日以上の群の雌及び 30mg/kg/日群の雄における摂水量の増加、投与 1 週目の摂餌量の減少、30mg/kg/日群の雄における下痢、病理組織学的所見（心血管明瞭化、小腸のパネート細胞明瞭化、副腎の球状帯明瞭化及び束状帯肥大／空胞化）などが認められた。更に、30mg/kg/日以上では、薬理作用に起因する骨の変化（成長板の変化及び過骨症）も認められた。

アルドリンエポキシダーゼ（ALD）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GS-T）、エポキシドヒドロラーゼ（EH）及びカルニチンアセチルトランスフェラーゼ（CAT）の変化は、明らかな用量反応関係が認められなかったこと及び／又は雌雄間の変化に一貫性がなく、変動の範囲内であり、有害ではないと考えられた。血液学的検査においても毒性変化はみられなかった。

TK データを表 2.6.6.3- 3 に要約する。ベルイシグアトの曝露量（AUC 及び C_{max}）の増加は用量比を下回り、この傾向は雄でより顕著であった。雌の曝露量が雄よりもわずかに高かった（1.15～1.53 倍）。

表 2.6.6.3- 3 ラット 2 週間反復投与予備毒性試験における定常状態の曝露量（15 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	10	30	100	10	30	100
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	30700	75900	179000	35400	98000	274000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	3.07	2.53	1.79	3.54	3.27	2.74
C_{max}	[µg/L]	3080	7530	13100	3480	9420	23100
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.308	0.251	0.131	0.348	0.314	0.231
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	1.93	2.48	19.1	3.17	3.95	10.3
t_{max}	[h]	4.00	4.00	4.50	7.00	4.50	7.00

毒性所見として、100mg/kg/日に全身状態の悪化（立毛は 30mg/kg から）が、30mg/kg/日以上で過度な薬理作用による骨の病理組織学的所見が認められたことから、NOAEL は 10mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.2.2 ラット 4 週間反復投与毒性試験（2 週間休薬）

参照項目 4.2.3.2.4 PH-36714

2 週間の休薬期間を設けた 4 週間反復投与毒性試験において、各群雌雄各 10 例の Wistar ラットに 0、15、30 及び 60mg/kg/日のベルイシグアトを反復強制経口投与した。用量は、2 週間反復投与毒性試験において、100mg/kg/日が MTD を超えたことに基づいて選択した（2.6.6.3.2.1）。ベルイシグアトはエタノール／Solutol HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。ラットは対照（溶媒）群 1 群と投与群 3 群に無作為に割り付けた。TK 評価用に、追加のラットを各用量群に割り付けた。また、別に 2 週間休薬群として各群雌雄各 10 例を対照群及び高用量群に設定した。動物は、投与開始時に約 6 週齢であった。

一般状態を定期的に観察した。体重、摂餌量及び摂水量は、定期的に記録し、眼科学的検査も行った。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）は 3 又は 4 週目（主試験群の動物）及び休薬期間終了付近に実施した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。剖検時に、肝臓中の酵素活性を測定するための検体を採取した。また、免疫毒性学的検査〔脾臓細胞数、脾臓細胞サブポピュレーション解析、血清抗体価（IgG、IgA 及び IgM）の分析〕も実施した。TK 用の採血は、試験の 1 日目と投与終了付近の時点（22 日目）で行った。

被験物質投与に関連した死亡は認められなかった。一般状態観察では、薬理作用に関連した消化管症状（全用量群で発現率に大差がなかった糞の性状の変化及び流涎の増加、並びに高用量群における腹囲の増加）が認められた。歩行に対する用量依存的な影響（高足歩行、失調性歩行及び活動性低下）が低用量から認められた。また、30mg/kg/日以上で、興奮行動（穴掘り及びクリーニングなど）が認められた。効力を裏付ける試験（2.6.2.2.2）及びラットの安全性薬理試験（2.6.2.4.2）に基づいて、15mg/kg/日以上では過度な薬理作用（顕著な血管拡張、血圧低下及び体温低下）が生ずると予想されることから、この反復投与毒性試験で認められた行動及び歩

行の一過性の異常は、こうした過度な薬理作用による二次的な変化と考えられる。高用量（60mg/kg/日）では、全身状態の悪化を示す更なる一般状態の変化（立毛、筋緊張低下、うずくまり姿勢）が認められており、これらもベルイシグアトの顕著な血行動態及び消化管への影響によるものと考えられる。一般状態所見の多くは回復期間中にも認められたが、発現頻度が低下したことから、これらの所見の可逆性が示された。全身状態悪化の更なる徴候として、1 週目に体重増加抑制に加えて体重減少がみられ、一過性の摂餌量の減少が認められた（いずれも投与期間中に回復）ほか、前立腺及び精嚢の重量減少及び萎縮が認められた。

2 週間予備試験と同様に、薬理作用に起因すると考えられる、摂水量の有害でない用量依存的な増加が認められ、付随して血液希釈に続発する多くのパラメータの軽度な低下（クレアチニン、複数の電解質、赤血球（RBC）パラメータ、総タンパク、コレステロール及びトリグリセリドなど）が高用量でみられた。尿検査では、用量に依存した尿量の増加と関連するパラメータの減少（比重、クレアチニン、タンパク質等）が認められた。この試験で認められた肝代謝酵素活性の変化は、他の反復投与毒性試験の対照群の範囲内であるか、雌雄いずれかのみで認められるか、及び／又は明らかな用量反応関係がみられず、毒性学的意義はないと考えられた。T3、T4 又は TSH を含む甲状腺ホルモン濃度に対して、毒性学的に意義のある影響は認められなかった。

眼科学的又は免疫毒性学的評価では、60mg/kg/日まで、被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

雌雄の全用量群で、尿沈渣に結晶様の構造が観察された。腎臓及び膀胱に変性性又は再生性の病変がみられなかったこと、及び 2 週間の回復期間の終了時には結晶が認められなかったことから、この所見は有害でないと考えられる。

また、剖検では 15mg/kg/日以上の群の雄及び 60mg/kg/日群の雌に腸の延長が認められ、組織学的に回腸及び空腸における軽微～軽度なパネート細胞肥大との関連がみられた。

更に、心臓、副腎、骨、肝臓及び腎臓にも病理組織学的所見が認められた。心臓では、30mg/kg/日以上の群の雄及び 60mg/kg/日群の雌に変性や壊死を伴わない血管明瞭化が認められ、ベルイシグアトの降圧作用によるものと考えられた。この変化は、休薬群の数例の高用量群（雄 10 例中 2 例及び雌 10 例中 1 例）にも継続してみられたが、発現頻度が低下したことから、2 週間休薬後の回復性が示された。全身血管抵抗低下に対する RAAS の逆調節により、全用量で副腎に対する影響として球状帯及び束状帯の肥大が認められ、高用量群の副腎重量が増加又は増加傾向を示した。2 週間休薬後、副腎の重量増加／増加傾向は残存していたが、病理組織学的所見は完全に回復した。60mg/kg/日群での雌で肝臓重量が増加し、軽微～軽度の肝細胞肥大が同群の雄で、軽微～軽度の胆管周囲の脂肪沈着が 30mg/kg/日群の雌及び 60mg/kg/日群の雌雄で認められた。休薬後、重量増加及び肝細胞肥大は完全に回復した。

他の sGC 刺激薬を急成長中の動物へ反復投与した場合にみられているように、15mg/kg/日以上では、大腿骨（脛骨）成長板の肥厚及びリモデリングプロセス（過骨症）を特徴とする骨の病理組織学的所見が認められた。これらの骨変化は 2 週間の休薬後、回復又は回復傾向を示した。

胆管明瞭化（60mg/kg/日のみ）及び腎臓の遠位尿細管肥大は、これらに関連する変性性の変化を伴わず、2 週間の休薬中に完全に回復したことから、毒性学的意義は低いと考えられる。腎臓では好塩基性尿細管の減少が認められた。

TK データを表 2.6.6.3- 4 に要約する。ベルイシグアトの AUC 及び C_{max} は、15mg/kg/日から 30mg/kg/日までは用量に比例して増加したが、30mg/kg/日から 60mg/kg/日までの増加は用量比をわずかに下回った。雌雄に曝露量の差は認められなかった。

表 2.6.6.3- 4 ラット 4 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（22 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	15	30	60	15	30	60
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	74600	152000	240000	86400	158000	253000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	4.97	5.06	4.00	5.76	5.26	4.21
C_{max}	[µg/L]	8004	16042	23602	8982	15583	24258
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.534	0.535	0.393	0.599	0.519	0.404
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	2.05	1.87	3.28	1.80	2.87	2.76
t_{max}	[h]	4.00	7.00	7.00	7.00	4.00	7.00
R_{A1}		1.7	2.1	2.3	1.8	1.9	2.1
R_{A3}		1.5	1.4	1.1	1.6	1.1	1.1

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1.}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1.}$

急成長中のラットにおける過度な薬理作用に関連すると考えられる骨の病理組織学的所見に基づいて、NOAEL は 15mg/kg/日未満であった。骨の変化は、2 週間の休薬期間後に回復又は回復傾向がみられた。

2.6.6.3.2.3 ラット 13 週間反復投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.5 PH-37470

13 週間反復投与毒性試験において、各群雌雄各 10 例の Wistar ラットに 0、3、10 及び 30mg/kg/日のベルイシグアトを反復強制経口投与した。用量は、4 週間反復投与毒性試験において、60mg/kg/日が MTD を超えたことに基づいて選択した（2.6.6.3.2.2）。ベルイシグアトはエタノール／Solutol HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。ラットは対照（溶媒）群 1 群と投与群 3 群に無作為に割り付けた。TK 評価用に、追加の動物を各用量群に割り付けた。投与開始時の動物は、約 7 週齢であった。

一般状態を定期的に観察した。体重、摂餌量及び摂水量は、試験中、定期的に記録し、眼科学的検査を実施した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）は 3 又は 5 週目及び投与期間終了付近に実施した。試験終了時に生存動物を安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。TK 評価用の採血は、試験の 1 日目と、定常状態となる投与終了付近（69 日目）に行った。

被験物質に関連した死亡、並びに一般状態及び体重の変化は認められなかった。試験開始時の摂餌量は、高用量である 30mg/kg/日でわずかに減少したが、試験終了時までに回復した。

より短期間の反復投与試験と同様、薬理学的な血管拡張作用による摂水量の増加と、それに関連したクレアチニンの減少が 10 及び／又は 30mg/kg/日群で認められ、リンの減少が 10mg/kg/日以上の群の雌でみられた。30mg/kg 群の雄では、関連する尿量の増加がみられた。同様に、高用量群の雌雄にトリグリセリドの減少及び総タンパクのわずかな減少が認められた。軽度な変化であり、腎臓、副甲状腺及び肝臓などに関連する病理組織学的変化がみられなかったことから、これらの所見は有害ではないと考えられる。

血液学的検査又は眼科学的検査において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

4 週間反復投与毒性試験と同様、尿沈渣に結晶様の構造が、最初の検体採取日（21／22 日目）ではすべての投与群にみられたが、試験終了付近の時点（84／85 日目）では、高用量群の雌 1 例を除いて認められなかった。また、ベルイシグアト投与に関連した尿路の変性性、再生性、過形成性及び炎症性変化は認められなかったことから、この所見は有害でないと考えられる。

剖検時、中用量以上の群の雄に副腎重量の増加が認められ、全用量群にみられた球状帯の肥大を伴う中用量以上の群の束状帯の軽微な空胞化に関連していた。これらの所見は、ベルイシグアトの降圧作用によって生じる RAAS の代償性活性化による二次的な変化であり、有害でないと考えられる。また、腸の延長、拡張及び内容物の硬さの変化も認められ、空腸及び回腸のパネート細胞肥大との関連がみられた。更に、雄 10mg/kg/日以上の群には、盲腸粘膜に軽度な炎症性細胞浸潤が認められた。これらの所見は薬理作用を介した長期にわたる消化管運動障害とそれに続く腸内毒素症及び粘膜炎症反応によるものと考えられる。これらの消化管変化は、試験期間を通じて体重減少や摂餌量減少との関連がみられなかったことから有害でないと考えられる。脾重量の増加に関連して、30mg/kg/日では髄外造血のわずかな増加が認められた。

また、心臓及び骨にも病理組織学的変化が認められた。高用量群の雄 2 例の心臓において、ベルイシグアトの強力な降圧作用に関連すると考えられるが、変性や壊死を伴わない心筋血管明瞭化が認められた。高用量群の雌雄複数例には、大腿骨のリモデリングプロセス（過骨症）が認められ、これもベルイシグアトの sGC 刺激性の作用機序と関連した変化と考えられる（毒性所見と判断）。

TK データを表 2.6.6.3- 5 に要約する。3mg/kg/日から 30mg/kg/日までは曝露量（AUC 及び C_{max}）が用量比例的に増加した。本試験では雌の曝露量が雄よりもわずかに高かった（1.39～1.46 倍）。反復投与後（69 日目）の AUC は投与初日よりも高かった（雄で最大 1.6 倍、雌で最大 2 倍）。

表 2.6.6.3- 5 ラット 13 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（69 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	3	10	30	3	10	30
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	16200	52600	146000	23500	72900	212000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	5.38	5.26	4.87	7.84	7.29	7.07
C_{max}	[µg/L]	1440	4310	10900	1930	5630	14400
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.479	0.431	0.363	0.644	0.563	0.481
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	9.7	9.7	19.5	9.3	11.8	19.0
t_{max}	[h]	4.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
R_{A3}		1.6	1.5	1.2	1.9	1.4	1.5
R_{A1}		1.5	1.6	1.6	2.0	1.5	1.9

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

13 週間の反復投与後のベルイシグアトの毒性プロファイルは、4 週間投与後の所見と同様であり、過度な薬理作用による臨床検査への影響、並びに剖検、器官重量及び病理組織学的変化を特徴としていた。急成長中のラットにおける過度な薬理作用に関連すると考えられる、30mg/kg/日の高用量群の雌雄で認められた骨の所見に基づいて、NOAEL は 10mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.2.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.6 PH-37899

ベルイシグアトを 0、3、10 及び 30mg/kg/日の用量で Wistar ラットに投与する 26 週間経口（強制）投与毒性試験を実施した。用量は、13 週間試験で 30mg/kg/日の忍容性が良好であったことに基づいて選択した（2.6.6.3.2.3）。ベルイシグアトはエタノール／Kolliphor HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。ラットは雌雄各 20 例からなる対照（溶媒）群 1 群と投与群 3 群に無作為に割り付けた。投与開始時の動物は、約 6～7 週齢であった。

一般状態を定期的に観察した。体重、摂餌量及び摂水量は、定期的に測定し、眼科学的検査を実施した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）は約 4、13 及び 26 週目に行った。更に、骨代謝に関連するパラメータを、試験終了付近の時点及び／又は終了時に測定した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検を実施し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。TK 用の採血は、1 日目と定常状態となる投与終了付近の時点（149 日目）に行った。

また、この 26 週間反復投与試験には、各用量群の雄 5 例から 140 日目に採取した末梢血を用いた小核試験を含めた。本試験の結果は遺伝毒性の項（2.6.6.4.2.2）に記載する。

被験物質投与に関連した死亡や一般状態の変化は認められず、体重への影響もみられなかった。高用量でみられた摂餌量の減少は一過性で、変化は 1 週目のみで認められた。眼科学的評価において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

4 週及び 13 週間反復投与毒性試験と同様、摂水量が増加し（雄は 30mg/kg/日、雌は 3mg/kg/日以上）、尿量の増加及び血漿クレアチニンの減少（雄では主に高用量群のすべての時点、雌では高用量群で 85 日目及び試験終了時まで）、並びに雄における電解質に対する軽微な影響（ナトリウム濃度上昇及びクロール濃度減少）との関連がみられた。これらの変化はベルイシグアトの血管拡張作用によるものであり、関連する病理組織学的所見がみられなかったこと、及び 26 週間の反復投与後に進行しなかったことから、有害でないと考えられる。

血液生化学的検査の変化は、高用量群の雄におけるコレステロールのわずかな減少のみであった。血液学的検査で、被験物質投与に関連した意義のある変化は認められなかった。

4 週及び 13 週間反復投与毒性試験と同様、10mg/kg/日以上の群の雌雄両方の尿沈渣に結晶様の構造が認められた。尿路に関連する変性性、再生性、過形成性又は炎症性の変化がみられなかったことから、これらの所見は有害でないと考えられる。

剖検時、10mg/kg/日以上で腸の延長、拡張及び内容物の硬さの変化が認められた。これらの所見は、消化管に対するベルイシグアトの作用に関連したものと考えられる。26 週間の反復投与後に関連する病理組織学的所見がみられず、体重や摂餌量に対する影響も認められなかったことから、この変化は適応性の変化であり、有害でないと考えられる。器官重量に関しては、被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

病理組織学的検査では、より短期間の投与と同様の変化が心臓、肝臓及び副腎に認められた。心臓では、高用量の雄で、冠血管系の適応性変化（心筋血管明瞭化）が認められた。更に、3mg/kg/日以上の群の雄及び 10mg/kg/日以上の群の雌に、腸間膜静脈の叢状変化が認められた。これらの所見に関連する壊死や変性性の変化は血管に認められず、26 週間の反復投与における長期にわたるベルイシグアトの過度な降圧作用に対する適応性の反応と考えられる。肝臓では、10mg/kg/日以上の群の雌に軽度な肝細胞肥大の発現頻度の増加が認められ、これは肝酵素誘導に対する適応性の反応であると考えられる。また、高用量群の雌に軽微～軽度な胆管明瞭化の発現頻度増加が認められた。肝臓に変性性の変化が認められなかったことから、この所見は、有害でない適応性の所見と考えられる。

副腎皮質では、全用量で、球状帯の軽微～軽度なびまん性肥大／過形成が雌雄両方に認められ、高用量の雄では中等度の所見もみられた。更に、低用量以上の群の雄及び中用量以上の群の雌には、副腎髄質の変化も認められた。髄質の変化は、クロム親和性細胞の活性化を示唆すると考えられる互いに異なった細胞集団によって特徴付けられる。これらの所見は、長期にわたる血管抵抗の低下によって生じた RAAS 及びアドレナリン作動系の代償性活性化による二次的な変化と考えられ、長期間の投与にもかかわらず壊死性又は変性性の変化はみられなかったことから、有害でない適応性の変化と考えられる。

種々の部位の骨（頭蓋骨、胸骨、椎骨、肋骨、大腿骨、脛骨、上腕骨）について詳細な病理組織学的検討を行った結果、成長期の急成長中のラットを用いた 13 週までの反復投与毒性試験でみられた骨又は軟骨への影響は認められなかった。骨に有害な病理組織学的所見がみられなかったことは、骨代謝に関連する複数のパラメータ（血中のパラトルモン、カルシウム、クレアチニン、CTX 及びカルシトリオール濃度、並びに尿中のカルシウム、クレアチニン及び CTX 濃度）に変化がみられなかったことと一致していた。

TK データを表 2.6.6.3- 6 に要約する。曝露量（AUC 及び C_{max}）は用量比例的に増加した。雌雄に曝露量の差は認められなかった。反復投与後の 149 日目の曝露量（AUC 及び C_{max}）は、1 日目よりも雄で 1.6～2 倍、雌で 1.3～2.5 倍高かった。

表 2.6.6.3- 6 ラット 26 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（149 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	3	10	30	3	10	30
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	13800	45000	150000	16800	62600	167000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	4.59	4.50	5.01	5.60	6.26	5.57
C_{max}	[µg/L]	1360	4700	12500	1530	6000	18400
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.454	0.470	0.415	0.509	0.600	0.613
t_{max}	[h]	2.00	4.00	2.00	4.00	4.00	4.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	2.8	4.9	7.0	6.0	4.8	4.3
R_{A3}		1.6	1.6	1.6	1.3	1.4	1.3
R_{A1}		1.7	1.8	2.0	1.4	1.8	2.5

$R_{A1}=C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

ベルイシグアト投与の影響は、4 週間及び 13 週間投与試験と同様に、過度な薬理作用による変化を特徴としており、高用量 30mg/kg まで有害な変化は認められなかったことから、NOAEL は 30mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.3 イヌ反復投与毒性試験

2.6.6.3.3.1 イヌ 2 週間反復投与予備毒性試験

参照項目 4.2.3.2.7 PH-40741

非 GLP 反復投与予備毒性試験において、0、1、3 及び 10mg/kg/日のベルイシグアトをビーグル犬雌雄各 1 例／群に 2 週間強制経口投与した。ベルイシグアトは 0.5% Tylose 溶液で調製し、投与容量は 2mL/kg とした。

イヌの一般状態及び摂餌量を毎日観察した。体重は、試験中、定期的に測定した。投与 1 日目及び 2 週目に採取した血漿検体を用いて、TK を評価した。臨床検査（血液学的検査及び生化学的検査）は投与開始前及び 2 週目に実施した。心血管系の評価のため、投与期間の開始前、並びに投与 1 週目の投与前及び投与後（2 時間）に、ECG 及び血圧測定を行った。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。剖検時に、ホモジナイズした肝組織中の酵素活性を測定するための肝検体を採取した。

ベルイシグアトの 1、3 及び 10mg/kg/日を 2 週間連日経口投与しても、被験物質に関連した有害作用は認められなかった。一般状態、摂餌量、体重増加量、血液学的検査及び血液生化学的検査、並びに ECG 及び血圧測定に関して、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。病理組織学的検査では、3 及び 10mg/kg/日群の雌に軽微な小葉中心性肝細胞肥大が認められたが、これは有害でない適応性の肝酵素誘導によるものと考えられた。また、10mg/kg/日群の雌では、左

心乳頭筋血管系の境界性変化が認められた。この所見は、単一の乳頭筋動脈における青色の粘液様マトリックス量の増加（血管変化のない動脈にも自然発生性の変化としてみられることがあり、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどの可能性がある）を伴う血管中膜の軽微な肥大であった。

TK データを表 2.6.6.3- 7 に要約する。雄では、1mg/kg/日から 10mg/kg/日まで曝露量が用量比例的に増加した。10mg/kg/日群の雌の曝露量は雄と同程度であったが、低及び中用量群の雌は、雄と比べて曝露量がやや高かった。

表 2.6.6.3- 7 イヌ 2 週間反復投与予備毒性試験における定常状態の曝露量（14 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	1	3	10	1	3	10
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	604	2130	8010	1350	7840	7690
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	0.604	0.711	0.801	1.35	2.61	0.769
C_{max}	[µg/L]	52.1	131	810	175	1190	706
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.0521	0.0436	0.0810	0.175	0.395	0.0706
t_{max}	[h]	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	31.8	84.4	6.26	3.72	9.59	30.9

本試験で認められた所見は、いずれも有害でないと考えられ、NOAEL は 10mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.3.2 イヌ 4 週間反復投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.8 PH-36756

4 週間経口投与毒性試験は、試験開始時に 21～25 週齢であった成長期のビーグル犬（系統 Hsd Rcc: DoBE）雌雄各 3 例／群を用いて実施した。動物は対照（溶媒）群 1 群と投与群 3 群に無作為に割り付けた。ベルイシグアトは PEG400 で調製し、投与容量を 2mL/kg として、0、2.5、7.5 及び 25mg/kg/日の用量でイヌに 4 週間強制経口投与した。投与量は、2 週間反復投与予備毒性試験で 10mg/kg/日まで被験物質に関連した有害作用が認められなかったことに基づいて選択した（2.6.6.3.3.1）。重度の消化管の所見（直腸脱の頻度増加）がみられたため、15 日目に高用量を 15mg/kg/日に減量した。また、一般状態悪化のため、雌 2 例で投与を一時中断した（1 例は間欠的に合計 7 日間、1 例は間欠的に合計 4 日間休薬）。

一般状態及び摂餌量を毎日観察した。体重は、試験中、定期的に測定した。1 日目及び 25 日目に採取した血漿を用いて、TK を評価した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）は、すべての動物で投与開始前及び 2 週目及び 4 週目に実施した。心血管系の評価のため、投与開始前、並びに投与 1 週目及び 4 週目の投与前及び投与後（2 時間）に、ECG 及び血圧測定を行った。眼科学的検査、神経学的検査及び体温測定を、すべての動物で投与開始前及び試験終了時に行った。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。剖検時に、ホモジナイズした肝組織中の酵素活性を測定するための肝検体を採取した。

ベルイシグアトの非臨床安全性プロファイルは、主に薬理作用によるものであり、sGC 刺激に続く細胞内 cGMP 濃度上昇による平滑筋弛緩が認められた。

消化管では、強力な平滑筋弛緩により、7.5mg/kg/日以上の群で嘔吐、流涎及び直腸脱が認められた。高用量群の雄 1 例を、整復不可能な直腸脱のため、15 日目に安楽死させた。この所見を考慮し、15 日目に高用量を 15mg/kg に減量した。状態悪化のため、高用量群の雌 2 例の投与

を一時中断した（合計 4 日間又は 7 日間休薬）。直腸脱がみられた中及び高用量群の動物では、病理組織学的検査において、直腸の炎症が認められた。2 週間予備試験では、10mg/kg/日までこのような徴候は認められなかったが、これは、予備試験では使用した溶媒が異なっていたことから、曝露量が低かったためと考えられる（2.6.6.3.3.1）。

心血管系では、薬理作用に関連し、用量に依存する顕著な収縮期血圧低下（7.5mg/kg/日以上の群の雄及び 2.5mg/kg/日以上の群の雌、1 週目及び 4 週目）及び反射性頻脈〔25/15mg/kg/日群の雄（1 週目及び 4 週目）、並びに 2.5 及び 7.5mg/kg/日群（1 週目）及び 25/15mg/kg/日（1 週目及び 4 週目）の雌の投与 2 時間後）〕が認められた。一般状態観察では、全用量群で強い脈動がみられた。QT、QT_{cB} 及び QT_{cF} 間隔に関しては、雌雄とも 25/15mg/kg/日まで意義のある変化は認められなかった。心臓で認められた病理組織学的所見（2.5mg/kg/日以上の群の雌雄の心筋動脈肥大、7.5mg/kg/日群の雌の心筋線維化及び 25/15mg/kg/日群の雌の限局性の炎症性浸潤）は、変性や壊死を伴っておらず、過度な血行動態作用によるものと考えられ、他の血管拡張薬でも報告されている強力な血管拡張作用に続発することがよく知られている[2, 3, 4]。

高用量群では、傍糸球体装置の肥大（腎重量の増加を伴い、雌は中用量 7.5mg/kg/日から認められた）がみられたほか、25/15mg/kg/日群で副腎の球状帯の幅の増大（副腎重量の増加を伴う）が認められた。これは、RAAS の代償性活性化による二次的な変化と考えられる。

更に、強力な血行動態作用及び消化管への作用により、体重増加抑制（7.5mg/kg/日以上の群の雄及び 25/15mg/kg/日群の雌）、高用量群の雌における摂餌量減少及び振戦、雌雄における二次的な栄養状態悪化などの全身状態悪化の徴候が認められた。

高用量群の雌では、病理組織学的検査で好塩基性尿細管のわずかな増加が認められた。

血液学的検査、血液生化学的検査、反射、体温及び眼科学的検査において、被験物質投与に関連した影響は認められなかった。更に、尿検査並びに第 I 相及び第 II 相の肝酵素の測定においても、25/15mg/kg/日まで重要な変化は認められなかった。

TK データを表 2.6.6.3- 8 に要約する。TK 評価では雌雄に曝露量の差は認められず、TK データは雌雄を併合して記載した。2.5mg/kg/日から 15mg/kg/日まで、AUC 及び C_{max} の増加は用量比を下回っていた。全用量群で 25 日目の曝露量（AUC 及び C_{max}）は 1 日目の曝露量と同等であった。

表 2.6.6.3- 8 イヌ 4 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（25 日目）

Dose	[mg/kg]	2.5	7.5	15
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	6390	14100	17600
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	2.56	1.88	1.17
C_{max}	[µg/L]	939	2220	2630
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.376	0.296	0.175
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	3.5	3.8	4.2
t_{max}	[h]	0.891	0.630	0.871
R_{A3}		1.0	0.9	1.1
R_{A1}		1.0	0.8	1.3

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$

薬理作用に関連した心血管系への影響は有害ではないと考えられ、中・高用量で認められた直腸脱及び全身状態の悪化により、NOAEL は 2.5mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.3.3 イヌ 13 週間反復投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.9 PH-37477

13 週間経口投与毒性試験は、試験開始時に 50～54 週齢であったビーグル犬（系統 Marshall beagle）雌雄各 4 例／群を用いて実施した。動物は対照（溶媒）群 1 群と投与群 3 群に無作為に割り付けた。ベルイシグアトは PEG400 で調製し、投与容量を 2mL/kg として、0、1.25、2.5 及び 5mg/kg/日の用量でイヌに 13 週間連日強制経口投与した。4 週間試験の 7.5mg/kg/日以上で直腸脱を含む消化管に対する重篤な影響が認められたことから（2.6.6.3.3.2）、本試験では 4 週間試験よりも用量を減量した。

イヌの一般状態及び摂餌量を毎日観察した。体重は、定期的に測定した。投与期間の 1 及び 87 日目に採取した血漿で TK を評価した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）は、すべての動物で投与開始前、並びに投与 2、6 及び 13 週目に実施した。心血管系評価のため、投与開始前、並びに投与 2、6 及び 13 週目の投与前及び投与 2 時間後に、ECG 及び血圧測定を行った。眼科学的検査、神経学的検査及び体温測定は、すべての動物で投与開始前、6 週目及び 13 週目に行った。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。

イヌの 13 週間の試験では、ベルイシグアトの非臨床安全性プロファイルの特徴として血行動態に軽度な影響が認められたが、いずれも被験物質の平滑筋弛緩作用による二次的な変化であった。5mg/kg/日では、雄及び／又は雌に血圧低下及びわずかな心拍数の増加が認められた。この用量では、変性や壊死を伴わない軽微～軽度な心乳頭筋動脈肥大が、雌雄に認められたが、これは他の血管拡張薬でも報告されている [2, 3, 4] 心筋灌流圧低下に対する適応性の代償性反応であると考えられる。同様の所見はラットでも認められ、少なくとも部分的な可逆性が示されている（2.6.6.3.2.2）。

高用量群の雄における QTcF のわずかな延長（8%）は、曝露量が同程度（2 倍以内）であった 4 週間及び 39 週間投与した試験で同様の変化が認められなかったことから、生物学的な変動であり、被験物質投与の影響ではないと考えられた。

高用量まで死亡はみられなかった。高用量群の雌雄で摂餌量の軽度な低下がみられ、1.25mg/kg/日以上の群の雄及び 2.5mg/kg/日以上の群の雌で軽度な体重増加抑制が認められ、2.5mg/kg/日以上の群の雄及び 1.25mg/kg/日以上の群の雌で流涎の増加が観察された。流涎は、消化管に不快感が発現した指標と考えられるが、毒性学的な重要性はほとんどないと考えられる。

血液生化学的検査、血液学的検査、反射、体温、眼科学的検査、尿検査において、被験物質に関連した影響は認められなかった。

TK データを表 2.6.6.3- 9 に要約する。雌雄に曝露量の差は認められなかった。87 日目の平均 AUC 及び C_{max} より、全用量群で曝露量が用量比例的に増加することが示された。1.25 及び 2.5mg/kg/日群では、87 日目の曝露量（AUC 及び C_{max}）は 1 日目と同程度であった。5mg/kg/日群では、87 日目の曝露量が 1 日目よりもわずかに高かったが、これは 1 日目の曝露量が予想よりもやや低かったためと考えられる。

表 2.6.6.3- 9 イヌ 13 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（87 日目）

Dose	[mg/kg]	1.25	2.5	5
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	5820	10600	21800
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	4.66	4.23	4.36
C_{max}	[µg/L]	696	1490	3070
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.556	0.597	0.614
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	5.3	4.5	5.6
t_{max}	[h]	1.41	1.19	0.917
R_{A1}		1.0	0.8	1.3
R_{A3}		1.1	0.9	1.5

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$

高用量 5mg/kg/日まで有害な所見は認められなかったことから、NOAEL は 5mg/kg/日と推定された。

2.6.6.3.3.4 イヌ 39 週間反復投与毒性試験

参照項目 4.2.3.2.10 R-9363

39 週間経口投与毒性試験は、試験開始時に 27～32 週齢であったビーグル犬（系統 Marshall beagle）雌雄各 4 例／群を用いて実施した。動物は対照（溶媒）群 1 群と投与群 3 群に無作為に割り付けた。ベルイシグアトは PEG400 で調製し、投与容量を 1mL/kg として、0、0.5、1.5 及び 5mg/kg/日の用量でイヌに 39 週間連日強制経口投与した。用量は 13 週間試験に基づいて選択した（2.6.6.3.3.3）。

イヌの一般状態及び摂餌量を毎日観察した。体重は、試験中、定期的に測定した。投与期間の 1 日目、13 週目及び 39 週目に採取した血漿検体を用いて、TK を評価した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）は、すべての動物で投与開始前並びに 12／13、25／26 及び 38／39 週目に実施した。心血管系評価のため、投与期間の開始前並びに 13、25 及び 38 週目の投与前及び投与 2 時間後に、ECG 及び血圧測定を行った。眼科学的検査をすべての動物で試験開始前、13 週目、25 週目及び 38 週目に行った。体温は週 1 回記録した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検を実施し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。また、血液中及び尿中の特別な骨バイオマーカーの評価を行った（血液：29 及び 39 週目に PTH、PINP、オステオカルシン、CTX I 及びカルシトリオール／ビタミン D、尿：31／32 及び 37 週目にクレアチニン、カルシウム、カルシウム・クレアチニン比、CTX II、CTX II・クレアチニン比）。

イヌに対するベルイシグアトの 39 週間強制経口投与の忍容性は良好であり、被験物質投与に関連した、毒性学的意義のある一般状態の変化や投与後の所見はみられず、ECG 及び血圧に対する投薬起因の影響も認められなかった。0.5mg/kg/日以上の群では、投薬に関連した流涎及び嘔吐が投与 4 時間後まで散発的に認められ、これらは消化管におけるベルイシグアトの平滑筋弛緩作用によるものと考えられた。全用量群において、投与期間中、体重増加量がやや増加した。

血液学的検査及び血液生化学検査、検討した骨バイオマーカーに関して、被験物質に関連した影響は認められなかった。また、カルシトリオール／ビタミン D に関しても、被験物質に関連した影響は認められなかった。

更に、体温、眼科学的検査及び尿検査、器官重量、剖検所見及び病理組織学的検査に関しても、被験物質に関連した影響は認められなかった。

TK データを表 2.6.6.3- 10 に要約する。39 週目の AUC は、0.5mg/kg/日から 1.5mg/kg/日までは用量比例的に増加したが、1.5mg/kg/日から 5mg/kg/日までの増加は用量比を下回った。一方、1 日目及び 13 週目は、全用量で AUC が用量比例的に増加した。C_{max} は、TK 評価の検体を採取した 3 日すべてで、0.5mg/kg/日から 1.5mg/kg/日まで用量に比例して増加した。雌雄に曝露量の差は認められなかった。5mg/kg/日で 39 週目の曝露量が 1 日目及び 13 週目よりもわずかに低かったことを除いて、39 週目の曝露量は 1 日目及び 13 週目の曝露量と同等であった。

表 2.6.6.3- 10　イヌ 39 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（273 日目）

Dose	[mg/kg]	0.5	1.5	5
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	2380	7200	12000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	4.76	4.80	2.40
C_{max}	[µg/L]	327	934	1490
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.654	0.623	0.299
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	5.3	6.3	6.1
t_{max}	[h]	0.707	0.771	1.00
R_{A1}		0.9	1.1	0.7
R_{A3}		1.2	1.2	0.8

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$

高用量 5mg/kg/日まで毒性所見は認められなかったことから、NOAEL は 5mg/kg/日と推定された。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

ICH S2（R1）「医薬品の遺伝毒性試験及び解釈に関するガイダンス」に従って標準的な遺伝毒性試験を実施した。変異原性あるいは遺伝毒性は認められなかった。遺伝毒性試験の結果の要約を以下に示す。

2.6.6.4.1　*In vitro* 遺伝毒性試験

2.6.6.4.1.1　細菌を用いる復帰突然変異試験

参照項目 4.2.3.3.1.1　A51658

サルモネラ菌／ミクロソーム試験（Ames 試験）により、ベルイシグアトの点突然変異作用を検討した。代謝活性化系（S9-mix）の非存在下と存在下の両方で、ヒスチジン栄養要求株 TA1535、TA100、TA1537、TA98 及び TA102 の Salmonella typhimurium LT2 変異株 5 株に対し、ベルイシグアトをプレート 1 枚あたり最大 5000μg 曝露した。また、プレインキュベーション試験として、別の独立の試験を行った。すべてのプレートは 3 枚ずつ作製し、37℃で約 48 時間インキュベーション（TA 102）又は 72 時間インキュベーション（TA98、TA100、TA1535、TA1537）を行った。

代謝活性化系の存在下及び非存在下において、すべての試験株で、2500μg／プレート以上で寒天中の沈殿が認められた。バックグラウンドローンの生育阻害は認められなかった。

代謝活性化系の非存在下又は存在下で、陰性対照と比べて、生物学的に意義のある復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。陽性対照は変異コロニー数が増加し、試験系の感度が示された。

したがって、Salmonella typhimurium を試験菌として用いた細菌復帰突然変異試験（直接プレート法及び改良プレインキュベーション法）の結果、最高推奨濃度である 5000μg／プレートまで、代謝活性化系（S9-mix）の非存在下及び存在下でベルイシグアトに変異原性は認められないと考えられる。

2.6.6.4.1.2　マウスリンフォーマ TK 試験

参照項目 4.2.3.3.1.2　A52063

マウスリンパ腫由来 L5178Y 細胞を用いたチミジンキナーゼ（TK）遺伝子変異を検出する試験において、ベルイシグアトの染色体異常誘発作用を *in vitro* で検討した。代謝活性化系（ラット肝ミクロソーム S9-mix）の存在下及び非存在下において 200μg/mL までの濃度で 3 時間、代謝活性化系の非存在下において 100μg/mL までの濃度で 24 時間以上、L5178Y $TK^{+/-}$細胞株の細胞をベルイシグアトに曝露した。最高濃度は、100μg/mL を超える濃度で沈殿を示したベルイシグアトの溶解度の限界に基づいて選択した。ベルイシグアトの細胞傷害作用は、代謝活性化系の存在下、100μg/mL 以上で認められた。

ベルイシグアトは、代謝活性化系の非存在下又は存在下で沈殿がみられる濃度まで試験したとき、生物学的に重要又は統計学的に有意な変異コロニー数の増加を示さなかった。いずれの濃度においても、大小の変異コロニー数の比率に意義のある変化は認められなかった。陽性対照は染色体異常誘発作用を示したことから、試験系の感度及び S9-mix の活性が示された。

この試験の結果に基づき、ベルイシグアトに *in vitro* で哺乳類細胞に対する染色体異常誘発作用は認められないと考えられる。

2.6.6.4.2 *In vivo*遺伝毒性試験

2.6.6.4.2.1 雄マウス腹腔内投与骨髄小核試験

参照項目 4.2.3.3.2.1 A51623

In vivo における骨髄赤芽球の染色体に対するベルイシグアトの遺伝毒性作用を検討するため、雄マウスを用いた小核試験を実施した。この試験では、ベルイシグアトを 0.5% Tylose 水溶液で調製し、NMRI マウスの群に 0、31.25、62.5 及び 125mg/kg の用量で 24 時間おきに 2 回腹腔内投与した。動物は 2 回目の投与の 24 時間後に安楽死させた。陽性対照として、既知の染色体異常誘発剤かつ細胞増殖抑制剤であるシクロホスファミド（30mg/kg、強制経口単回投与）を用いた。大腿骨骨髄を採取し、顕微鏡検査を行った。多染性赤血球 2000 個及び正染性赤血球 1000 個あたりの小核の発現頻度、並びに多染性赤血球と正染性赤血球の比率を各動物で測定した。

最高用量は、用量設定試験において、PEG400／エタノール（9:1）で調製した 125mg/kg のベルイシグアト及び Tylose 水溶液（0.5%）で調製した 250mg/kg のベルイシグアトの腹腔内投与後に死亡が認められたことに基づいて選択した。雄マウス 2 例及び雌マウス 2 例へのベルイシグアト 125mg/kg の 2 日間連続投与後、すべての動物で 1 日目にわずかな活動性低下／全身状態悪化（無気力）、2 日目及び 3 日目に軽度～中等度の活動性低下／全身状態悪化が認められ、これらはベルイシグアトの血行動態作用及び／又は消化管への作用による二次的な影響と考えられる。したがって、この用量をその後に実施した骨髄小核本試験の高用量として選択した。用量設定試験で雌雄に明確な差が認められなかったため、本試験では雄マウスに投与した。

陽性対照であるシクロホスファミドは、明らかな染色体異常誘発作用（小核多染性赤血球数の増加）を示したのに対し、ベルイシグアトは、陰性対照と比べて生物学的に意義のある又は統計学的に有意（$p<0.05$）な小核多染性又は正染性赤血球数の増加を示さなかった。62.5 及び／又は 125mg/kg/日群で認められた一般状態の変化（わずかな活動性低下／全身状態悪化）は十分な全身曝露を示唆するものと考えられた。

したがって、ベルイシグアトに *in vivo* で遺伝毒性は認められないと考えられる。

2.6.6.4.2.2 雄ラット小核試験（ラット 26 週反復投与毒性試験内実施）

参照項目 4.2.3.2.6 PH-37899

In vivo 遺伝毒性の評価を更に裏付けるため、ラット 26 週間反復投与毒性試験に末梢血小核試験を含めた（2.6.6.3.2.2）。Wistar ラットにベルイシグアトの 0、3、10 及び 30mg/kg/日を強制経口投与した〔雌雄各 20 例／群、溶媒：エタノール／Kolliphor HS 15®／水（10/40/50v/v/v）、投与容量：10mL/kg〕。

全用量群の雄ラット 5 例から投与 140 日目に小核試験用の末梢血を採取した。各検体で約 20000 個の網状赤血球を解析し、小核を有する網状赤血球の頻度を測定した。毒性の指標として、血液検体中の網状赤血球の割合を計算した。

全用量群の網状赤血球の頻度に陰性対照と比べて生物学的に意義のある増加がみられなかったことから、被験物質に明らかな細胞傷害性は認められないことが示された。雄ラットへのベルイシグアト 3、10 又は 30mg/kg/日の 139 日間経口投与後、陰性対照と比べて小核を有する網状赤血球の増加は認められなかった。

したがって、ベルイシグアトに *in vivo* で遺伝毒性は認められないと考えられる。

2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

マウス及びラットにおける 2 年間がん原性試験において、ベルイシグアトをそれぞれ強制経口投与及び混餌経口投与して検討した。用量は、マウス 2 週間及び 13 週間用量設定試験（2.6.6.3.1.1 及び 2.6.6.3.1.2）、並びにラット 4 週間及び 13 週間毒性試験（2.6.6.3.2.2 及び 2.6.6.3.2.3）に基づいて選択し、FDA と合意した。

2.6.6.5.1　マウス 2 年間混餌投与がん原性試験

参照項目 4.2.3.4.1.1　R-13312

試験開始時に 7～8 週齢であった CD-1 マウスを使用し、2 年間の混餌投与がん原性試験を実施した。マウスは雌雄各 60 例からなる対照群 1 群と投与群 4 群に無作為に割り付けた。雌雄各 42 例／用量をサテライト群に割り付け、9 日目、27 週目及び 52 週目と、更に 56 週目（非微粉砕バッチから微粉砕バッチへの変更後）に、ベルイシグアト及び代謝物 M-1 の TK を評価した。0、5、15、50 及び 150mg/kg/日（雄）又は 0、6、20、60 及び 250mg/kg/日（雌）を目標用量として、ベルイシグアトを混餌投与した。目標用量で投与されるよう、餌中濃度（ppm）は週毎に調節した。高用量は、ヒト AUC の 25 倍を超えると予想される用量とすることを FDA と合意した。用量は、13 週間混餌投与毒性試験の TK データ（表 2.6.6.3- 2）を元に、雄マウスの曝露量が雌マウスよりもわずかに高かったこと（約 1.6 倍）を考慮して設定した。13 週間混餌投与毒性試験で 150mg/kg/日（雄）又は 250mg/kg/日（雌）を設定していなかったため、過度な毒性が高用量の長期投与で発現する可能性を考慮して投薬群を 4 群とした。

一般状態を 1 日 2 回観察した。また、腫瘤の触診を含む週 1 回の身体検査をケージから取り出した後に実施した。体重、摂餌量及び摂水量は定期的に測定した。眼科学的検査を 26 週目、52 週目、78 週目及び 104 週目に実施した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）は、TK 測定用の動物を用いて、22 週目及び 52 週目に実施した。更に、計画剖検時に生存していた全動物から、血液学的検査用の血液試料を心臓穿刺により採取した。死亡動物、早期安楽死させた動物及びすべての生存動物は、剖検し、器官重量を測定した。主試験群の全動物の全組織及び器官の病理組織学的検査を行った。生存率及び腫瘍発現率の統計学的解析を、現行の FDA ドラフトガイダンス[5)] に従って行った。生存率の比較のため、投与によって増加又は減少する死亡率で両側の検定を行った。必要に応じて、腫瘍性病変を、生存期間に基づいて補正した漸近固定区間に基づく有病率検定を用いて評価した[5, 6)]。多重検定による偽陽性の過誤を管理するため、一般的な腫瘍（背景発現率 1%超）に対しては有意水準 $p<0.005$、まれな腫瘍（1%未満）に対しては $p<0.025$ を適用した[5, 7, 8)]。非腫瘍性病変は、生存期間を補正しない傾向検定[9)] で解析した。更に、Fisher 正確検定（ペアワイズ比較）を実施した[10)]。非腫瘍性病変の統計処理は、5%の有意水準を適用した（$p<0.05$）。すべての検定は、両側で実施した。

主試験群では試験期間中に雄 151／300 例と雌 165／300 例の死亡又は瀕死状態による安楽死がみられた。主試験群の対照群の雌で死亡率が増加したため（表 2.6.6.5- 1）、全群のすべての雌を 93 週目及び 94 週目に安楽死させた（FDA と協議後決定）。サテライト群の死亡率は均等に分布していた。投薬群全体の死因は投薬群間で類似し、それらの成因はこの週齢の CD-1 マウスでみられる一般的なものとおおむね一致していたことから、投薬に起因したものではないと考えられた。

表 2.6.6.5- 1 マウスがん原性試験の死亡動物数

	Males					Females				
Nominal Dose [mg/kg/day]	0	5	15	50	150	0	6[a]	20[a]	60[a]	250[a]
Main groups (n= 60)	25	25	36	33	32	45[b]	37	31	23	29
Satellite groups (n= 42)	3	3	5	0	6	1	3	4	5	2
Overall mortality (n = 102)	28	28	41	33	38	46	40	35	28	31

[a] As a consequence of higher mortality rate in control females, the number of aged surviving females in vericiguat treatment groups was disproportionately higher at the time of necropsy in Week 93/94
[b] Due to increased mortality in control females, all female groups were sacrificed early in Week 93/94 to allow an adequate assessment

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、腫瘤検査、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査）に関して、被験物質投与に起因した影響は認められなかった。げっ歯類における反復投与毒性試験と同様、摂水量の増加が雄 50mg/kg/日以上及び雌 60mg/kg/日以上で認められ、ベルイシグアトの血管拡張作用に続発する非有害性の変化と考えられた。

雌雄とも被験物質投与に起因した統計学的に有意な腫瘍性の変化は認められなかった。対照群及び被験物質を投与した動物のすべての腫瘍は、CD-1 マウスのがん原性試験においてみられる一般的な腫瘍と一致していた。

小葉中心性肝細胞肥大と関連した肝臓重量及び大きさの増加／増大が、雄 50mg/kg/日以上と雌 60mg/kg/日以上で認められた。これは、肝代謝酵素誘導に対する適応性の反応であり、有害でないと考えられる。病理組織学的検査では、雌の乳腺の拡張／分泌の発生頻度及び程度の増加／増強、雌雄胆嚢における胆石及びヒアリン沈着の発生頻度又は程度のわずかな増加／増強、並びにハーダー腺の分泌上皮の変性又は炎症が高用量群（雄 150mg/kg/日、雌 250mg/kg/日）でみられた。これらの病理組織学的所見はすべて過度な薬理作用及び作用機序を介した平滑筋細胞又は筋上皮細胞（平滑筋細胞に構造的に類似し、外分泌腺の収縮を引き起こすことが知られている）[11] の弛緩に関連し、それによって分泌腺の拡張及び不全が生じ、二次的に炎症と変性が誘発されたと考えられる。また、高等霊長類及びヒトには存在しないことが知られているハーダー腺[12] に所見がみられたが、これに関連する眼の変化は認められなかった。50mg/kg/日以上の雄又は60mg/kg/日以上の雌では、腸間膜リンパ節の形質細胞の出現頻度の軽微な増加がみられ、これは、消化管における平滑筋の強い弛緩作用に続発する腸内フローラのわずかな乱れと軽度な炎症による適応反応と考えられた。消化管の変化は軽微であり、有害ではないと考えられる。

更に、雌の投薬群で加齢に関連した一般的な自然発生性病変の発現頻度が高かった。これは、対照群の雌の死亡率が高かったため、すべての群の雌を早期剖検した時点で、投薬群で生存動物の割合が高かったことに起因すると考えられた。所見は、雌 60 又は 250mg/kg/日群の肝臓における炎症細胞巣の発生頻度及び程度の増加／増強、壊死性の病巣又は色素沈着、雌 60 及び／又は 250mg/kg/日群の卵巣における嚢胞の増加（剖検及び病理組織学的検査）、管状間質過形成、嚢胞乳頭状過形成、びまん性の黄体細胞過形成、びまん性の混合型性索間質細胞、色素沈着の発生頻度及び程度の増加／増強、並びに雌 250mg/kg/日群の涙腺における腺房細胞萎縮の発生頻度の増加であった。

ベルイシグアト及び M-1 の TK データを表 2.6.6.5- 2 及び表 2.6.6.5- 3 に要約する。ベルイシグアトの曝露量（AUC）は、低用量から高用量まではほぼ用量に比例して増加し、高用量から最高用量までの増加は用量比をやや下回った。血漿中濃度－時間プロファイルはプラトー型で、t_{max} 値の範囲はかなり変動した。曝露量が試験全体を通じて大差ないことから、ベルイシグアトのバッチの相違（非微粉砕及び微粉砕バッチ）は TK に影響を及ぼさないことが示唆された。代謝物 M-1 の曝露量（AUC）は、検討した用量範囲全体で用量に比例して増加した。

表 2.6.6.5- 2 マウスがん原性試験における定常状態のベルイシグアトの曝露量（359 日目）

		Males				Females			
Nominal Dose	[mg/kg]	5	15	50	150	6	20	60	250
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	10800	31400	117000	271000	17600	59700	180000	522000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	2.16	2.10	2.35	1.81	2.93	2.98	3.00	2.09
C_{max}	[µg/L]	672	1560	7130	14100	962	3320	9170	27500
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.134	0.104	0.143	0.0941	0.160	0.166	0.153	0.110
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	100.0	79.1	100.0	65.5	100.0	56.5	88.0	100.0
t_{max}	[h]	24.0	5.00	24.0	0	24.0	10.0	10.0	24.0
R_{A3}		0.9	0.7	0.7	0.6	1.1	1.0	1.0	0.8
R_{A1}		1.0	0.8	0.8	0.6	1.3	1.2	1.1	0.7

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

表 2.6.6.5- 3 マウスがん原性試験における定常状態の M-1 の曝露量（359 日目）

		Males				Females			
Nominal Dose	[mg/kg]	5	15	50	150	6	20	60	250
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	317	889	2670	8020	546	2170	5590	22700
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	0.0449	0.0419	0.0378	0.0379	0.0644	0.0767	0.0659	0.0644
C_{max}	[µg/L]	20	54	162	468	48	158	297	1170
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.00284	0.00254	0.00230	0.00221	0.00564	0.00559	0.00350	0.00332
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	100.0	52.1	60.2	66.3	100.0	37.3	93.8	96.3
t_{max}	[h]	24.0	0	0	15.0	24.0	10.0	10.0	10.0
R_{A3}		0.9	0.6	0.5	0.5	1.7	1.5	1.1	0.8
R_{A1}		0.7	0.5	0.5	0.5	2.5	1.8	0.7	0.5

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

CD-1 マウスの 2 年間がん原性試験において、ベルイシグアトを雄は 150mg/kg/日、雌は 250mg/kg/日まで混餌投与したが、最高用量まで発がん性は認められなかった。被験物質投与に関連するすべての非腫瘍性病変は、ベルイシグアトの薬理作用に関連すると考えられた。

2.6.6.5.2 ラット 2 年間経口投与がん原性試験

参照項目 4.2.3.4.1.2 R-13305

試験開始時に 6～7 週齢であった Wistar ラットを使用し、ベルイシグアトの 2 年間がん原性試験を実施した。動物は雌雄各 60 例からなる溶媒対照群 1 群、水対照群 1 群及びベルイシグアト投与群 3 群に無作為に割り付けた。雌雄各 15 例／用量をサテライト群に割り付け、1 日目、26 週目、52 週目及び 56 週目にベルイシグアト及び代謝物 M-1 の TK を評価した。更に、非微粉砕バッチから微粉砕バッチへ変更した後の 83 週目の投与 4 及び 7 時間後に、主試験群の動物の血漿中曝露量（推定 t_{max} 範囲）を測定した。動物には、0、0、2、6 及び 20mg/kg/日のベルイシグアトを強制経口投与した。高用量は、FDA が推奨し、4 週間毒性試験において 30mg/kg/日以上の用量で、顕著な心血管拡張、血圧低下及び体温低下に続発する動物の全身状態の悪化によると考えられる一般状態の変化（歩行異常及び興奮行動）が認められたこと（2.6.6.3.2.2）に基づいて選択した。

動物はケージ中で一般状態を 1 日 2 回観察した。また、腫瘤の触診を含む週 1 回の身体検査をケージから取り出した後に実施した。体重、摂餌量及び摂水量を定期的に測定した。眼科学的検査を 26、52 及び 104 週目に実施した。臨床検査は、22 及び 52 週目（血液学的検査、凝固検査及び血液生化学的検査）又は 25 及び 51 週目（尿検査）に実施した。死亡した動物、早期安楽死させた動物及び試験終了時まで生存したすべての動物は、剖検し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。統計学的評価は、マウスと同じ手順及び有意水準を適用した。

主試験群では、試験期間中に雄 117／300 例と雌 113／300 例の死亡又は瀕死状態による安楽殺が認められた。TK 群では、雄 3 例の死亡又は瀕死状態による安楽殺が認められた（表 2.6.6.5-4）。死因及び死亡率は両性とも群間で同等であった。投薬に起因した死亡例は認められず、死因は使用したラットの系統で一般的に認められている所見とおおむね一致していた。

表 2.6.6.5- 4 ラットがん原性試験の死亡動物数

	Males					Females				
Dose [mg/kg/day]	0	0	2	6	20	0	0	2	6	20
Main groups (n= 60)	25	23	23	24	22	21	24	20	23	25
Satellite groups (n= 15)	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Overall mortality (n = 75)	25	25	24	24	22	21	24	20	23	25

一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、腫瘤検査、血液学的検査、血液生化学検査及び臓器重量測定において、被験物質投与に関連した影響は認められなかった。他の反復投与毒性試験及びマウスがん原性試験と同様に、ベルイシグアトの薬理作用に起因した血管拡張作用により雌雄 6mg/kg/日以上で摂水量が増加し、これは高用量 20mg/kg/日群の雄でみられた尿量増加に関連していた。作用機序に関連した重度の平滑筋の弛緩に続発して、非有害性の盲腸膨満の発生頻度のわずかな増加が、全用量群の雄及び 20mg/kg/日群の雌で認められた（一部の動物では病理組織学的な拡張に関連）。これらの変化は摂餌量や体重への影響を伴わなかった。

雌雄とも投薬に起因した統計学的に有意な腫瘍の増加はみられなかった。

良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫の統計学的に有意ではない増加が 20mg/kg/日群の雄でみられ、同群の雌雄の副腎で限局性の髄質過形成が、雄で限局性のライディッヒ細胞過形成の発生頻度の増加が認められた。更に、20mg/kg/日群の雄でラット 26 週間反復投与試験と同様の副腎髄質の変化（2.6.6.3.2.4）もみられた。髄質の変化は多巣性で軽度に肥大した細胞集団を特徴とし、明瞭な核と淡い好酸球性又はわずかに空胞化した細胞質がみられた。これは、エピネフリン及びノルエピネフリン貯蔵細胞の異なった分布と、それによるクロム親和性細胞の活性

化を示唆するものと考えられた。これらの所見は、RAAS とアドレナリン作動系の薬理学的な代償性及び反復性の活性化に続発したものと考えられる（2.6.6.9）。

ベルイシグアト及び M-1 の TK データを表 2.6.6.5- 5 及び表 2.6.6.5- 6 に要約する。ベルイシグアトの曝露量（AUC 及び C_{max}）は、2mg/kg/日から 20mg/kg/日まで用量に比例して増加した。t_{max} は、多くの場合、4 又は 7 時間後であった。曝露量（AUC 及び C_{max}）は、1 日目から 176 日目までは約 1.5～3 倍増加し、359 及び 387 日目は同水準で維持された。また、575 日目の血漿中濃度（2 時点のみのデータ）もそれ以前の測定日と同程度であり、被験製剤バッチの違い（非微粉砕及び微粉砕バッチ）による曝露量の明らかな差異は認められなかった。代謝物 M-1 の曝露量は用量に比例して増加した。

表 2.6.6.5- 5 ラットがん原性試験における定常状態のベルイシグアトの曝露量（359 日目）

Dose	[mg/kg]	2	6	20
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	13500	38600	131000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	6.75	6.44	6.56
C_{max}	[µg/L]	1240	3380	10600
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.618	0.564	0.531
t_{max}	[h]	4.00	4.00	4.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	4.9	7.8	8.4
R_{A3}		1.5	1.5	1.6
R_{A1}		1.7	1.7	2.4

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

表 2.6.6.5- 6 ラットがん原性試験における定常状態の M-1 の曝露量（359 日目）

Dose	[mg/kg]	2	6	20
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	389[a]	2230	8600
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	0.138[a]	0.263	0.304
C_{max}	[µg/L]	80	203	693
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.0284	0.0239	0.0245
t_{max}	[h]	4.00	4.00	4.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	n.c.	6.6	9.1
R_{A3}		3.2	2.7	3.6
R_{A1}		4.1	3.6	6.4

[a] $AUC_{(0-7)}$ instead of $_{(0-24)}$
n.c. = not calculated
$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

20mg/kg/日までの用量を連日反復経口投与したラット 2 年間がん原性試験において、ベルイシグアトの良好な忍容性が示された。最高用量まで統計的に有意な腫瘍発生率の増加はみられなかった。統計学的に有意でない良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫の増加傾向が 20mg/kg/日でみられ、限局性の副腎髄質過形成（雌雄）及び限局性のライディッヒ細胞過形成、並びにクロム親和性細胞の活性化を示唆する非増殖性の副腎髄質の変化を伴っていた。これらは、RAAS 及びアドレナリン作動系の代償性及び反復性の活性化をもたらすベルイシグアトの薬理作用に関連すると考えられる。中用量 6mg/kg/日以下では、被験物質投与に関連した腫瘍性及び／又は非腫瘍性の病変発生率の増加は認められなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.6.1 受胎能及び初期胚発生試験

2.6.6.6.1.1 ラット受胎能及び初期胚発生試験

参照項目 4.2.3.5.1.1 PH-37948

各群雌雄各 24 例の Wistar ラットを、対照群 1 群とベルイシグアト投与群 3 群に無作為に割り付け、ベルイシグアトを強制経口投与した。被験物質はエタノール／Solutol HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量を 10mL/kg として、0、5、15 及び 50mg/kg/日の用量で投与した。用量は 4 週間のラット反復投与毒性試験の結果に基づいて選択した（2.6.6.3.2.2）。4 週試験では、認められた変化のほとんどが、血行動態及び消化管に対する作用又は cGMP に関連した骨に対する影響のいずれかに関連したものであり、オフターゲットの毒性は認められなかった。4 週試験の 60mg/kg/日群では、動物に全身状態の悪化が認められたため、60mg/kg/日は MTD をわずかに上回ると判断し、ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験の高用量として 50mg/kg/日を選択した。雄ラットは、交配前、その後の交配期間及び剖検まで約 4 週間投与した。雌ラットは、交配前、その後の交配期間及び妊娠 7 日まで約 2 週間投与した。交尾後 14～16 日に帝王切開を行った。被験物質投与後の忍容性と受胎能及び初期胚発生に対する影響を評価した。

ラット 4 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.2）の 60mg/kg/日群と同様に、50mg/kg/日の忍容性は血行動態及び消化管に対する過度な薬理作用のため、良好ではなかった。50mg/kg/日群の雄 1 例は瀕死状態のため 9 日目に安楽死させ、雌 3 例は 3～5 日目に死亡した。一般状態観察で、50mg/kg/日の雌で立毛がみられた。更に、15mg/kg/日群の雄 1 例が 34 日目、雌 1 例が 22 日目に死亡したが、これらの死亡は、投与過誤（雌）か、24 例中 1 例の死亡（雄）であり、30mg/kg/日までの用量を最長 26 週間反復投与した毒性試験（2.6.6.3.2.4）で死亡がみられなかったことから、いずれも被験物質投与とは関連しないと考えられた。

50mg/kg/日群の雌雄では、血行動態及び消化管に対する作用により、投与 1 週目に体重増加量の抑制が認められたが、これはその後回復し、交配前期間の 8～15 日目に体重増加量が増加したため、雌雄の最終的な体重は 50mg/kg/日まで投薬の影響がみられなかった。体重増加量と関連した摂餌量の変化がみられた。交配前及び交配期間中の 50mg/kg/日群の雌雄の観察では、ベルイシグアトの血管拡張作用に起因する排尿増加に関連した摂水量の増加が認められた。

投薬に関連した剖検所見、精巣又は卵巣重量への影響、授精率、受胎率、妊娠率、黄体数、着床前胚死亡、着床数、着床後胚死亡、生存胚数などの生殖パラメータへの影響はみられなかった。

高用量で投薬起因の死亡がみられたため、雌雄親動物の一般毒性に関する NOAEL は 15mg/kg/日と考えられた。受胎能及び初期胚発生に関する NOAEL は最高用量である 50mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.2 胚・胎児発生試験

2.6.6.6.2.1 ラット胚・胎児発生毒性試験

参照項目 4.2.3.5.2.1 PH-38325

雌 Wistar ラットにベルイシグアトを 0、5、15 及び 50mg/kg/日の用量で妊娠 6～17 日に 1 日 1 回強制経口投与した。ベルイシグアトはエタノール／Solutol HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。用量は 4 週間のラット反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.2）において、認められた所見のほとんどが血行動態作用及び消化管に対する作用又は cGMP に関連した骨に対する影響のいずれかに関連したものであり、オフターゲットの毒性が認められなかったことに基づいて選択した。4 週間試験の 60mg/kg/日において動物に全身状態の悪化（立毛、筋

緊張低下、うずくまり姿勢）、並びに一過性の体重及び摂餌量の減少が認められたため、50mg/kg/日を胚・胎児発生毒性試験の高用量として選択した。交尾成立雌を各群 22 例からなる対照群 1 群とベルイシグアト投与群 3 群に割り付けた。TK 評価用のサテライト群には交尾成立雌を各群 4 例に割り付けた。妊娠 21 日（主試験群）又は 18 日（サテライト群）に帝王切開し、剖検した。ラットは少なくとも 1 日 1 回、一般状態を観察した。体重、摂餌量及び摂水量は定期的に測定した。サテライト群の採血は妊娠 6 及び 17 日に行った。

血行動態及び消化管へのベルイシグアトの作用に続発する母体毒性として、15mg/kg/日以上の群で用量に依存した体重増加の抑制及び摂餌量の減少がみられた。また、50mg/kg/日では摂水量及び排尿回数の増加、並びに淡色の糞がみられた。5mg/kg/日群の母動物には毒性所見は認められなかった。

受胎率、妊娠率、胎盤の外観及び重量、着床後死亡数、胎児数、胎児の性比、胎児体重に関しては、50mg/kg/日まで投薬の影響は認められなかった。外表、内臓及び骨格奇形、並びに骨格の変異／骨化遅延への影響は認められなかった。頭蓋方向に長い胸腺（cranially extended thymus）の発現頻度が高用量で増加したが、大きさや形状への影響はなく、胸腺がより頭蓋側に位置している状態であり、投薬との関連は不明で毒性学的に重要でないと考えられる。

母体から採取した血液の TK データの要約を表 2.6.6.6- 1 に示す。妊娠 6 及び 17 日の曝露量（AUC）は、5mg/kg/日から 50mg/kg/日までほぼ用量に比例して増加した。C_{max} は、多くの場合、3～7 時間後であった。異なる日の AUC の比較から試験期間を通じて曝露量が同程度であったことが示された。

表 2.6.6.6- 1 ラット胚・胎児発生毒性試験における曝露量（妊娠 17 日）

Dose	[mg/kg]	5	15	50
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	28600	67100	240000
$AUC_{(0-24),\,norm}$	[kg·h/L]	5.73	4.47	4.80
C_{max}	[µg/L]	2700	5490	17700
$C_{max,\,norm}$	[kg/L]	0.539	0.366	0.354
t_{max}	[h]	7.00	3.48	5.28
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	3.9	7.8	14.2
R_{A1}		1.3	1.0	1.5
R_{A3}		1.1	0.8	1.0

$R_{A1} = C_{max,\,ss} / C_{max,\,Day\,1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),ss} / AUC_{(0-24),Day\,1}$

15mg/kg/日以上の母動物でベルイシグアトの血行動態及び消化管への作用に続発した影響が認められたことに基づき、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 5mg/kg/日と推定された。母動物の生殖能及び胚・胎児発生に関する NOAEL は、投薬に起因した変化が 50mg/kg/日までみられなかったことから、50mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.2.2 ウサギ胚・胎児発生毒性試験

参照項目 4.2.3.5.2.2 PH-38326

雌ニュージーランドホワイトウサギ〔Crl：KBL（NZW）BR〕の妊娠 6～20 日にベルイシグアトを 0、0.75、2.5 及び 7.5mg/kg/日の用量で強制経口投与した。ベルイシグアトは 0.5% Tylose MH 300 水溶液で調製し、投与容量は 5mL/kg とした。用量は、ウサギの発生毒性予備試験（投与量：0、1、3 及び 10mg/kg/日）において、10mg/kg/日群で明らかな母体毒性である流産が、3mg/kg/日群で生殖への影響を伴わない、投薬に起因したわずかな母体毒性が認められたことに

基づいて選択した。交尾成立雌は、各 20 例からなる対照群 1 群とベルイシグアト投与群 3 群に割り付けた。TK 用サテライト群として各群 3 例を割り付けた。妊娠 29 日（主試験群）又は 21 日（サテライト群）に帝王切開し、剖検した。動物は少なくとも 1 日 1 回、一般状態を観察した。体重、摂餌量及び摂水量は定期的に測定した。母動物の TK 評価用の採血は妊娠 6 及び 20 日に行った。

ベルイシグアト投薬群で妊娠後期の流産（対照群、0.75、2.5 及び 7.5mg/kg/日群：0、0、3、8）及び全胚吸収（0、0、0、1）の増加が認められた。2.5 及び 7.5mg/kg/日群において流産した雌は、妊娠 24 日以降に安楽死させた。これらの動物の大部分には投与期間中及びその後、体重減少、摂餌量の著しい減少～無摂餌及び糞量の減少が認められたが、これらはベルイシグアトの血行動態作用及び消化管への作用による二次的な変化と考えられる。一部の動物では、尿の変色、赤色の排泄物及び／又は糞の硬さ及び／又は色の変化が認められた。

帝王切開時に胎児が生存していた母動物の体重増加量、補正後の体重増加量、摂餌量及び摂水量には、7.5mg/kg/日まで投薬の影響は認められなかった。7.5mg/kg/日では、糞量の減少、糞の硬さの変化、糞の色の変化及び赤色の排泄物が認められた。

2.5 及び 7.5mg/kg/日群で流産／全胚吸収が増加したことにより、妊娠率の低下及び着床後死亡の増加が認められたが、妊娠を継続した母動物では、着床後死亡への投薬の影響は認められなかった。

被験物質投与に関連した剖検所見は 7.5mg/kg/日まで認められず、胎盤重量への影響もみられなかった。高用量群において 10 母動物中 3 例の胎盤に複数の白色点状部位が認められた。胎児数、胎児の性比及び胎児体重に関しては、7.5mg/kg/日まで投薬の影響は認められず、胎児奇形、外表、内臓及び骨格変異、並びに骨格発達の遅延に関しても、被験物質投与に関連した影響は認められなかった。

なお、中及び高用量で、心室中隔欠損症（VSD）を伴う低頻度の総動脈幹症（最大 1.6%）が認められた。これらの用量では、顕著な母体毒性及び流産／全胚吸収がみられた。本試験では、対照群の 3 例を含む 6 例の胎児に総動脈幹症を伴わない VSD がみられており、VSD を伴う総動脈幹症、VSD、並びにそれらを合わせた例数及び頻度には、いずれも用量反応性がみられなかった（表 2.6.6.6- 2）。試験施設（Bayer 社、ドイツ）に、使用されたウサギ系統〔Crl：KBL（NZW）BR〕の背景データはないが、同系統のウサギの背景データ[13]（Charles River Laboratories）では、総動脈幹症の胎児毎の発現頻度が最大 1.7%、同腹児における頻度は最大 20%であった。本試験の対照群における VSD の胎児毎の発現頻度は 2.2%であり、Crl：KBL（NZW）BR 系統の背景データの最大 1.7%（同腹児の頻度は最大 20%）と同等であった。以上より、VSD を伴った低頻度の総動脈幹症（VSD を伴う）及び VSD は、ベルイシグアト投与との関連性が無いと考えられる。これらの所見は、明確な用量相関性を伴わず、著しい母体毒性がみられる曝露量で認められ、低頻度であり、使用した系統の背景データの胎児毎及び同腹児の発現頻度と同等であった。

表 2.6.6.6- 2 ウサギ胚・胎児発生毒性試験における胎児及び同腹児における総動脈管症及び心室中隔欠損、並びにその複合例の発現頻度

Malformation	Cardiac ventricular septal defect, truncus arteriosus[a]	Cardiac ventricular septal defect[a]	Combined cardiac ventricular septal defect plus cardiac ventricular septal defect, truncus arteriosus[a]
Fetuses affected	0 – 0 – 2 - 1	3 – 0 – 2 – 1	3 – 0 – 4 – 2
Fetal incidence	0% – 0% - 1.6% - 1.3%	2.2% - 0% - 1.6% - 1.3%	2.2% - 0% - 3.2% - 2.6%
Litters affected	0 – 0 – 2 - 1	3 – 0 – 2 – 1	3 – 0 – 4 – 2
Litter incidence	0% – 0% - 11.8% - 10%	17.6% - 0% - 11.8% - 10%	17.6% - 0% - 23.5% - 20%

a = fetal and litter incidences for control, 0.75, 2.5 and 7.5 mg/kg/day, respectively

母体血液の TK データの要約を表 2.6.6.6- 3 に示す。ベルイシグアトの曝露量（AUC 及び C_{max}）は用量比を上回る増加を示した。C_{max} は投与 2 時間後以降に認められ、反復投与では用量が高いほど t_{max} が遅くなる傾向がみられた。反復投与後の蓄積比（AUC 及び C_{max}）は、全用量群で 1.1～1.4 であった。

表 2.6.6.6- 3 ウサギ胚・胎児発生毒性試験における曝露量（妊娠 20 日）

Dose	[mg/kg]	0.75	2.5	7.5
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	5590	24900	105000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	7.46	9.94	13.9
C_{max}	[µg/L]	509	2180	7590
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.679	0.872	1.01
t_{max}	[h]	2.00	4.00	4.82
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	12.2	12.4	18.9
R_{A1}		1.1	1.1	1.3
R_{A3}		1.4	1.1	1.4

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),SS} / AUC_{(0-24),Day\ 1}$

以上より、0.75mg/kg/日群におけるベルイシグアトの忍容性は良好であった。2.5mg/kg/日以上では明らかな母体毒性の徴候が認められた。これは血行動態及び消化管に対する被験物質の薬理作用による二次的な影響と考えられ、その結果、妊娠後期の流産が増加し、続いて妊娠率が低下し、着床後胚死亡が増加した。0.75mg/kg/日群には、胚・胎児発生への直接的な影響は認められなかった。これらの成績に基づいて、母動物（一般毒性及び生殖能）及び胎児（胚・胎児発生）に関する NOAEL は 0.75mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.3 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

2.6.6.6.3.1 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する用量設定試験

参照項目 4.2.3.5.3.1 R-11952

出生前及び出生後の発生に関する非 GLP 用量設定試験として、Wistar ラットにベルイシグアトを 0、30 及び 50mg/kg/日の用量で強制経口投与した。ベルイシグアトはエタノール／Kolliphor HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。交配後の雌（F0）を対照群 1 群と投与群 2 群（雌各 6 例）に割り付け、妊娠 6 日～授乳 4 日まで連日強制経口投与した。ベルイシグアト投与の影響は、一般状態所見、体重、摂餌量、妊娠、分娩及び出生児の発生に基づいて評価した。親動物及び出生児を剖検した。

30 及び 50mg/kg/日群で母体毒性として、一般状態所見（流涎、立毛、口周囲のピンク色の着色及びあえぎ呼吸／努力性呼吸）及び摂餌量の減少を伴う体重減少が認められ、ベルイシグアトの血行動態及び消化管への作用に起因した変化と考えられた。30mg/kg/日の雌 1 例が、妊娠 10 日に死亡した。剖検所見は認められず、死因及び投薬起因性の有無は不明であった。投薬群では母体毒性により、着床数のわずかな減少と着床後死亡の増加が認められ、出生児数が減少し、生存率がわずかに低下した。更に、50mg/kg/日群において、出生児の体重の低値及び雄の比率のわずかな増加が認められ、剖検で母動物 1 例の出生児 4 例中 1 例の胃内に乳汁が認められなかった。50mg/kg/日群の母動物で 3 例、30mg/kg/日群の母動物で 2 例の死亡児が認められた。30mg/kg/日群の母動物 2 例の出生児 2 例に膀胱拡張が認められた。これらの所見は対照群には認められなかったが、使用動物数が少なかったことから、性比のわずかな変化、少数の出生児の死亡及び膀胱拡張は偶発的な変化の可能性がある。

これらの結果に基づいて、出生児に関する NOAEL は 30mg/kg/日未満と推定された。

2.6.6.6.3.2 ラット出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

参照項目 4.2.3.5.3.2 R-12839

出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において、雌 Wistar ラットにベルイシグアトを 0、7.5、15 又は 30mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～授乳 21 日に 1 日 1 回強制経口投与した。ベルイシグアトはエタノール／Kolliphor HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。投与量は、出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験において、30mg/kg/日以上で着床後死亡の増加を含む母体毒性と出生児に対する二次的な影響が認められ、50mg/kg/日は過度な用量であると考えられたこと（2.6.6.6.3.1）に基づいて選択した。交尾成立後の妊娠ラット各群 22 例からなる 4 群を親（F0）世代とした。

ベルイシグアト投与の影響は、一般状態所見、体重、摂餌量、妊娠指数、分娩及び児動物の発生に基づいて評価した。出生児の身体的発育は、耳介展開、切歯萌出及び眼瞼開裂で評価した。機能発達は、平面での正向反射、空中での正向反射及び瞳孔反射で評価した。授乳 2 週目に母動物から乳汁を採取した。離乳後、F1 世代として選択した出生児の性成熟、聴覚性驚愕反応、自発運動量、学習及び記憶を評価した。約 10 週齢で F1 児動物を交配のため同居させた。剖検は、F0 及び F1 世代（死亡児及び間引児含む）について実施した。

0、7.5、15 又は 30mg/kg/日のベルイシグアトを妊娠 6 日～授乳 21 日に 1 日 1 回強制経口投与したところ、平滑筋弛緩に起因する血行動態作用及び消化管に対する薬理作用が認められた。15 及び 30mg/kg/日群の母動物では、出生児に有害な、摂餌量の減少を伴い用量に依存した体重増加の抑制がみられた。15 及び 30mg/kg/日群において妊娠期間中にみられた体重増加抑制及び妊娠 7～8 日の体重減少は、出生児の発生に対して過度な影響と考えられた。7.5mg/kg/日群の母動物には、妊娠期間中に明らかな体重及び摂餌量への影響は認められなかった。

母動物への 30mg/kg/日の投与では、出生児に対する顕著な影響が認められ、1 例の母動物で全児死亡がみられ、死産児の増加、死亡児の増加及び出生児の生存率の低下が認められた。出生児の剖検では、胃内に乳汁が認められない児の比率が増加した。この所見は、主に死産児又は出生時は生存していたが出生後まもなく死亡した動物で認められた。したがって、高用量におけるこの所見の高い発生率は、死産の発現率の増加及び死亡児発現率の増加と関連しており、毒性学的に重要ではないと考えられた。授乳中の出生児の体重は対照群よりも有意に低く（生後 1～21 日の約 25%の体重増加抑制）、これは離乳後初期にも認められたが、離乳後後期には回復し、対照群と同程度となった。ベルイシグアトが授乳ラットの乳汁中に移行すること（2.6.4.6.4）を考慮すると、この変化はおそらく乳汁を介してベルイシグアトに曝露された出生児におけるベルイシグアトの強力な血行動態への影響に関連していると考えられる。雌雄出生児に被験物質投与

に関連した発達指標及び性成熟の遅延が認められ、これらは体重減少の二次的な影響と考えられた。更に、自発運動の評価では、運動量の増加及び立ち上がり回数の減少が認められた。

母動物への 15mg/kg/日の投与後にも、出生児に対する影響が認められ、対照群に比べて約20%までの体重増加抑制（出生後 1～21 日）とそれによる発達指標のわずかな遅延及び雌の性成熟の遅延が認められた。これらの雌の性成熟到達時の体重は対照群よりも低かった。この用量は出生児の発生に対する毒性用量であると推定された。

母動物への 7.5mg/kg/日の投与後にも、出生児への軽微な影響が認められた。対照群に比べて、発達指標のわずかな遅延が認められ、一部の雌では性成熟もわずかに遅延した。これらはいずれも体重減少（出生後 1～21 日の約 15%までの体重増加抑制）による二次的な変化と考えられた。試験終了日の体重は対照群とほぼ同程度であった。出生児に明確な影響が認められなかったことから、これらの変化は有害でないと考えられた。

いずれの用量においても、ベルイシグアトを投与した母動物及びその出生児において、交尾行動、受胎能及び剖検所見（高用量の児動物でみられた胃内の乳汁の欠損を除く）に投薬の影響は認められなかった。

ベルイシグアトの血行動態及び消化管への影響に続発する 15mg/kg/日以上の母動物でみられた体重増加及び摂餌量の減少に基づき、母動物の一般毒性に関する NOAEL は 7.5mg/kg/日と推定された。母動物生殖能に関する NOAEL は、30mg/kg/日で着床後死亡の増加がみられたことから15mg/kg/日と推定された。7.5mg/kg/日では、発達指標のわずかな遅延及び一部の雌における性成熟のわずかな遅延を含む、出生児への軽微な影響が認められたが、いずれも最終的に完全に回復した体重増加抑制に関連する変化であった。これらの軽度な変化はいずれも有害でないと考えられ、また、生殖能への影響は認められなかったため、出生児に関する NOAEL は 7.5mg/kg/日と推定された。

2.6.6.6.4 幼若動物毒性試験

今後の小児患者集団における臨床開発を支持するため、用量設定試験を含む幼若動物を用いた反復投与毒性試験を実施した。試験デザインは EMA の小児用医薬品開発委員会が審査した小児臨床試験計画の枠組みにおいて承認された。これらの試験成績を以下に要約する。

2.6.6.6.4.1 幼若ラット 4 週間反復投与用量設定試験

参照項目 4.2.3.5.4.1 PH-38809

非 GLP 反復投与用量設定試験では、幼若 Wistar ラット雌雄各 5 例からなる 4 群に、0、3、10 及び 30mg/kg/日のベルイシグアトを出生後 10 日から 4 週間強制経口投与した。ベルイシグアトは 0.5% Tylose®水溶液で調製し、投与容量は 5mL/kg とした。サテライト群を設け、1 日目、15 日目及び 29 日目に TK を検討した。

動物の一般状態を定期的に観察した。体重を毎日測定した。臨床検査（血液学的検査及び生化学的検査）を 31 又は 32 日目に行った。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、器官重量を測定して病理組織学的検査を実施した。

30mg/kg/日群では、雄 2 例が死亡し、他の雄 1 例で複数の一般状態所見（活動性低下、高足歩行、努力性呼吸、全身状態悪化及び立毛）がみられたため早期安楽死させた。この群の残り（雄 2 例及び雌 5 例）は 12 日目に早期剖検した。一般状態の変化は成熟ラットの反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.2）においても認められており、ベルイシグアトの強力な血管拡張作用によるものと考えられる。

10mg/kg/日群では、体重増加量の減少がみられ、雌のみでごく軽度の網状赤血球の増加と軽度な血清コレステロールの増加がみられたが、肝臓・骨髄・脾臓などの病理組織学的変化を伴わず、有害作用ではないと考えられた。3 及び 10mg/kg 群では、剖検及び器官重量測定及び病理組織学的検査において投薬の影響はみられなかった。

30mg/kg/日群でのみ、ベルイシグアトの降圧作用及び消化管に対する作用機序に関連した病理組織学的所見が認められ、これには腸管拡張とそれに続く回腸、盲腸及びその周囲の腸間膜の炎症が含まれ、早期死亡動物の病的状態や死亡の原因となった可能性が高いと考えられた。更に、30mg/kg/日群において、主に回腸のパネート細胞明瞭化が認められた。

TK データの要約を表 2.6.6.6- 4 に示す。29 日目の雄の曝露量は雌よりも低かったが、1 日目及び 15 日目は雌雄に差は認められなかった。1 日目の AUC 及び C_{max} は、用量比を下回る増加を示した。15 日目及び 29 日目は、3 及び 10mg/kg/日群のデータのみ得られ、曝露量の増加はほぼ用量に比例するか、用量比をわずかに上回った（雄の 29 日目）。C_{max} は、多くの場合、投与 4 又は 7 時間後であった。異なる測定日の曝露量の比較から、10mg/kg/日群の雌で AUC が 1 日目の約 75%であったことを除いて、15 及び 29 日目の AUC が顕著に減少（1 日目の約 20～40%）したことが示された。

表 2.6.6.6- 4 幼若ラット 4 週間反復投与用量設定試験における定常状態の曝露量（29 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	3	10	30*	3	10	30*
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	3510	18800	-	7780	31200	-
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	1.17	1.88	-	2.59	3.12	-
C_{max}	[µg/L]	332	2000	-	721	2620	-
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.111	0.200	-	0.240	0.262	-
t_{max}	[h]	2.00	4.00	-	2.00	2.00	-
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	14.8	7.4	-	14.3	11.5	-
R_{A3}		0.2	0.4	-	0.4	0.7	-
R_{A1}		0.4	0.9	-	0.6	1.2	-

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.
* due to early termination of the high dose group on Day 12 no data at steady state

30mg/kg/日で毒性所見が認められたため、NOAEL は 10mg/kg/日と推定された。10mg/kg/日でみられた所見は軽度な体重増加の減少、並びに複数の臨床生化学的検査項目のごく軽度な増加のみであり、有害でないと考えられた。

2.6.6.6.4.2 幼若ラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験（4 及び 8 週間休薬）

参照項目 4.2.3.5.4.2 PH-39764

幼若 Wistar ラットを用いて、生後 10 日から投与を開始し、4 週間の投与期間と 4 週間の休薬期間及び 13 週間の投与期間と 8 週間の休薬期間を設けた反復強制経口投与毒性試験を実施した。4 週及び 13 週の各コホートにおいて、各群雌雄各 12 例の幼若動物を対照群 1 群と投与群 3 群に割り付けた。TK 評価用に、各群雌雄各 15 例の動物を各用量群に割り付けた。0、1、3 及び 10mg/kg/日のベルイシグアトを 0.5% Tylose®水溶液で調製し、投与容量を 5mL/kg として投与した。用量は、用量設定試験（2.6.6.6.4.1）において 30mg/kg が MTD を超えたことに基づいて選択した。最初に 13 週間コホートの投薬及び休薬を行い、次に 4 週間コホートの投薬及び休薬を行い、最後に単回投与用の TK 評価サテライト群へ投薬した。

動物の一般状態を、投与期間中は 1 日 2 回、休薬期間中は 1 日 1 回観察した。体重を定期的に測定した。臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査）及び眼科学的検査は 4 週目及び 13 週目と休薬期間終了時に行った。発達指標を雄では生後 38～47 日、雌では生後 28～36 日に検査した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検を実施し、器官重量を測定し、病理組織学的検査を実施した。TK 評価は、サテライト動物では 1 日目、13 週間コホートでは 17 日目、35 日目及び 72 日目に行った。

幼若動物の用量設定試験及び成体ラットの反復投与毒性試験でみられたように、毒性プロファイルの特徴は、ベルイシグアトの薬理作用によって誘発される平滑筋の弛緩及び腸運動の変化に関連した消化管の所見であった。

4 週間コホート（主試験群及び休薬群）では死亡は認められず、10mg/kg/日まで一般状態の変化や病理組織学的変化は認められなかった。剖検所見として、盲腸の拡張（10mg/kg/日）や小腸内容物の硬さの変化（3mg/kg/日以上）がみられたが、腸管に関連する病理組織学的変化は認められなかった。

4 及び 13 週間コホートのいずれにおいても、ベルイシグアトの投与に起因した、体重、眼科学的検査、臨床検査、器官重量測定、大腿骨及び上腕骨長、並びに発達指標への影響はなかった。4 及び 8 週間の休薬期間に、ベルイシグアトの投与に関連する変化はみられなかった。

最初に投与を開始した 13 週間コホートの 10mg/kg/日群では、15 例が投与開始後 2 週間以内に早期死亡した。その内 4 例は剖検及び／又は病理組織学的検査により投与過誤が確認された（投与過誤に関する一般状態所見の有無を問わず）。7 例の早期死亡動物では、共食い（幼若ラットで一般的にみられる）又は初期の自己融解のため、死因を特定できなかったが、これらの 7 例のうち 2 例では、投与過誤が推察される一般状態の変化（呼吸音及び／又は努力性呼吸）がみられた。雌 1 例の死因は、被験物質投与に関連しない未分化肉腫であった。また、薬理作用を介した平滑筋弛緩による消化管運動の減少の影響と考えられる所見として、早期死亡 4 例（雄 2 例及び雌 2 例）で、軽度から重度の壊死性腸炎が認められた。これは、ベルイシグアト投与による過度の平滑筋弛緩に続発した腸運動障害に起因する腸内毒素症及び腸の炎症によるものと考えられた。

10mg/kg/日群の生存動物の数例で認められた一般状態の変化は、流涎増加、立毛、呼吸音、削痩、低体温、高足歩行などであった。これらは、成熟ラット反復投与毒性試験でみられた所見と一致しており、ベルイシグアトの血管拡張作用及び消化管運動に対する作用の二次的な変化と考えられる。これらの変化は、休薬時にはみられず、完全な回復性が示された。主試験群及び休薬群のいずれの生存動物においても、投薬に起因した病理組織学的所見はみられなかった。

1 及び 3mg/kg/日群で投薬に起因した死亡は認められず、並びに投薬期間中及び投薬終了後に一般状態の変化はみられなかった。

TK データを表 2.6.6.6- 5 に要約する。定常状態での曝露量は、ほぼ用量に比例して増加したが、雌では 3mg/kg/日から 10mg/kg/日まで、曝露量の増加が用量比を下回る傾向がみられた。曝露量に雌雄差は認められなかった。異なる測定日の曝露量の比較から、AUC が 17 日目以降顕著に減少（1 日目の約 10%～50%）することが示された。

表 2.6.6.6- 5 幼若ラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（72 日目）

		Males			Females		
Dose	[mg/kg]	1	3	10	1	3	10
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	1790	4930	14400	1680	4670	10800
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	1.79	1.64	1.44	1.68	1.56	1.08
C_{max}	[µg/L]	198	446	1560	237	532	1700
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.198	0.149	0.156	0.237	0.177	0.170
t_{max}	[h]	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	7.9	8.2	3.2	2.1	4.4	2.9
R_{A3}		0.2	0.3	0.4	0.2	0.3	0.3
R_{A1}		0.5	0.5	1.0	0.7	0.6	0.8

$R_{A1} = C_{max,\ SS} / C_{max,\ Day\ 1}$.
$R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$.

10mg/kg/日における死亡、一般状態の変化及び病理組織学的検査で認められた壊死性の腸炎に基づき、幼若ラットにベルイシグアトを 13 週間経口投与したときの NOAEL は 3mg/kg/日と推定された。

2.6.6.7 局所刺激性試験

ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験（それぞれ最長 26 週間及び 39 週間投与）の一環として、局所刺激性を評価した。被験物質又は投与媒体の局所的な影響を評価するため、胃及び腸を形態学的に詳細に検査した。ラット 4 及び 13 週間、並びに 26 週間反復投与試験における消化管の変化は、sGC 刺激薬の薬理作用である平滑筋弛緩による二次的な影響と考えられた（2.6.6.3.2）。いずれの種にも剖検及び病理組織学的検査において投薬に関連した消化管に対するその他の影響は認められなかった。以上より、ベルイシグアトに局所的なオフターゲットの刺激性は認められないと判断した。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性

抗原性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.2 免疫毒性

反復投与毒性試験においてベルイシグアトは免疫毒性を示さず（2.6.6.3）、免疫毒性リスクはみられなかったため、ICH S8「医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン」に従い、追加の免疫毒性試験は実施しなかった。ラット 4 週間試験（2.6.6.3.2.2）に含まれた免疫毒性評価（脾臓細胞数、脾臓細胞サブポピュレーション解析など）において、免疫系に対する直接的な影響は認められなかった。また、マウス、ラット及びイヌ反復投与試験の結果から、免疫抑制作用やリンパ組織に対する有害作用はみられなかった。更に、長期にわたる薬理作用に起因した平滑筋の弛緩とその二次的な運動障害や腸内毒素症をもたらす消化管作用を除いて、炎症性の有害作用は認められなかった。これらの試験における血液学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的評価を総合すると、ベルイシグアトが免疫毒性には関連しないことが示された。

2.6.6.8.3 機序検討

ベルイシグアトはメラニン含有組織と結合するため（2.6.4.4.1.2）、有色 Long Evans ラットを用いて、神経メラニンを含む神経組織中のベルイシグアトの蓄積が非臨床における安全性上の懸念をもたらすかどうか評価するため、予備試験を含む反復投与毒性試験を実施した。これらの試験の要約を以下の項に示す。

2.6.6.8.3.1 雄 Long Evans ラット 2 週間反復投与予備毒性試験

参照項目 4.2.3.7.3.1 PH-38568

2 週間反復投与非 GLP 予備試験において、系統に特異的な全体的な忍容性及び TK の違いを、Wistar ラット（ベルイシグアトの一般毒性評価系統）と Long Evans ラット間で検討した。雄 Long Evans ラット 10 例からなる群にベルイシグアトを 0、10 及び 30mg/kg/日の用量で 14 日間強制経口投与した。ベルイシグアトはエタノール／Kolliphor HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。

一般状態を定期的に観察した。体重、摂餌量及び摂水量を定期的に測定した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検を実施した。TK 評価用の採血は、1 日目及び 11 日目に行った。

いずれの群にも死亡及び一般状態への影響はみられなかった。30mg/kg/日において平均体重のわずかな減少が認められたが、その差は統計学的に有意でなく、正常な変動の範囲内と考えられた。投薬群の体重増加は、対照群と同程度であった。30mg/kg における摂餌量は、投与 1 週目に

一過性の低値を示したが、投与 2 週目には対照群と同程度であった。ラットにおける他の反復投与毒性試験と同様、摂水量は投薬群の方が多かった。これはベルイシグアトの血行動態作用による二次的な変化と考えられる。被験物質に関連した剖検所見は認められなかった。

TK データの要約を表 2.6.6.8- 1 に示す。11 日目の AUC 及び C_{max} は用量に比例して増加した。多くの場合 C_{max} は投与 7 時間後であった。11 日目の 24 時間後のトラフ濃度は C_{max} の 6%～9%であった。1 日目のトラフ濃度は C_{max} の 25%及び 75%であった。異なる測定日の曝露量の比較では、11 日目に AUC の明らかな増加は認められなかった。定常状態での曝露量（AUC 及び C_{max}）は、Wistar ラットの 26 週試験で対応する用量群の曝露量と同程度であった（2.6.6.3.2.4）。

表 2.6.6.8- 1 雄 Long Evans ラット 2 週間反復投与予備毒性試験における定常状態の曝露量（11 日目）

Dose	[mg/kg]	10	30
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	46500	146000
$AUC_{(0-24)/norm}$	[kg·h/L]	4.65	4.85
C_{max}	[µg/L]	4180	12900
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.418	0.429
t_{max}	[h]	7.00	7.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	5.9	8.6
R_{A1}		1.7	1.8
R_{A3}		1.2	1.1

$R_{A1} = C_{max, ss} / C_{max, Day 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24), ss} / AUC_{(0-24), Day 1}$

高用量 30mg/kg/日まで有害作用は認められず、NOAEL は 30mg/kg/日と推定された。

2.6.6.8.3.2 雄 Long Evans ラット 13 週間反復投与毒性試験

参照項目 4.2.3.7.3.2 PH-38403

雄の有色 Long Evans ラットにベルイシグアトを 0、10 及び 30mg/kg/日の用量で投与した。用量は、30mg/kg/日まで良好な忍容性が認められた Wistar ラットの 26 週間反復投与試験（2.6.6.3.2.4）及びラット系統間で毒性プロファイルや曝露量に顕著な差がみられないことを示した Long Evans ラットの 2 週間投与試験（2.6.6.8.3.1）に基づいて選択した。ベルイシグアトはエタノール／Kolliphor HS 15®／水（10/40/50v/v/v）で調製し、投与容量は 10mL/kg とした。動物は各群 10 例からなる対照群 1 群と投与群 2 群に割り付けた。TK 評価用に、追加の動物を各用量群に割り付けた。投与開始時の動物は約 7 週齢であった。

一般状態を定期的に観察した。体重、摂餌量及び摂水量を定期的に測定した。試験終了時に生存動物は安楽死させ、剖検し、病理組織学的検査のため、すべての動物の脳、眼及び頭部（内耳を含む）を固定した（黒質を含む脳の 7 レベル、有色血管条を含む内耳及び色素上皮を含む網膜）。TK 用の採血は、1 日目及び定常状態となる試験終了時付近の時点（90 日目）に行った。

ベルイシグアトの忍容性は良好で、有害作用は認められなかった。投薬に関連した所見はいずれの群にもみられた摂水量の増加のみであり、被験物質に関連した血行動態作用による二次的な変化と考えられた。投薬に関連した剖検所見はなく、眼（色素上皮）、脳（黒質）及び内耳（血管条）の有色組織の病理組織学的検査では、投薬に関連した影響は認められなかった。

TK データの要約を表 2.6.6.8- 2 に示す。曝露量（AUC 及び C_{max}）は、10mg/kg/日から 30mg/kg/日まで用量に比例して増加した。C_{max} は、多くの場合、投与 7 時間後であった。24 時間後のトラフ濃度は C_{max} の 10%未満であった。90 日目の曝露量は 1 日目に比べて AUC は 1.3 倍、C_{max} は 1.2～1.8 倍であり、わずかに増加した。ベルイシグアト投与後の有色ラットにおける曝露

量は非有色 Wistar ラットと同程度であり、Long Evans ラットの 2 週間予備試験とも同程度であった。

表 2.6.6.8- 2 雄 Long Evans ラット 13 週間反復投与毒性試験における定常状態の曝露量（90 日目）

Dose	[mg/kg]	10	30
$AUC_{(0-24)}$	[μg·h/L]	43500	124000
$AUC_{(0-24)/norm}$	[kg·h/L]	4.35	4.12
C_{max}	[μg/L]	3650	11600
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.365	0.388
t_{max}	[h]	7.00	7.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	7.9	7.6
R_{A1}		1.2	1.8
R_{A3}		1.3	1.3

$R_{A1} = C_{max, SS} / C_{max, Day 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),SS} / AUC_{(0-24),Day 1}$

高用量 30mg/kg/日まで有害作用は認められず、NOAEL は 30mg/kg/日と推定された。

2.6.6.8.4 依存性

ベルイシグアトは、臨床有効濃度（MRHD 投与時の非結合型 C_{max}）では神経伝達物質受容体及びトランスポーターに結合しないことが示され（2.6.2.3.1）、ラットの定量的全身オートラジオグラフィーで、ベルイシグアトが血液脳関門を容易に通過しないことが示されている（2.6.4.4.1.1）。更に、ベルイシグアトは P-gp の基質として（2.6.4.7.4.2）脳から能動的に排出される。ラットの安全性薬理試験（2.6.2.4.2.1）、並びにラット及びイヌの反復投与毒性試験（2.6.6.3）において、ベルイシグアトの中枢神経系への直接的な影響はみられなかった。高曝露下のラットで散発的に観察された行動の変化（歩行／姿勢の軽微な異常、活動性低下及び正向反射の軽微な遅延を含む）は、直接的な中枢神経系への影響ではなく、血管平滑筋の弛緩、血管拡張、並びに血圧及び体温低下に続発した変化と考えられた。このような薬理学的プロファイルは、薬物乱用リスクに関連しないと考えられる。以上より、中枢神経系への曝露が低く、安全性薬理試験及び反復投与毒性試験において直接的な中枢神経系への影響がみられなかったことから、ベルイシグアトの依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.5 代謝物

代謝物 M-1（BAY 1222707）が、ヒト血漿中の主要代謝物である（2.6.4.5.1.4）。代謝物 M-1 はマウス、ラット及びイヌ血漿中において検出されているが、これらの非臨床動物種では微量代謝物であった（2.6.4.5.1）。

M-1 はベルイシグアトの N-グルクロン酸抱合体である（アシルグルクロン酸抱合体ではない）。ラット sGC を安定的に過剰発現する CHO レポーター細胞株を用いた試験では、10μM までの濃度で薬理活性を認めず（2.6.2.2.1.3）、10μM で行った 77 種類のオフターゲット（受容体、トランスポーター及び酵素）との結合に関する放射性リガンド結合試験及び酵素試験において、阻害作用を示さなかった（2.6.2.3.1）。

FDA ガイダンス（Safety Testing of Drug Metabolites）[14] によると、第Ⅱ相の抱合反応により、一般的に化合物はより水に溶けやすく薬理学的に不活性となるため、更なる評価の必要はないとされている。同様に、ICH M3（R2）及び ICH M3 （R2）Q&A では、ほとんどのグルクロン酸

抱合体には毒性学的懸念がないとされている。例外は、化学的転位を受けるアシルグルクロン酸抱合体などの場合であるが、*in vitro* 及び *in vivo* の検討で、M-1 が化学的転位を受けるという根拠は認められていない（2.6.4.9）。従って、この代謝物を毒性試験で検討する必要はないが、ラット及びマウスがん原性試験において、念のため血漿中 M-1 濃度を測定した（2.6.6.5）。MRHD における推定ヒト M-1 曝露量は、マウスでは雌の総 AUC（MRHD の 1 倍）及び雌雄の非結合型 AUC〔MRHD の 2 倍（雄）及び 6 倍（雌）〕で、ラットでは担保の下限付近であるが非結合型 AUC〔MRHD の 0.43 倍（雌雄平均）〕で、担保されていた（表 2.6.6.9- 9）。マウス及びラットの反復投与毒性試験、並びにラットの生殖発生毒性試験では、がん原性試験と同等以上の用量が用いられたことから、ヒトの M-1 曝露量は、これらの試験の動物の曝露量によっても担保されていたと考えられる。

2.6.6.8.6 不純物

ICH Q3A（R2）ガイドラインにおける構造決定が必要な閾値を上回る不純物はなかった（2.3.S.4.1 及び 2.3.P.5.1）。

2.6.6.8.7 In vitro 3T3 NRU（ニュートラルレッド取り込み）光毒性試験

参照項目 4.2.3.7.7.1 PH-36774

ベルイシグアトは波長範囲 290～700nm で光吸収を示すため、*in vitro* 光毒性試験を実施した。

ベルイシグアトの光毒性を検討するため、*in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験を実施した。5J/cm²の UVA 照射下及び UVA 非照射下において、マウス線維芽細胞（3T3.A31）を 60μg/mL までの濃度のベルイシグアトに 1 時間曝露した。ニュートラルレッドを用いて、24 時間後に細胞生存率を測定した。生存率の試験後、対照の非照射細胞の EC_{50} と UVA 照射細胞の EC_{50} の比率として定義される光毒性係数（PIF）によって光毒性を評価した。

この *in vitro* 試験の結果、PIF は 1 であった。陽性対照のクロルプロマジン塩酸塩の PIF は 23 であった。

したがって、ベルイシグアトに光毒性はないと考えられる。

2.6.6.9 考察及び結論

ベルイシグアトは sGC の選択的刺激薬であり、慢性心不全の治療薬として開発されている。最高推奨臨床用量（MRHD）は 10mg の 1 日 1 回経口投与であり、駆出率が低下した心不全患者の第Ⅱ／Ⅲ相の母集団 PK データに基づくと、定常状態での総 AUC は 6680μg･h/L、定常状態での平均総 C_{max} は 350μg/L であった（2.7.2.3.1.6）。非臨床リスク評価及び安全域の算定は、この MRHD に基づいて行った。ベルイシグアトの毒性プロファイル及び TK プロファイルを明らかにするため、包括的な非臨床安全性プログラムを実施した（表 2.6.6.1- 1）。重要な試験はすべて GLP に準拠して実施した。

ラット及びイヌにおける反復経口投与毒性試験において、それぞれ 3～100mg/kg/日及び 0.5～25mg/kg/日の用量範囲を検討した。効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験に基づくと、持続的な血圧低下が、麻酔ラットに 0.3mg/kg 以上（3 及び 10mg/kg でそれぞれ最大-12 及び-45mmHg）、覚醒ラットに 1 及び 3mg/kg（約 15%）（2.6.2.2.2）の単回経口投与で生じたことから、毒性試験で評価した用量は明らかにベルイシグアトの薬理作用発現用量を十分上回っていた。同様の血圧低下が、覚醒イヌの 0.6～6mg/kg（それぞれ最大 11％～23％の収縮期血圧低下）（2.6.2.4.2.3）でみられた。薬理作用に基づく血圧低下は、ラットでは約 20 時間後に回復し（2.6.2.2.2.2）、イヌは完全な回復ではないが、検査した 16 時間以内にベースライン方向への上昇がみられた（2.6.2.4.2.3）。また、薬理作用から予想されるとおり、ベルイシグアトはラットにおいて 5mg/kg 以上の用量で平滑筋の弛緩によりラットの消化管運動を抑制した（2.6.2.4.2.4）。したがって、ベルイシグアトの毒性プロファイルの特徴は、長期にわたる薬理作用発現量を上回る用量の反復投与に伴う sGC 刺激及び cGMP 増加という薬理作用に続発する変化であった。主な所見としては、RAAS 及びアドレナリン作動系の代償性反応及び活性化を含む心血管所見、平滑筋弛緩による消化管に対する作用、成長期の急成長中のラットで認められ、成体ラットやイヌにはみられない骨の恒常性維持に関わる NO-sGC-cGMP 経路への影響による骨所見が認められた。マウス、ラット及びイヌにおいて、検討した最高用量まで、オフターゲットの毒性は認められなかった。

マウスでは、2 年間がん原性試験の用量選択のため、ベルイシグアトを最長 13 週間反復混餌投与した（2.6.6.3.1.1 及び 2.6.6.3.1.2）。13 週間の曝露量は、MRHD での臨床曝露量に対して、総 AUC で最大 13 倍（雌）及び 19 倍（雄）、非結合型 AUC で最大 49 倍（雌）及び 70 倍（雄）に達した（表 2.6.6.9- 1）。13 週間試験では、雄マウスの曝露量が雌よりもわずかに高かったが、2 週間混餌投与予備試験では、雌雄に曝露量の明確な差は認められなかった。検討した用量範囲全体で曝露量は用量に比例して増加した。

表 2.6.6.9- 1 マウスの毒性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Daily dose [mg/kg/day]	Systemic exposure							
	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
2-week pilot (feeding) toxicity study in mice (4.2.3.2.1, PH-38271)								
17 (M)[a]	1780	5	27900	4	142	19	2229	15
46 (M)[a]	5230	15	77800	12	418	55	6216	43
167 (M)[a]	**14200**	**41**	**242000**	**36**	**1135**	**149**	**19336**	**133**
24 (F)[a]	1730	5	28800	4	138	18	2301	16
72 (F)[a]	4500	13	75900	11	360	47	6064	42
241 (F)[a]	**14500**	**41**	**230000**	**34**	**1159**	**153**	**18377**	**126**
13-week (feeding) toxicity study in mice (4.2.3.2.2, PH-38233)								
4 (M)[a]	559	2	10800	2	45	6	863	6
12 (M)[a]	1820	5	36100	5	145	19	2884	20
48 (M)[a]	**6710**	**19**	**128000**	**19**	**536**	**71**	**10227**	**70**
5 (F)[a]	370	1	7340	1	30	4	586	4
11 (F)[a]	941	3	19500	3	75	10	1558	11
50 (F)[a]	**4430**	**13**	**89400**	**13**	**354**	**47**	**7143**	**49**
Estimated human exposure[b]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

Bolded values represent the NOAEL in each study.
MoE = Margin of Exposure
[a] Based on daily substance intake of satellite animals
[b] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)
f_u mouse = 7.99%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

これらのデータから、マウスへのベルイシグアト投与後の曝露量により、毒性プロファイルを詳細に評価することが可能と判断した。

ベルイシグアトの 2 週間投与予備試験では、全用量群の雄及び 1000ppm 群の雌に認められた一般状態所見（腹囲の増加）及び 1000ppm 群で認められた剖検所見（盲腸拡張）は、腸の平滑筋弛緩による過度な薬理作用とそれに続く消化管運動への影響によるものと考えられた。2 週間投与試験及び 13 週間投与試験では、摂水量の増加、並びに血漿クレアチニン及び尿素の低下が認められた。これはベルイシグアトの薬理学的な血管拡張作用及び降圧作用によるものと考えられる。低血圧は、おそらくアンジオテンシンⅡを介して、水分摂取を促進することが知られており、これは他の血管拡張薬でも報告されている[15, 16]。また、2 週間投与試験では、わずかな血液希釈〔300ppm 群及び 1000ppm 群（雄は 300ppm 群のみ）の赤血球及びヘマトクリットの減少〕が認められたが、これは被験物質の血行動態作用による二次的なものと考えられ、他の血管拡張薬でも報告されている[1)]。

以上より、マウスへの 13 週間反復投与後のベルイシグアトの忍容性は良好で、混餌投与の最高用量まで、オフターゲットの毒性は認められなかった。雌雄に定性的又は定量的毒性反応の重要な差は認められなかった。

ラットでは、最長 26 週間の反復強制経口投与試験でベルイシグアトの毒性プロファイルを検討した（2.6.6.3.2）。

曝露量は、総 AUC 及び C_{max} と非結合型 AUC 及び C_{max} の両方に関して、10mg の MRHD でのヒト曝露量よりも大幅に高かった（表 2.6.6.9- 2）。ラットの重要な反復投与毒性試験では、3～60mg/kg の用量を投与した。雌雄間の曝露量に顕著な差は認められず、検討した用量範囲全体で

曝露量は用量に比例して増加した。26 週間投与試験（2.6.6.3.2.4）では、ラットの総 AUC は 10mg/日のベルイシグアトをヒトに投与したときの曝露量よりも最大 22 倍（雄）～25 倍（雌）高かった。非結合型 AUC は最大 47 倍（雄）～52 倍（雌）高かった。

表 2.6.6.9- 2 ラットの毒性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Systemic exposure								
Daily dose [mg/kg/day]	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
2-week pilot toxicity study in rats (4.2.3.2.3, PH-40501)								
10 (M)	**3080**	**9**	**30700**	**5**	**140**	**18**	**1397**	**10**
30 (M)	7530	22	75900	11	343	45	3453	24
100 (M)	13100	37	179000	27	596	78	8145	56
10 (F)	**3480**	**10**	**35400**	**5**	**158**	**21**	**1611**	**11**
30 (F)	9420	27	98000	15	429	56	4459	31
100 (F)	23100	66	274000	41	1051	138	12467	86
4-week toxicity study in rats (4.2.3.2.4, PH-36714)[a]								
15 (M)	8004	23	74600	11	364	48	3394	23
30 (M)	16042	46	152000	23	730	96	6916	48
60 (M)	23602	67	240000	36	1074	141	10920	75
15 (F)	8982	26	86400	13	409	54	3931	27
30 (F)	15583	45	158000	24	709	93	7189	49
60 (F)	24258	69	253000	38	1104	145	11512	79
13-week toxicity study in rats (4.2.3.2.5, PH-37470)								
3 (M)	1440	4	16200	2	66	9	737	5
10 (M)	**4310**	**12**	**52600**	**8**	**196**	**26**	**2393**	**16**
30 (M)	10900	31	146000	22	496	65	6643	46
3 (F)	1930	6	23500	4	88	12	1069	7
10 (F)	**5630**	**16**	**72900**	**11**	**256**	**34**	**3317**	**23**
30 (F)	14400	41	212000	32	655	86	9646	66
26-week toxicity study in rats (4.2.3.2.6, PH-37899)								
3 (M)	1360	4	13800	2	62	8	628	4
10 (M)	4700	13	45000	7	214	28	2048	14
30 (M)	**12500**	**36**	**150000**	**22**	**569**	**75**	**6825**	**47**
3 (F)	1530	4	16800	3	70	9	764	5
10 (F)	6000	17	62600	9	273	36	2848	20
30 (F)	**18400**	**53**	**167000**	**25**	**837**	**110**	**7599**	**52**
Estimated human exposure[b]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

Bolded values represent the NOAEL in each study.
MoE = Margin of Exposure
[a] NOAEL of the 4-week study is <15 mg/kg/day
[b] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)
f_u rat = 4.55%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

ラットへのベルイシグアト投与後の曝露量から、毒性プロファイルを詳細に評価することが可能と判断した。

ベルイシグアトを 30mg/kg/日までの用量でラットに反復経口投与したときの忍容性は全般的に良好であったが、100mg/kg/日で死亡が認められ（2.6.6.3.2.1）、60mg/kg/日の 4 週間投与後に全身状態が悪化したことから（2.6.6.3.2.2）、60mg/kg/日以上では過度な薬理作用により MTD を超えたと判断した。これらの用量で達した曝露量は、臨床曝露量を大幅に超えていた。

ラットの毒性プロファイルの特徴として、ベルイシグアトの血管拡張作用、血行動態作用又は消化管に対する作用に起因する変化が認められた。曝露マージンが高い投与量では、強い薬理作用に関連して、長期投与で回復傾向のある変化（体重増加と摂餌量の減少、歩行異常、興奮行動）がみられた。4 週間反復投与毒性試験では、認められた影響のほとんどで完全又は少なくとも部分的な可逆性が認められた（2.6.6.3.2.2）。4 週間反復投与毒性試験では、歩行異常（15mg/kg/日以上）及び／又は興奮行動（30mg/kg/日以上）などの一般状態の変化が、薬理作用が発現する曝露量を大きく上回る曝露量（非結合型 C_{max} で MRHD の 48～145 倍）で認められた。ラットの安全性薬理試験では、15mg/kg/日の単回投与後に歩行／姿勢異常が認められたが（非結合型 C_{max} で MRHD の 37 倍）、24 時間以内に完全に回復している（2.6.2.4.2.1.1）。運動協調性（RotaRod®試験）及びペンチレンテトラゾール誘発痙攣モデルにおけるベルイシグアト投与に関連した影響は、15mg/kg までみられなかった（2.6.2.4.2.1.2 及び 2.6.2.4.2.1.3）。さらに、ベルイシグアトは、P-糖タンパク（P-gp）の基質であり、ラットでは血液脳関門通過性が低い。以上より、高曝露での散発的な歩行異常は、直接的な中枢神経系への作用に関連したものではなく、強力な血管拡張作用、降圧作用及び体温低下作用の二次的な変化と考えられる。また、歩行異常は、他の血管拡張薬、例えば PDE5 阻害剤バルデナフィルを用いたラット毒性試験でも認められている[17]。さらに、心不全患者の臨床試験において、有効用量での歩行に関する有害事象は認められておらず（2.7.4.2.1）、薬理作用が発現する曝露量を大きく超える曝露量で正常血圧ラットでみられた散発的な歩行異常は、臨床治療用量を投与したヒトでは起こらないことを強く示唆している。

マウスと同様、ラットの反復投与で認められた摂水量の増加と、関連した尿量の増加及び血漿クレアチニンの減少、並びに電解質への軽微な影響は有害ではなく、被験物質に関連した血管拡張作用による二次的な変化と考えられる。また、血液希釈に起因する赤血球パラメータのわずかな減少及び総血漿タンパクの減少も、ベルイシグアトの作用機序に関連した血管拡張作用による二次的な変化と考えられる。その他の薬理学的な影響として、変性や壊死を伴わない血管に対する軽微な病理組織学的所見（心血管明瞭化及び腸間膜血管系の叢状変化）及び副腎に対する影響（球状帯及び束状帯の肥大、ラット長期毒性試験における全身血管抵抗低下に対する逆調節としての RAAS 及びアドレナリン作動系の活性化に起因する髄質の変化）などが認められた。これらはいずれも、ベルイシグアトの血行動態作用による二次的な変化であり、代償性の適応を反映していると考えられる。ラットでは、PDE 3、4、5 阻害剤のような局所血流を増加させる降圧薬の投与後に、叢状血管症[18, 19]とも呼ばれる内臓血管系の変化が生じることが知られている[20]。一般的に、市販の血管拡張薬においてラット又はイヌへの投与で認められる血管の変化は、ヒトで報告されていない[21]。

平滑筋弛緩による消化管への影響として、糞の変化、流涎の増加、剖検時の腸の延長及び拡張、腸内容物の硬さの変化、空腸及び回腸におけるパネート細胞明瞭化などが認められた。ラットの 13 週間投与試験では、10mg/kg 以上の群の雄に炎症性盲腸粘膜浸潤の軽度な増加が認められ、これは長期にわたる運動障害とそれに続く軽度な腸内毒素症及び粘膜炎症反応によるものと考えられる。

成長期の急成長中のラットでは、4 週間反復投与毒性試験で 15mg/kg 以上、13 週間反復投与毒性試験で 30mg/kg の投与後に、成長板肥厚、過骨症及び骨幹端・骨幹骨のリモデリングなどの骨に対する影響が認められた。ラットにおけるこれらの所見は、リオシグアトなどの既存の sGC 刺激薬でも知られており、骨の恒常性維持に関わる NO-sGC-cGMP 経路への影響による二次的なものである[22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30]。幼若動物毒性試験では、10mg/kg/日まで、骨に対する被験物質に関連した影響は認められなかった。これは、この試験における定常状態での曝露量が成長期のラットの試験における定常状態の曝露量よりも低かったためと考えられる（表 2.6.6.9- 3）。

表 2.6.6.9- 3 幼若ラットと成長期のラットにおける定常状態の曝露量

Daily dose [mg/kg]	C_{max} [µg/L]	$AUC_{(0-24)}$ [µg·h/L]
13-week juvenile toxicity study in rat (4.2.3.5.4.2, PH-39764)		
1 (M)	198	1790
3 (M)	446	4930
10 (M)	1560	14400
1 (F)	237	1680
3 (F)	532	4670
10 (F)	1700	10800
4-week toxicity study in rat (4.2.3.2.4, PH-36714)		
15 (M)	**8004**	**74600**
30 (M)	16042	152000
60 (M)	23602	240000
15 (F)	**8982**	**86400**
30 (F)	15583	158000
60 (F)	24258	253000
13-week toxicity study in rats (4.2.3.2.5, PH-37470)		
3 (M)	1440	16200
10 (M)	4310	52600
30 (M)	**10900**	**146000**
3 (F)	1930	23500
10 (F)	5630	72900
30 (F)	**14400**	**212000**

Bolded values represent the LOELs for bone findings in the respective studies

また、ラットへの長期間（26 週間）投与後には、曝露量が同程度であったにもかかわらず、病理組織学的検査で骨所見はみられず、骨代謝に関連する複数のパラメータ（例：パラトルモン、カルシウム、クレアチニン、CTX 及びカルシトリオール）の測定では、最高用量である 30mg/kg/日まで、骨に対する投薬に関連した影響は認められず、ヒト MRHD に対する曝露比は 22～25 倍（それぞれ雄及び雌、総 AUC）又は 47～52 倍（非結合型 AUC）であった。高齢ラット及びほぼ成長が完了したイヌでは骨への影響（病理組織学的検査及び骨バイオマーカーの変化）が認められなかったことから、骨代謝に対する影響は、主により高い代謝回転を有する成長過程にある骨で重要であることが裏付けられる。したがって、成長期のラットに認められた骨所見は、骨及び軟骨構造の変化が、成長期の動物におけるこれらの組織の高い代謝回転によって主に誘導されるものであること、並びに本薬の予定患者集団は成人であることから、ヒトでは重要でないと考えられる。ラットにおける骨の所見は骨形成の増加であり、主に海綿（骨幹端）骨の骨量及び骨密度減少が認められる各種のラット骨粗しょう症モデルにおける骨粗しょう症性の変化と類似したものではない[31)]。

ラット 4 週間投与試験で実施した免疫毒性評価（2.6.6.3.2.2）では、免疫系への直接的な影響は認められなかった。また、反復投与毒性試験において、免疫抑制作用やリンパ組織に対する有害作用は認められなかった。更に、これらの試験では、反復投与時の長期にわたる薬理作用によって説明可能な消化管作用による平滑筋弛緩、二次的な運動障害及び腸内毒素症に至ったものを除いて、炎症性の作用は認められなかった。これらの試験における血液学的検査、器官重量、剖検及び病理組織学的評価を総合すると、ベルイシグアトは免疫毒性を誘発しないと考えられる。

ラット肝臓では、長期投与後、有害でない肝代謝酵素誘導によるものと考えられる軽微な適応性の所見（軽微な肝細胞肥大）が認められた。ヒトでは、ヒト肝細胞を用いた *in vitro* の検討に基づいて、ベルイシグアト及びその血漿中の主要代謝物である M-1 は CYP を誘導しないと考えられる（2.6.4.7.3）。

ラットの 2 週間、4 週間及び 26 週間試験で認められた胆管明瞭化は進行の徴候がみられなかったことから、胆管系に対する長期的な有害作用はないことが示された。更に、ラット 4 週試験では、2 週間の休薬後に完全に回復した。これらの所見がヒト曝露量の 20 倍（総 AUC）及び 40 倍（非結合型 AUC）を超える曝露量でのみ認められ、安全域が長期投与後に減少しなかったことを考えると、これらの胆管所見が臨床投与用量で生じることはないと考えられる。また、ラットの反復投与毒性試験において、これらの所見に関連すると考えられる肝酵素の明確な変化はなかった。

同様に、4 週間試験の 60 mg/kg 群の雄に認められた腎臓の遠位尿細管肥大は、10mg でのヒト曝露量に対して 36 倍（総 AUC）又は 75 倍（非結合型 AUC）という高い曝露量でのみ生じ、完全に回復し、変性性の所見は見られなかったことから、これらの変化は臨床的に重要でないと考えられる。腎臓では、更に腎灌流の増加によって説明可能と考えられる好塩基性尿細管の減少も認められた。

ラットの反復投与毒性試験において、尿沈渣に結晶様の構造が認められた。これらの結晶は 15mg/kg（4 週間試験）又は 10mg/kg（13 週間及び 26 週間試験）以上の用量、すなわちヒト MRHD の 7 倍（総 AUC）又は 14 倍（非結合型 AUC）以上に相当する曝露量で認められた。結晶様構造の組成は不明であるが、いずれの試験においても、結晶様構造と上部又は下部尿路の変性性、再生性、炎症性又は過形成性所見との関連は認められなかった。したがって、ヒト MRHD の約 20 倍超（総 AUC）又は約 50 倍超（非結合型 AUC）までの長期投与において、結晶と有害作用との関連はみられなかった。また、ラットがん原性試験では、MRHD でのヒト曝露量の約 20 倍（総 AUC）又は約 40 倍超（非結合型 AUC）の用量まで、尿路の過形成性又は腫瘍性病変は認められなかった。これらの結晶様構造は、原尿濃縮後の被験物質の再結晶化を示している可能性が考えられるが、沈渣中の結晶を濃縮し、結晶中の薬物由来物質を同定しようとする試みは成功しなかった。しかし、ベルイシグアトの比較的低い溶解度〔pH4.5～7、37℃の緩衝水溶液中で 1～2mg/L（2.3.S.1.3.9）〕を考慮し、以下の計算に基づいて、結晶にはベルイシグアトが含まれると推定した。

尿中結晶が認められた最低用量である 10mg/kg のラットへの投与では、約 0.9mg/kg のベルイシグアトが腎排泄された〔経口投与後は、投与量の約 9%が未変化体として腎排泄されるため（2.6.4.5.1.2）〕。ラットの反復投与毒性試験における尿の pH 範囲（5.90～7.05）において、ラットの平均尿量が約 30mL/kg/日であると仮定すると[32]、尿中の結晶様構造が認められた最低用量における尿中ベルイシグアト濃度は 30mg/L 程度であると推定できる。これは、緩衝水溶液中のベルイシグアトの溶解度の上限よりも大幅に高い（15～30 倍）。したがって、尿中のいくつかのタンパク質やその他の高分子成分が化合物の可溶化を助ける可能性があることを考慮したとしても、これらの試験において、ベルイシグアトの濃度はラット尿中の溶解度の上限を上回っていると考えられる。すなわち、観察された結晶様構造は、原尿濃縮後の被験物質の再結晶化を示している可能性が考えられる。一方、MRHD である 10mg/日を投与したヒトでは、0.9mg/日（投与量の 9%が尿中に未変化体として排泄されるため）が尿中に排泄されると考えられる（2.6.4.5.1.4）。ヒト尿量の中央値が約 1400mL/日であると仮定すると[33]、ヒト尿中のベルイシグアト濃度は約 0.64mg/L となる。これは、緩衝水溶液（pH4.5～7）中のベルイシグアトの溶解度の上限を下回っており、尿中結晶が認められた最低用量におけるラット尿中の推定ベルイシグアト濃度よりも約 50 倍低い。これらの情報から、ヒトで尿中のベルイシグアトの結晶化は生じないと予想される。これは、尿沈渣分析を実施したすべての第 I 相試験（単回漸増投与、反復漸増投与及び腎機能障害試験）の結果によって検証されている。これらの臨床試験で、未知の結晶は認められなかった（2.7.2.2.2 及び 2.7.2.2.3）。以上より、高い曝露域においてラットの尿路に反応性の変化や有害な変化が認められなかったこと、第 I 相試験の尿検体に本薬に関連した増加又は変化が認められなかったこと、及びヒト尿中の推定ベルイシグアト濃度が低い（ベルイシグアトの溶解度上限を下回っており、ラット尿よりも約 50 倍低い）ことを考慮すると、ラットで認められた結晶は、患者へのリスクにはならないと考えられる。

マウスと同様、反復投与後のラットには、検討した最高用量までオフターゲットの影響は認められず、雌雄に定性的又は定量的毒性反応の重要な差は認められなかった。

イヌでは、最長 39 週間の反復強制経口投与試験でベルイシグアトを包括的に検討した（2.6.6.3.3）。

曝露量は、総 AUC 及び C_{max} と非結合型 AUC 及び C_{max} のいずれも、10mg の MRHD でのヒト曝露量よりも高かった（表 2.6.6.9- 4）。イヌの重要な反復投与毒性試験では、0.5～25mg/kg の用量を投与した。雌雄に顕著な曝露量の差は認められず、検討した用量範囲全体で曝露量は用量に比例して増加した。39 週間投与後のイヌ（2.6.6.3.3.4）では、総 AUC は MRHD の曝露量よりも最大 2 倍、非結合型 AUC は最大 8 倍高かった。

表 2.6.6.9- 4 イヌの毒性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Systemic exposure								
Daily dose [mg/kg/day]	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
2-week pilot toxicity study in dogs (4.2.3.2.7, PH-40741)								
1 (M)	52	0.1	604	0.1	5	1	62	0.4
3 (M)	131	0.4	2130	0.3	13	2	217	1
10 (M)	**810**	**2**	**8010**	**1**	**83**	**11**	**817**	**6**
1 (F)	175	1	1350	0.2	18	2	138	1
3 (F)	1190	3	7840	1	121	16	800	5
10 (F)	**706**	**2**	**7690**	**1**	**72**	**9**	**784**	**5**
4-week toxicity study in dogs (males and females pooled) (4.2.3.2.8, PH-36756)								
2.5	**939**	**3**	**6390**	**1**	**96**	**13**	**652**	**4**
7.5	2220	6	14100	2	226	30	1438	10
25/15	2630	8	17600	3	268	35	1795	12
13-week toxicity study in dogs (males and females pooled) (4.2.3.2.9, PH-37477)								
1.25	696	2	5820	1	71	9	594	4
2.5	1490	4	10600	2	152	20	1081	7
5	**3070**	**9**	**21800**	**3**	**313**	**41**	**2224**	**15**
39-week toxicity study in dogs (males and females pooled) (4.2.3.2.10, R-9363)								
0.5	327	1	2380	0.4	33	4	243	2
1.5	934	3	7200	1	95	13	734	5
5	**1490**	**4**	**12000**	**2**	**152**	**20**	**1224**	**8**
Estimated human exposure[a]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

Bolded values represent the NOAEL in each study.
MoE = Margin of Exposure
[a] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)
f_u dog = 10.2%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

4 週間投与試験の 7.5mg/kg/日以上で全身状態に影響する直腸脱を含む消化管に対する顕著な作用（病理組織学的には直腸周辺の炎症に関連）が認められた。そのため、長期の試験では 5mg/kg/日を高用量として選択した。長期試験で比較的低い用量を投与したにもかかわらず、曝露量は 4 週間試験と同程度であったが、消化管への影響に関するベルイシグアトの忍容性は良好であった。この理由は明らかでないが、2 つのイヌ系統（4 週間試験では Hsd Rcc: DoBE、13 及び 39 週間試験では Marshall Beagle）間の TK の違い（t_{max} の差）及び消化管運動障害に対する感受性の差や消化管局所濃度の差が影響した可能性が考えられる。

作用機序に関連した細胞内 cGMP の増加及び平滑筋の弛緩による消化管に対するベルイシグアトの作用の更なる徴候として、イヌの反復投与毒性試験では、流涎の増加及び嘔吐が認められた。しかし、イヌは他の動物種よりも特に嘔吐しやすいことが知られている。更に、他の sGC 刺激薬に関して、イヌはヒトよりも薬物関連の嘔吐に対する感受性が高いという経験が得られている。したがって、イヌで認められた嘔吐は、ベルイシグアト投与患者に対するリスクにはならないと考えられる。更に、患者を対象とした臨床試験では、嘔吐の発現率がプラセボ群とベルイシグアト群で同程度であった（2.7.4）。

平滑筋弛緩のその他の影響として、4 週間投与試験では 2.5mg/kg 以上、13 週間投与試験では 5mg/kg で血管拡張、血圧低下及び全身血管抵抗低下が認められた（2.6.6.3.3.2 及び 2.6.6.3.3.3）。また、同じ用量でイヌに反射性頻脈が認められた。これらの用量でのイヌの心筋における心筋動脈肥大や心筋線維化などの形態学的変化は、変性や壊死を伴わず、血管拡張による二次的なものと考えられ、他の血管拡張薬においても同様の報告がある[2, 3, 34, 35, 36]。

ラットと同様、イヌにおいても、組織学的検査でベルイシグアトの全身血管抵抗低下／降圧作用に起因する RAAS の代償性活性化の影響が副腎（副腎の球状帯の幅増大）及び腎臓（器官重量増加を伴う傍糸球体装置の肥大）に認められた。

イヌの 4 週間試験において、高用量群の雌の腎臓に認められた好塩基性尿細管のわずかな増加は、同程度の曝露量での長期投与後には認められなかったことから、臨床的に重要でないと考えられる。この所見は、直接的な腎毒性ではなく、血行動態及び腎灌流の著しい障害に伴う全身状態の重度の変化によるものと考えられる。

マウス及びラットと同様、イヌにおいてもオフターゲットの毒性はみられなかった。毒性プロファイルの特徴として、最長 39 週間の反復投与で薬理作用に続発する変化が認められた。また、いずれの種においても、反復投与後に雄又は雌に特異的な毒性は認められなかった。

ベルイシグアトのがん原性は、マウスでは混餌、ラットでは強制経口による 2 年間投与で評価した。両動物種の高用量の選択は、FDA との協議を行い、合意している。生存性及び腫瘍発生頻度の統計処理は、現行の FDA ドラフトガイダンス[5]に従った。

マウスのがん原性試験（2.6.6.5.1）では、目標用量 0、5、15、50 及び 150mg/kg/日（雄）又は 0、6、20、60 及び 250mg/kg/日（雌）で混餌投与した。ベルイシグアトの総 AUC は、ベルイシグアトを 10mg/日の用量でヒトに投与したときの曝露量よりも、総 AUC で最大 41 倍（雄）及び 78 倍（雌）高かった。非結合型 AUC の曝露量は最大 149 倍（雄）～286 倍（雌）高かった（表 2.6.6.9- 5）。

表 2.6.6.9- 5 マウスがん原性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Daily dose [mg/kg/day]	Systemic exposure							
	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
Carcinogenicity study in mice (4.2.3.4.1.1, R-13312)								
5 (M)	672	2	10800	2	54	7	863	6
15 (M)	1560	4	31400	5	125	16	2509	17
50 (M)	7130	20	117000	18	570	75	9348	64
150 (M)	**14100**	**40**	**271000**	**41**	**1127**	**148**	**21653**	**149**
6 (F)	962	3	17600	3	77	10	1406	10
20 (F)	3320	9	59700	9	265	35	4770	33
60 (F)	9170	26	180000	27	733	96	14382	99
250 (F)	**27500**	**79**	**522000**	**78**	**2197**	**289**	**41708**	**286**
Estimated human exposure[a]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

Bolded values represent the highest dose with no vericiguat-related neoplastic finding.
MoE = Margin of Exposure
[a] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)
f_u rat = 4.55%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

マウス 2 年間がん原性試験では、混餌投与されたベルイシグアトの忍容性は良好で、生存性に影響はなかった。MRHD でのヒト曝露量と比較して、雄及び雌マウスの曝露量が、総 AUC ではそれぞれ最大 41 及び 78 倍、非結合型 AUC ではそれぞれ最大 149 及び 286 倍になるまで投与しても、発がん作用はみられなかった。

ベルイシグアトによる生存性への影響はなかったが、対照群の雌の死亡率が上昇したため、93～94 週で雌のすべての群を早期に剖検した。そのため、ベルイシグアト投与群の雌では肝臓、卵巣及び涙腺での加齢に関連した一般的な非腫瘍性所見の発生率が高かったが、これはベルイシグアトの直接的な影響ではなく、ベルイシグアト投与群で高週齢の動物の割合が多くなったことに起因したものと考えられる。

薬理作用に関連する平滑筋の弛緩に伴って、血管拡張に続発した摂水量の増加がみられ、腸内フローラのわずかな乱れと軽度な炎症を誘発する消化管運動障害に続発した腸間膜リンパ節における形質細胞の発生頻度の軽微な増加が認められた。いずれも適応性の変化であり、有害ではないと考えられた。更に、極めて高い用量（MRHD の曝露量と比較して、総 AUC は 41～78 倍、非結合型 AUC では 149～286 倍）を投与すると、筋上皮細胞の弛緩に続発すると考えられる薬理作用に基づく変化として、乳腺拡張、胆石の発生頻度又は程度の軽度な増加、胆嚢のヒアリン沈着、並びにハーダー腺における分泌上皮の変性又は炎症がみられた。筋上皮細胞は、平滑筋細胞と構造的に類似しており、外分泌腺の収縮に関与することが知られている [11)]。更に、マウス及びラットの他の反復投与毒性試験でみられるように、肝臓での酵素誘導に起因したと考えられる肝細胞肥大及び肝臓重量増加が認められた。

ラットのがん原性試験（2.6.6.5.2）では、0、2、6 及び 20mg/kg/日の用量でベルイシグアトを強制経口投与し、これは 10mg/日のベルイシグアトをヒトに投与したときの曝露量と比べて、総 AUC は最大 20 倍、非結合型 AUC は最大 41 倍高かった（表 2.6.6.9- 6）。

表 2.6.6.9- 6 ラットがん原性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Systemic exposure								
Daily dose [mg/kg/day]	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
Carcinogenicity study in rats (males and females pooled) (4.2.3.4.1.2, R-13305)								
2	1240	4	13500	2	56	7	614	4
6	**3380**	**10**	**38600**	**6**	**154**	**20**	**1756**	**12**
20	10600	30	131000	20	482	63	5961	41
Estimated human exposure[a]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

Bolded value represents the highest dose with no vericiguat-related neoplastic finding.
MoE = Margin of Exposure
[a] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)
f_u rat = 4.55%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

死亡率と死因に、ベルイシグアト投与の影響はみられなかった。その他のラットの反復投与毒性試験及びマウスがん原性試験と同様に、ベルイシグアトの血管拡張作用に続発する非有害性の摂水量の増加が、6mg/kg/日以上の群の雌雄で認められ、20mg/kg/日群の雄の尿量増加に関連していた。更に、平滑筋の弛緩により、消化管に軽度の所見（盲腸の膨満及び拡張）が認められた。

投薬に起因した腫瘍性病変の統計学的に有意な増加は、雌雄ともに認められなかった。

良性の褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫の統計学的に有意ではない増加が 20mg/kg/日群の雄でみられ、副腎における限局性の髄質過形成（両性）及び限局性のライディッヒ細胞過形成発生頻度の増加が認められた。更に、20mg/kg/日群の雄でラット 26 週間投与毒性試験と同様の副腎髄質の変化もみられた。これらの変化は、エピネフリン及びノルエピネフリン貯蔵細胞の異なった分布と、それによるクロム親和性細胞の活性化を示唆している。20mg/kg/日での曝露は、MRHD でのヒト曝露量より総 AUC は 20 倍、非結合型 AUC は 41 倍高かった。被験物質投与に関連する腫瘍または過形成がみられなかった中用量 6mg/kg/日での曝露量は、MRHD でのヒト曝露量に対して総 AUC は 6 倍、非結合型 AUC は 12 倍高かった。

良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫、並びに関連する過形成は、2 年間にわたる血圧の顕著な低下による RAAS 及びアドレナリン作動系の代償性及び反復性の活性化に続発したものと考えられた。

低血圧は、RAAS の代償性の活性化につながるだけではなく、アンジオテンシンⅡを介したクロム親和性細胞の刺激により副腎髄質のカテコールアミン分泌（主にエピネフリン）を増加させることが、古くから知られている[37, 38, 39, 40, 41, 42]。副腎髄質で長期にわたって繰り返される神経及びホルモン刺激は、副腎髄質過形成及び良性褐色細胞腫形成を誘発する。同様に、カテコールアミンを介して黄体形成ホルモン（LH）の増加が誘発されうることが知られている[43, 44]。ラットのライディッヒ細胞過形成及び腫瘍形成の機序はよく知られており[45]、カテコールアミン（例えば、副腎由来カテコールアミン）がライディッヒ細胞からのテストステロンの合成と放出を刺激する役割を示すことが知られている[46]。したがって、副腎髄質からのカテコールアミンの放出及び下垂体からの LH の分泌は、ライディッヒ細胞の過形成及び腫瘍形成を引き起こし、ライディッヒ細胞の増殖を直接的／間接的に刺激すると考えられる。

複数の血管拡張薬や降圧薬を含む多くの医薬品や化学物質（レセルピン、チモロール、ミノキシジル、ヒドララジンなど）は、ラットで褐色細胞腫及び／又はライディッヒ細胞腫瘍の発生率を増加させることが示されている[45, 47, 48, 49, 50, 51]。

ベルイシグアトによる顕著な拍動性血圧低下に続発する RAAS 及びアドレナリン作動系の活性化及び反復刺激という仮説は、薬力学データによって更に支持されている。ベルイシグアトの 1 又は 3mg/kg の単回経口投与は、正常血圧ラットで血圧を約 15%低下させた（2.6.2.2.2.2）。自然発症高血圧ラットでは、1 又は 3mg/kg の単回経口投与後、最大で約 20-30%の血圧低下を示し、1 日後までにベースライン又はその付近まで回復した（2.6.2.2.2.3）。3 及び 10mg/kg/日を 12 日間毎日経口投与しても、血圧プロファイルに急速な耐性は生じなかった（2.6.2.2.2.4）。ラットとは対照的に、薬物投与後の患者では、プラセボを投与した患者と比較して、血圧に関連して臨床的に意味のある変化はなかった（2.7.4.4.1）。更に、クロム親和性細胞の活性化を示す病理組織学的な副腎髄質の変化は、ベルイシグアトのラット 26 週間反復投与毒性試験及び 2 年間がん原性試験でみられたが、より短期間の投与では認められておらず、26 週間以上の長期投与によりクロム親和性細胞の活性化が進行したことを示唆している。

褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腫瘍は、加齢雄ラットではよくみられるが、ヒトでの自然発生は極めてまれである。ラットはこれらの腫瘍発生に対する感受性が高いことが知られており、ラットでこれらの腫瘍を誘発する薬剤がヒトで同様の腫瘍を誘発するという報告はない[45, 52]。褐色細胞腫については、副腎髄質の長期的な神経刺激及びホルモン刺激を含む多くの非遺伝毒性メカニズムが報告されており、ラットでは長期的に髄質過形成及び良性褐色細胞腫を誘発するが、ヒトとの関連性は実証されていない[52]。ライディッヒ細胞腫瘍については、ラットとヒトで大きな違いがあり、ラットではライディッヒ細胞過形成及び腫瘍形成誘発に対する感受性が高いことが知られている[45]。

ラット及びマウスのがん原性試験のデータから、臨床用量でのヒトに対する発がんリスクはないと結論された。統計学的に有意でない雄ラットの良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫増加はヒトへの外挿性が低く、臨床曝露量に比してかなり高い曝露量で増加傾向を示した 2 種類の腫瘍は、ラットでの発生感受性が高く、その発生機序は他の降圧薬と共通していると考えられる。

ベルイシグアトの生殖発生毒性に関しては、ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験（2.6.6.6.1.1）、ラット胚・胎児発生毒性試験（2.6.6.6.2.1）、ウサギ胚・胎児発生毒性試験（2.6.6.6.2.2）、並びにラットの出生前及び出生後の発生に関する試験（2.6.6.6.3.2）で詳細に評価した。胚・胎児発生毒性試験におけるベルイシグアトの曝露量を表 2.6.6.9- 7 に要約する。受胎能及び初期発生に関する試験の曝露量は、ラットの 4 週間反復投与試験（2.6.6.3.2.2）で同程度の用量を使用したことから（受胎能試験：5、15 及び 50mg/kg、4 週間試験：15、30 及び 60mg/kg）、この 4 週間反復投与試験に基づいて推定できる（表 2.6.6.9- 2）。胚・胎児発生毒性試験では、総 AUC は MRHD でのヒト曝露量よりも最大 16 倍（ウサギ）、36 倍（ラット）、非結合型 AUC は最大 27 倍（ウサギ）、75 倍（ラット）高かった。

表 2.6.6.9- 7 ラット及びウサギ胚・胎児発生毒性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Systemic exposure								
Daily dose [mg/kg/day]	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
Developmental toxicity study in rats (4.2.3.5.2.1, PH-38325)								
5[a]	2700	8	28600	4	123	16	1301	9
15	5490	16	67100	10	250	33	3053	21
50[b]	17700	51	240000	36	805	106	10920	75
Developmental toxicity study in rabbits (4.2.3.5.2.2, PH-38326)								
0.75[c]	509	1	5590	1	19	3	206	1
2.5	2180	6	24900	4	80	11	919	6
7.5	7590	22	105000	16	280	37	3875	27
Estimated human exposure[d]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

MoE = Margin of Exposure

[a] NOAEL for maternal toxicity

[b] NOAEL for developmental toxicity

[c] NOAEL for maternal and developmental toxicity

[d] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)

f_u rat = 4.55%, f_u rabbit = 3.69%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

ラット受胎能及び初期胚発生に関する試験（2.6.6.6.1.1）では、0、5、15 及び 50mg/kg/日の用量を投与した。雌雄受胎能又は胚発生に対するベルイシグアトの影響は、最高用量まで認められず、この用量の総 AUC の曝露比（対 MRHD でのヒト曝露量）は約 32 倍、非結合型 AUC の曝露比は約 66 倍であった。

ラット胚・胎児発生毒性試験（2.6.6.6.2.1）では、0、5、15 及び 50mg/kg/日の用量を投与した。15mg/kg/日以上で母体毒性が認められたが、これはベルイシグアトの血行動態及び消化管への作用による二次的な影響と考えられる。母体毒性用量である 50mg/kg/日まで胚・胎児発生に対する意義のある影響は認められず、この用量の総 AUC の曝露比（対 MRHD でのヒト曝露量）は 36 倍、非結合型 AUC の曝露比は 75 倍であった。

ウサギ胚・胎児発生毒性試験（2.6.6.6.2.2）では、0、0.75、2.5 及び 7.5mg/kg/日の用量を投与した 2.5mg/kg/日以上の用量において、重篤な母体毒性による妊娠後期の流産の増加とこれに続発する妊娠率の低下及び着床後死亡の増加が認められた。影響がみられた雌では、流産前に体重減少及び顕著な摂餌低下又は無摂餌状態が認められた。妊娠を継続したウサギでは、着床後死亡への影響はなく、被験物質投与に関連した奇形も認められなかった。したがって、ウサギ胎児の発生に対する影響は、母体毒性が明らかな用量でのみ認められ、強力な血行動態作用及び妊娠中の血行動態作用に対するこの動物種の感受性に関連したものと考えられる。ウサギにおけるベルイシグアトの直接的な血圧データは得られていないが、ウサギの血管における血行動態への影響が *in vitro* で示されている（2.6.2.2.1.5 及び 2.6.2.2.1.8）。更に、ラット及びイヌの効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験のデータから、ウサギの発生毒性試験で投与した用量で明確な血行動態作用が生じると考えられる。特に、麻酔ラットへの 1mg/kg のベルイシグアトの経口投与では血圧が 33mmHg 低下し、覚醒ラット又はイヌへの 1 又は 0.6mg/kg のベルイシグアトの投与では血圧がそれぞれ 15%又は 11%低下した（2.6.2.2.2.2 及び 2.6.2.4.2.3）。

ラット出生前及び出生後の発生に関する試験（2.6.6.6.3.2）では、検討した全用量で、血行動態及び消化管に対するベルイシグアトの薬理作用に関連すると考えられる体重及び摂餌量に対する影響が認められた。高用量である 30mg/kg/日を投与すると、強力な血行動態作用により、

死産の増加、胎児死亡の増加並びに全児死亡が認められ、出生児の生存率が低下した。ベルイシグアトの血行動態作用による影響はその後も認められ、体重増加抑制に起因した発達指標発現の遅延及び性成熟の遅延がみられた。体重増加抑制は、15mg/kg/日を母動物に投与した出生児にもみられ、発達指標発現のわずかな遅延、性成熟時の体重の低下を伴う雌の性成熟の遅延がみられた。7.5mg/kg/日では、出生児に対する非有害性の軽微な影響しかみられなかった。母動物及び出生児に受胎能又は剖検所見に対する影響は認められなかった。

以上より、受胎能及び初期胚発生に対する直接的なベルイシグアトの影響は最高用量まで認められず、催奇形性もみられなかった。母体忍容性、母体毒性に起因する胎児毒性、出生前の発生及び出生後初期の発生に関しては、ベルイシグアトの薬理作用の影響がみられた。

幼若ラット反復投与毒性試験（2.6.6.6.4.1 及び 2.6.6.6.4.2）では、成熟ラットの反復投与試験と比べて新たな標的臓器は認められず、毒性プロファイルは作用機序に関連する平滑筋弛緩による消化管への影響を主な特徴としていた。13 週間コホートの 10mg/kg/日群（主試験群及び休薬群）において投与開始後 2 週間以内に、主に投与過誤に関連すると考えられる死亡例が認められた（投与過誤の所見又は投与過誤に関連する一般状態変化がみられた）。本試験の 4 週間コホート及び幼若動物の 4 週間投与用量設定試験において、同等の曝露に達する 10 mg/kg/日の反復投与で投与過誤による死亡が生じていないことから、投与開始後 2 週間以内に認められた死亡は、投与過誤による孤立した再現性のない事象と考えられた。

In vitro のサルモネラ菌／ミクロソーム試験（Ames 試験）（2.6.6.4.1.1）及びマウスリンフォーマ TK 試験（2.6.6.4.1.2）において、ベルイシグアトの点突然変異又は染色体異常誘発能を検討した。*in vivo* の遺伝毒性試験としては、マウス小核試験（2.6.6.4.2.1）とラット小核試験〔26 週間反復投与毒性試験（2.6.6.3.2.4）に含めた〕を実施した。動物の一般状態及び TK 結果（26 週反復投与毒性試験）から、十分な曝露が示された。ベルイシグアトを用いたすべての試験で結果は陰性であった。したがって、ベルイシグアトに遺伝毒性はないと考えられる。

ベルイシグアトは波長範囲 290～700nm で軽微な光吸収を示すため、ICH S10 に従って *in vitro* 3T3 NRU 光毒性試験を実施した（2.6.6.8.7）。PIF は 1 であったことから、ベルイシグアトに光毒性はないと考えられる。

ベルイシグアトはメラニン含有組織と結合するため（2.6.4.4.1.2）、有色雄 Long Evans ラットを用いて、神経メラニンを含む神経組織中のベルイシグアトの蓄積が安全性上の懸念となるかどうかを評価するための反復投与毒性試験を実施した（2.6.6.8.3.1 及び 2.6.6.8.3.2）。有色 Long Evans ラットにおけるベルイシグアトの毒性プロファイル及び TK プロファイルは、アルビノ Wistar ラットと同様であった。有色 LE ラット 13 週間反復投与試験で認められた投薬に関連する影響は、摂水量の用量に依存した増加のみで、アルビノ Wistar ラットを用いた他の反復投与毒性試験でも認められており、被験物質投与に関連した血管拡張作用による二次的な変化と考えられる。脳（黒質を含む 7 レベル）、有色血管条を含む内耳及び色素上皮を含む網膜の病理組織学的検査では、投薬に関連する所見は認められなかった。以上より、ベルイシグアトの有色 LE ラット 13 週間反復投与では検討した最高用量まで、神経メラニンを含む神経組織に影響を及ぼさず、30mg/kg/日のベルイシグアトの曝露量は MRHD でのヒト曝露量に対して総 AUC で約 20 倍、非結合型 AUC で約 40 倍であった（表 2.6.6.9- 8）。

表 2.6.6.9- 8 有色ラットの毒性試験における定常状態の曝露量とヒト臨床用量における定常状態の曝露量の比較

Systemic exposure								
Daily dose [mg/kg/day]	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
2-week pilot toxicity study in male Long-Evans rats (4.2.3.7.3.1, PH-38568)								
10	4180	12	46500	7	190	25	2116	15
30	**12900**	**37**	**146000**	**22**	**587**	**77**	**6643**	**46**
13-week toxicity study in male Long-Evans rats (4.2.3.7.3.2, PH-38403)								
10	3650	10	43500	7	166	22	1979	14
30	**11600**	**33**	**124000**	**19**	**528**	**69**	**5642**	**39**
Estimated human exposure[a]								
10 mg	350		6680		7.6		145.6	

Bolded values represent the NOAEL in each study.
MoE = Margin of Exposure
[a] Based on popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)
f_u rat = 4.55%, f_u human = 2.18% (2.6.4.4.3)

ICH Q3A（R2）ガイドラインにおける構造決定が必要な閾値を上回る不純物はなかった（2.3.S.4.1 及び 2.3.P.5.1）。

ベルイシグアトの N-グルクロン酸抱合体である M-1 がヒト血漿中の主要代謝物である。これはマウス、ラット及びイヌ血漿中においても検出されているが、これらの動物種では微量代謝物である（2.6.4.5.1）。M-1 は 10µM まで sGC に対する薬理活性はなく、オフターゲット作用も認められていない（2.6.2.2.1.3 及び 2.6.2.3.1）。N-グルクロン酸抱合体は一般的に不活性で、安全性上の問題はないことが広く知られている[53)]。そのため、FDA ガイダンス（Safety Testing of Drug Metabolites）[14)] では、第Ⅱ相の抱合反応により、一般的に化合物はより水に溶けやすく薬理学的に不活性となるため、更に評価する必要はないとされている。また、ICH M3（R2）及び ICH M3 Q&A（R2）では、N-グルクロン酸抱合体を含むほとんどのグルクロン酸抱合体には毒性学的懸念がないとされている。アシルグルクロン酸抱合体などの化学的転位を受ける抱合体には懸念があるとされているが、*in vitro* 及び *in vivo* における検討では、M-1 が化学的転位を受けることはなかったため、M-1 を毒性試験で検討する必要はないと判断した。

なお、マウス及びラットのがん原性試験において、M-1 の TK を評価した。マウスでは、高用量（雄で 150mg/kg/日、雌で 250mg/kg/日）における M-1 の非結合型 C_{max} 及び AUC は、MRHD での推定ヒト曝露量の 3～7 倍及び 2～6 倍であった（表 2.6.6.9- 9）。ラットでは、最高用量（20mg/kg/日）における M-1 の非結合型 C_{max} 及び AUC は、ヒト MRHD の 1 及び 0.43 倍であった（表 2.6.6.9- 9）。したがって、マウス及びラットの反復投与毒性試験、並びにラットの生殖発生毒性試験では、がん原性試験と同等以上の用量（マウスは同程度の用量、ラットはより高い用量）が用いられたことから、ヒトの M-1 曝露量は、これらの試験においても担保されていたと考えられる。これらの試験で認められた所見は、主にベルイシグアトの過度の薬理作用に起因する影響であった。以上より、MRHD においてヒトが M-1 に曝露されることによる安全性上の懸念はないと考えられる。

表 2.6.6.9- 9 マウス及びラットがん原性試験における M-1 の定常状態の曝露量とヒト臨床用量における M-1 の定常状態の曝露量の比較

Daily dose [mg/kg/day]	Systemic exposure							
	Total exposure				Unbound exposure			
	C_{max}		$AUC_{(0-24)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24)u}$	
	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
Carcinogenicity study in mice (4.2.3.4.1.1, R-13312)								
5 (M)	20	0	317	0	3	0.1	48	0.1
15 (M)	54	0	889	0	8	0.3	135	0.2
50 (M)	162	0.1	2670	0.1	25	1	406	1
150 (M)	**468**	**0.3**	**8020**	**0.2**	**71**	**3**	**1219**	**2**
6 (F)	48	0	546	0	7	0.3	83	0.1
20 (F)	158	0.1	2170	0.1	24	1	330	1
60 (F)	297	0.2	5590	0.1	45	2	850	1
250 (F)	**1170**	**1**	**22700**	**1**	**178**	**7**	**3450**	**6**
Carcinogenicity study in rats (males and females pooled) (4.2.3.4.1.2, R-13305)								
2	80	0	389[a]	0	3	0.1	12	0
6	**203**	**0.1**	**2230**	**0.1**	**6**	**0.2**	**70**	**0.1**
20	693	0.43	8600	0.2	22	1	269	0.43
Estimated human exposure[b]								
10 mg	1610		38000		26.2		619.4	

Bolded values represent the highest dose with no vericiguat-related neoplastic finding in each study
MoE = Margin of Exposure
[a] $AUC_{(0-7)}$ instead of $_{(0-24)}$
[b] Based on M&S report 20871 (2.7.2.3.1.3.1)
f_u mice = 15.2%, f_u rat = 3.13%, f_u human = 1.63% (2.6.4.4.3)

以上より、ベルイシグアトの毒性プロファイルは、過度の薬理作用に起因する影響を特徴としていた。ベルイシグアトの薬理作用から予想されるように、評価したすべての非臨床動物種において、作用機序に関連した細胞内 cGMP の増加に起因する変化が認められ、心血管系、消化管系及び骨（成長期のラット）が最も高い感受性を示した。

マウス、ラット及びイヌでは、ベルイシグアトの平滑筋弛緩作用に起因する血行動態作用及び消化管への影響が認められた。

平滑筋弛緩作用により、血管拡張、血圧低下及び全身血管抵抗低下及び反射性頻脈（イヌ）が認められた。血行動態作用に起因する心臓及び血管系の形態学的影響がラットで認められたが、イヌの方が顕著であった。これらの変化は他の血管拡張薬でよく知られており、ヒトでは発現しないと考えられ、ベルイシグアト固有の変化ではないと考えられる。ラット及びイヌの副腎の組織学的検査において、RAAS 系及び／又はアドレナリン作動系の代償性活性化の影響が認められた。

ベルイシグアトによって誘導される他の影響は、消化管における cGMP を介した平滑筋弛緩とそれに続く消化管の緊張及び運動の低下に関連したものであった。

更に、成長期のラットでは、作用機序に関連した細胞内 cGMP の増加により、骨の恒常性及び形態への影響が認められた。これらの所見は、完全に成長した成体ラットやイヌでは認められなかったことから、これらの変化は成人患者集団において重要でないと考えられる。

生殖毒性に関しては、雌雄受胎能への影響はなく、催奇形性も認められなかった。強力な血行動態作用を示す用量では、母体毒性に起因する胎児毒性が認められた。

ベルイシグアトに遺伝毒性や光毒性はないと考えられる。

ベルイシグアトはマウスで発がん性を示さなかった。ラットでは、統計学的に有意差がない雄の良性褐色細胞腫及びライディッヒ細胞腺腫が増加したが、2 年間にわたる連日の顕著な血圧低下、並びに RAAS 及びアドレナリン作動系の代償性活性化に続発して生じたものと考えられた。これらの増加は、臨床用量におけるヒトのリスクを示すものではなく、これらの腫瘍発生に対するラットの感受性と、臨床用量に比してかなり高い用量で認められ、他の降圧薬にもみられる薬理作用に起因するものと考えられる。

非臨床毒性プロファイルから、ベルイシグアトは、慢性心不全患者に対して安全に使用できると考えられる。

2.6.6.10　図表

図表は適切に記載した。

引用文献一覧

1) Fekete A et al., Am J Physiol Renal Physiol 2011:300:F113-118 (4.3.17)

2) Dogterom P et al., Crit Rev Toxicol 1992:22:203-241 (4.3.11)

3) Greaves P et al., Exp Toxicol Pathology 1998:50:283-93 (4.3.22)

4) Resnick N et al., Prog Biophys Mol Biol 2003:81:177-99 (4.3.44)

5) FDA, Guidance for Industry, Statistical aspects of the design, analysis, and interpretation of chronic rodent carcinogenicity studies of pharmaceuticals Draft 2001 (4.3.14)

6) Peto R et al., IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum Suppl 1980:S2:311-426 (4.3.40)

7) Lin KK et al., J Biopharm Stat 1998:8:1-15 (4.3.31)

8) Haseman JK, Fundam Appl Toxicol 1983:3:334-9 (4.3.24)

9) Armitage P, Biometrics 1955:11:375-86 (4.3.5)

10) Thakur AK et al., Comput Programs in Biomed 1985:19:229-233 (4.3.48)

11) Lee CS, Histology for Pathologists 3rd Edition, Lippincott Williams & Wilkins 2007:454-455 (4.3.36)

12) Payne AP, J Anat 1994:185:1-49 (4.3.38)

13) Charles River Laboratories, Reproductive Toxicology Historical Control Data in Rabbits 2018 <https://www.criver.com/sites/default/files/noindex/historical-control-data/hcd-pa-rabbits.pdf> (Accessed 2020 Mar 30) (4.3.58)

14) FDA, Guidance for Industry, Safety Testing of Drug Metabolites Draft 2016 (4.3.56)

15) Evered MD et al., Am J Physiol 1988:254:R69-74 (4.3.12)

16) Thunhorst RL et al., Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001:281:R1726-1733 (4.3.49)

17) FDA, Pharmacology Review, NDA No. 21-400 (4.3.15)

18) Gopinath C et al., Atlas of Toxicological Pathology, Humana Press 2014:1-18 (4.3.21)

19) Bradley A et al., Boorman's Pathology of the Rat 2nd ed, Academic Press 2017:616 (4.3.6)

20) Zhang J et al., Toxicol Pathol 2008:36:827-839 (4.3.54)

21) Expert Working Group on Drug-Induced Vascular Injury, Toxicol Appl Pharmacol 2005:203:62-87 (4.3.13)

22) Rangaswami H et al., J Biol Chem 2009:284:14796-14808 (4.3.43)

23) Rangaswami H et al., Sci Signal 2010:3:ra91:1-11 (4.3.42)

24) Rangaswami H et al., J Biol Chem 2012:287:21509-21519 (4.3.41)

25) Wimalawansa SJ, Ann NY Acad Sci 2010:1192:391-403 (4.3.53)

26) Marathe N et al., J Biol Chem 2012:287:978-988 (4.3.33)

27) Joshua J et al., Endocrinology 2014:155:4720-4730 (4.3.29)

28) Jamal SA et al., J Bone Miner Res 2004:19:1512-1517 (4.3.27)

29) Jamal SA et al., Osteoporos Int 2013:24:763-770 (4.3.28)

30) Homer BL et al., Toxicol Pathol 2015:43:411-423 (4.3.25)

31) Iwaniec UT et al., Osteoporosis Fourth Edition, Academic Press 2013:939-961 (4.3.26)

32) John Hopkins University <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/rat.html> (Accessed 2020 Feb 26) (4.3.57)

33) Rose C et al., Crit Rev Environ Sci Technol 2015:45:1827–1879 (4.3.46)

34) Clemo FAS et al., Toxcol Pathol 2003:31(Suppl):25-31 (4.3.8)

35) Jones HB et al., Toxicol Pathol 2003:31:263-272 (4.3.30)

36) Detweiler DK, Toxicol Pathol 1989:17:94-108 (4.3.10)

37) Feldberg W et al., J Physiol 1964:171:98-108 (4.3.18)

38) Peach MJ et al., Angiotensin, Springer-Verlag Berlin, 1974:400-407 (4.3.39)

39) MacLean MR et al., J Physiol 1986:373:343-352 (4.3.32)

40) Marley PD et al., Neuroscience 1989:28:777-787 (4.3.34)

41) Giacchetti G et al., Clin Exp Pharmacol Physiol 1996:S3:S119-S124 (4.3.20)

42) Vollmer RR et al., Clin Exp Hypertens 2000:22:705-15 (4.3.52)

43) Rohde W et al., Exp Clin Endocrinol 1983:82:268-274 (4.3.45)

44) Barraclough CA et al., Endocr Rev 1982:3:91-119 (4.3.63)

45) Cook JC et al., Crit Rev Toxicol 1999:29:169-261 (4.3.9)

46) Mayerhofer A, The Leydig cell in health and disease, Humana Press Inc 2007:291–304 (4.3.35)

47) Tischler AS et al., Lab Invest 1988:58:733-735 (4.3.50)

48) National Institutes of Health, Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 1982:193:1-123 (4.3.37)

49) Brambilla G et al., Mutat Res 2012:750:1-51 (4.3.7)

50) van der Laan JW et al., Front Med 2016:3:1-24 (4.3.51)

51) FDA, Pharmacology Review, NDA No. 21-812 (4.3.16)

52) Greim H et al., Crit Rev Toxicol 2009:39:695-718 (4.3.23)

53) Smith DA et al., Drug Metab Dispos 2018:46:908–912 (4.3.47)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Test Article: Vericiguat

Type of Study/Duration	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number/ Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity						
2 weeks	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)BR	Oral, diet	0, 100, 300, 1000 ppm [corresponding to 0, 17, 53, 166 (males); 0, 28, 79, 257 (females)]	No	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38271/ 4.2.3.2.1
13 weeks	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)BR	Oral, diet	0, 5, 15, 50	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38233/ 4.2.3.2.2
2 weeks	Rat/Wistar (Hsd Cpb:WU)	Oral, gavage	0, 10, 30, 100 for 14 days or 0, 100 for 3 days	No	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-40501/ 4.2.3.2.3
4 weeks + recovery	Rat/Wistar (Hsd Cpb:WU)	Oral, gavage	0, 15, 30, 60 [b]	Yes [c]	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-36714/ 4.2.3.2.4
13 weeks	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0, 3, 10, 30	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-37470/ 4.2.3.2.5
26 weeks	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0, 3, 10, 30	Yes [d]	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-37899/ 4.2.3.2.6
2 weeks	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 1, 3, 10	No	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-40741/ 4.2.3.2.7
4 weeks	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 2.5, 7.5, 25/15 [e]	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-36756/ 4.2.3.2.8
13 weeks	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 1.25, 2.5, 5	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-37477/ 4.2.3.2.9
39 weeks	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 0.5, 1.5, 5	Yes [f]	[redacted] (England)	R-9363/ 4.2.3.2.10

Test Article: Vericiguat

Type of Study/Duration	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number/ Location in CTD
Genotoxicity (In vitro)						
48 hrs (TA102) or 72 hrs (TA98, TA100, TA1535, TA1537) (+/-S9)	*Salmonella typhimurium* (TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537)	In vitro	100, 250, 500, 1000, 2500*, 5000* µg/plate *precipitation	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	A51658/ 4.2.3.3.1.1
3 hr ± S9 up to 200 µg/mL; 24 hr -S9 up to 100 µg/mL	Mouse lymphoma $TK^{+/-}$ L5178Y cells	In vitro	10, 25, 50, 100*, 200*µg/mL *precipitation	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	A52063/ 4.2.3.3.1.2
Genotoxicity (In vivo)						
Bone marrow sampled after 2 IP doses	Mouse/NMRI	In vivo	0, 31.25, 62.5, 125	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	A51623/ 4.2.3.3.2.1
Day 140 peripheral blood samples (included in 26-week study)	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0, 3, 10, 30	Yes [d]	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-37899/ 4.2.3.2.6
Carcinogenicity						
104 weeks	Mouse/Crl:CD1 (ICR)	Oral, diet	Females: 0, 6, 20, 60, 250 Males: 0, 5, 15, 50, 150	Yes	[redacted] (England)	R-13312/ 4.2.3.4.1.1
104 weeks	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0 (vehicle control), 0 (water control), 2, 6, 20	Yes	[redacted] (England)	R-13305/ 4.2.3.4.1.2
Reproductive and Developmental Toxicity (Fertility and Early Embryonic Development)						
Females: 2 weeks prior to mating, during mating and remating, up to GD 7 Males: 4 weeks prior to mating, during mating and remating, up to the day before necropsy	Rat/ Wistar (Hsd Cpb: WU)	Oral, gavage	0, 5, 15, 50	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-37948/ 4.2.3.5.1.1

Test Article: Vericiguat

Type of Study/Duration	Species and Strain	Method of Administration	Doses (mg/kg)[a]	GLP Compliance	Testing Facility	Report Number/ Location in CTD
Reproductive and Developmental Toxicity (Embryofetal Development)						
GD 6-17	Rat/ Wistar (Hsd Cpb: WU)	Oral, gavage	0, 5, 15, 50	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38325/ 4.2.3.5.2.1
GD 6-20	Rabbit/ Crl:KBL (NZW)BR	Oral, gavage	0, 0.75, 2.5, 7.5	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38326/ 4.2.3.5.2.2
Reproductive and Developmental Toxicity (Pre- and Post-natal Development)						
Once daily from GD 6 to LD 4	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral, gavage	0, 30, 50	No	[redacted] (England)	R-11952/ 4.2.3.5.3.1
Once daily from GD 6 to LD 21	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral, gavage	0, 7.5, 15, 30	Yes	[redacted] (England)	R-12839/ 4.2.3.5.3.2
Reproductive and Developmental Toxicity (Juvenile Animals)						
Once daily for 4 weeks (starting at PND 10)	Rat/ RccHan:Wist	Oral gavage	0, 3, 10, 30	No	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38809/ 4.2.3.5.4.1
Main Groups – 28 to 30 days or 91 to 93 days; Recovery Groups - 29 or 92 days; Duration of Postdose: 4 or 8 weeks (29 to 30 days or 56-57 days)	Rat/ Crl:WI(Han)	Oral, gavage	0, 1, 3, 10	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-39764/ 4.2.3.5.4.2
Mechanistic Studies						
2 Weeks	Rat/Crl:LE	Oral, gavage	0, 10, 30	No	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38568/ 4.2.3.7.3.1
13 Weeks	Rat/RjOrl:LE	Oral, gavage	0, 10, 30	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-38403/ 4.2.3.7.3.2
Phototoxicity	Mouse fibroblasts (3T3 NRU)	In vitro	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 45, 60 µg/mL	Yes	Bayer Pharma AG (Germany)	PH-36774/ 4.2.3.7.7.1

Test Article: Vericiguat

a Unless otherwise specified. For Repeat-Dose Toxicity, the NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level) is underlined.

b NOAEL in the 4-week + 2-week recovery study in rats was <15 mg/kg/day (PH-36714).

c GLP except for 1) investigation of urine samples for further characterization of crystals, and 2) histopathological investigation of cryocuts of right kidney (PH-36714).

d GLP compliant with the exception of the method for determination of CTX (C-terminal telopeptide) and calcitriol which were not validated. The determinations were performed according to manufacture method (PH-37899).

e Dose of 25 mg/kg was reduced to 15 mg/kg on Day 15 (PH-36756).

f GLP with the exception that no on-site quality assurance inspection of the Vitamin D sample receipt or experimental phase was conducted (R-9363).

Bayer Pharma AG = Bayer Health Care, Bayer Pharma AG, 42096 Wuppertal, Germany / 13342 Berlin, Germany

[redacted] England = [redacted], England

GD = Gestation Day or post coitum; IP = Intraperitoneal; LD = Lactation Day; NA = Not applicable; NRU = Neutral Red Uptake

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Adminis-tration	Doses (mg/kg)	GLP Com-pliance	Report Number	Location in CTD
13-Week Toxicity with TK	Mouse/ Crl:CD-1(ICR)BR	Oral, diet	0, 5, 15, 50	Yes	PH-38233	4.2.3.2.2
4-Week Toxicity with TK+ 2-Week Recovery	Rat/Wistar (Hsd Cpb:WU)	Oral, gavage	0, 15, 30, 60	Yes [a]	PH-36714	4.2.3.2.4
13-Week Toxicity with TK	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0, 3, 10, 30	Yes	PH-37470	4.2.3.2.5
26-Week Toxicity with TK	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0, 3, 10, 30	Yes [b]	PH-37899	4.2.3.2.6
4-Week Toxicity with TK	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 2.5, 7.5, 25/15 [c]	Yes	PH-36756	4.2.3.2.8
13-Week Toxicity with TK	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 1.25, 2.5, 5	Yes	PH-37477	4.2.3.2.9
39-Week Toxicity with TK	Dog/Beagle	Oral, gavage	0, 0.5, 1.5, 5	Yes [d]	R-9363	4.2.3.2.10
2 Year Carcinogenicity	Mouse/ Crl:CD1(ICR)	Oral, gavage	Females:0, 6, 20, 60, 250 Males: 0, 5, 15, 50, 150	Yes	R-13312	4.2.3.4.1.1
2 Year Carcinogenicity	Rat/ HsdRCCHan:Wist	Oral, gavage	0, 0, 2, 6, 20	Yes	R-13305	4.2.3.4.1.2
Embryofetal Development with TK	Rat/Wistar (Hsd Cpb: WU)	Oral, gavage	0, 5, 15, 50	Yes	PH-38325	4.2.3.5.2.1

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Adminis-tration	Doses (mg/kg)	GLP Com-pliance	Report Number	Location in CTD
Embryofetal Development with TK	Rabbit/Crl:KBL (NZW)BR)	Oral, gavage	0, 0.75, 2.5, 7.5	Yes	PH-38326	4.2.3.5.2.2
Mechanistic Study with TK	Rat/RjOrl:LE	Oral, gavage	0, 10, 30	Yes	PH-38403	4.2.3.7.3.2

a GLP except for 1) investigation of urine samples for further characterization of crystals, and 2) histopathological investigation of cryocuts of right kidney (PH-36714).
b GLP compliant with the exception of the method for determination of CTX and calcitriol which were not validated. The determinations were performed according to manufacture method (PH-37899).
c Dose of 25 mg/kg was reduced to 15 mg/kg (PH-36756).
d GLP with the exception that no on-site quality assurance inspection of the Vitamin D sample receipt or experimental phase was conducted (R-9363).

Note: This table excludes the 2-week pilot studies in mice, rats and dogs, as well as the pilot and definitive studies in juvenile animals, as they are not pivotal to this submission.

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) are displayed in this table.

			Total Exposure				Unbound Exposure					
			C_{max}		$AUC_{(0-24hr)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24hr),u}$			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Mouse – Oral (Diet)												
5 (Day 76)[a]	mg/kg	M	559	2	10800	2	45	6	863	6	PH-38233	4.2.3.2.2
5 (Day 76)[a]	mg/kg	F	370	1	7340	1	30	4	586	4	PH-38233	4.2.3.2.2
5 (Day 359)	mg/kg	M	672	2	10800	2	54	7	863	6	R-13312	4.2.3.4.1.1
6 (Day 359)	mg/kg	F	962	3	17600	3	77	10	1406	10	R-13312	4.2.3.4.1.1
15 (Day 76) [a]	mg/kg	M	1820	5	36100	5	145	19	2884	20	PH-38233	4.2.3.2.2
15 (Day 76) [a]	mg/kg	F	941	3	19500	3	75	10	1558	11	PH-38233	4.2.3.2.2
15 (Day 359)	mg/kg	M	1560	4	31400	5	125	16	2509	17	R-13312	4.2.3.4.1.1
20 (Day 359)	mg/kg	F	3320	9	59700	9	265	35	4770	33	R-13312	4.2.3.4.1.1
50 (Day 76) [a]	mg/kg	M	6710	19	128000	19	536	71	10227	70	PH-38233	4.2.3.2.2
50 (Day 76) [a]	mg/kg	F	4430	13	89400	13	354	47	7143	49	PH-38233	4.2.3.2.2
50 (Day 359)	mg/kg	M	7130	20	117000	18	570	75	9348	64	R-13312	4.2.3.4.1.1
60 (Day 359)	mg/kg	F	9170	26	180000	27	733	96	14382	99	R-13312	4.2.3.4.1.1
150 (Day 359)	mg/kg	M	14100	40	271000	41	1127	148	21653	149	R-13312	4.2.3.4.1.1
250 (Day 359)	mg/kg	F	27500	79	522000	78	2197	289	41708	286	R-13312	4.2.3.4.1.1

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) are displayed in this table.

			Total Exposure				**Unbound Exposure**					
			C_{max}		**$AUC_{(0\text{-}24hr)}$**		**$C_{max,u}$**		**$AUC_{(0\text{-}24hr),u}$**			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Rat – Oral Gavage												
2 (Day 359)	mg/kg	M+F	1240	4	13500	2	56	7	614	4	R-13305	4.2.3.4.1.2
2 (Day 359)	mg/kg	M	1050	3	11300	2	48	6	514	4	R-13305	4.2.3.4.1.2
2 (Day 359)	mg/kg	F	1460	4	16200	2	66	9	737	5	R-13305	4.2.3.4.1.2
3 (Day 69)	mg/kg	M	1440	4	16200	2	66	9	737	5	PH-37470	4.2.3.2.5
3 (Day 69	mg/kg	F	1930	6	23500	4	88	12	1069	7	PH-37470	4.2.3.2.5
3 (Day 149)	mg/kg	M	1360	4	13800	2	62	8	628	4	PH-37899	4.2.3.2.6
3 (Day 149)	mg/kg	F	1530	4	16800	3	70	9	764	5	PH-37899	4.2.3.2.6
5 (GD 17)	mg/kg	F	2700	8	28600	4	123	16	1301	9	PH-38325	4.2.3.5.2.1
6 (Day 359)	mg/kg	M+F	3380	10	38600	6	154	20	1756	12	R-13305	4.2.3.4.1.2
6 (Day 359)	mg/kg	M	2760	8	30500	5	126	17	1388	10	R-13305	4.2.3.4.1.2
6 (Day 359)	mg/kg	F	4150	12	49000	7	189	25	2230	15	R-13305	4.2.3.4.1.2
10 (Day 69)	mg/kg	M	4310	12	52600	8	196	26	2393	16	PH-37470	4.2.3.2.5
10 (Day 69)	mg/kg	F	5630	16	72900	11	256	34	3317	23	PH-37470	4.2.3.2.5
10 (Day 90)	mg/kg	M	3650	10	43500	7	166	22	1979	14	PH-38403	4.2.3.7.3.2
10 (Day 149)	mg/kg	M	4700	13	45000	7	214	28	2048	14	PH-37899	4.2.3.2.6
10 (Day 149)	mg/kg	F	6000	17	62600	9	273	36	2848	20	PH-37899	4.2.3.2.6

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) are displayed in this table.

			Total Exposure				Unbound Exposure					
			C_{max}		$AUC_{(0-24hr)}$		$C_{max,u}$		$AUC_{(0-24hr),u}$			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Rat – Oral Gavage (continued)												
15 (GD 17)	mg/kg	F	5490	16	67100	10	250	33	3053	21	PH-38325	4.2.3.5.2.1
15 (Day 22)	mg/kg	M	8004	23	74600	11	364	48	3394	23	PH-36714	4.2.3.2.4
15 (Day 22)	mg/kg	F	8982	26	86100	13	409	54	3931	27	PH-36714	4.2.3.2.4
20 (Day 359)	mg/kg	M+F	10600	30	131000	20	482	63	5961	41	R-13305	4.2.3.4.1.2
20 (Day 359)	mg/kg	M	9760	28	117000	18	444	58	5324	37	R-13305	4.2.3.4.1.2
20 (Day 359)	mg/kg	F	12400	35	148000	22	564	74	6734	46	R-13305	4.2.3.4.1.2
30 (Day22)	mg/kg	M	16042	46	152000	23	730	96	6916	48	PH-36714	4.2.3.2.4
30 (Day22)	mg/kg	F	15583	45	158000	24	709	93	7189	49	PH-36714	4.2.3.2.4
30 (Day 69)	mg/kg	M	10900	31	146000	22	496	65	6643	46	PH-37470	4.2.3.2.5
30 (Day 69)	mg/kg	F	14400	41	212000	32	655	86	9646	66	PH-37470	4.2.3.2.5
30 (Day 90)	mg/kg	M	11600	33	124000	19	528	69	5642	39	PH-38403	4.2.3.7.3.2
30 (Day 149)	mg/kg	M	12500	36	150000	22	569	75	6825	47	PH-37899	4.2.3.2.6
30 (Day 149)	mg/kg	F	18400	53	167000	25	837	110	7599	52	PH-37899	4.2.3.2.6
50 (GD 17)	mg/kg	F	17700	51	240000	36	805	106	10920	75	PH-38325	4.2.3.5.2.1
60 (Day 22)	mg/kg	M	23602	67	240000	36	1074	141	10920	75	PH-36714	4.2.3.2.4
60 (Day 22)	mg/kg	F	24258	69	253000	38	1104	145	11512	79	PH-36714	4.2.3.2.4

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) are displayed in this table.

			Total Exposure				Unbound Exposure					
			C_{max}		$AUC_{(0\text{-}24hr)}$		$C_{max,\,u}$		$AUC_{(0\text{-}24hr),\,u}$			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Dog – Oral Gavage												
0.5 (Day 273)	mg/kg	M+F	327	1	2380	0.4	33	4	243	2	R-9363	4.2.3.2.10
1.25 (Day 87)	mg/kg	M+F	696	2	5820	1	71	9	594	4	PH-37477	4.2.3.2.9
1.5 (Day 273)	mg/kg	M+F	934	3	7200	1	95	13	734	5	R-9363	4.2.3.2.10
2.5 (Day 25)	mg/kg	M+F	939	3	6390	1	96	13	652	4	PH-36756	4.2.3.2.8
2.5 (Day 87)	mg/kg	M+F	1490	4	10600	2	152	20	1081	7	PH-37477	4.2.3.2.9
5 (Day 87)	mg/kg	M+F	3070	9	21800	3	313	41	2224	15	PH-37477	4.2.3.2.9
5 (Day 273)	mg/kg	M+F	1490	4	12000	2	152	20	1224	8	R-9363	4.2.3.2.10
7.5 (Day 25)	mg/kg	M+F	2220	6	14100	2	226	30	1438	10	PH-36756	4.2.3.2.8
25/15 (Day 25)	mg/kg	M+F	2630	8	17600	3	268	35	1795	12	PH-36756	4.2.3.2.8

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) are displayed in this table.

			Total Exposure				**Unbound Exposure**					
			C_{max}		**$AUC_{(0\text{-}24hr)}$**		**$C_{max,u}$**		**$AUC_{(0\text{-}24hr),u}$**			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Rabbit – Oral Gavage												
0.75 (GD 20)	mg/kg	F	509	1	5590	1	19	3	206	1	PH-38326	4.2.3.5.2.2
2.5 (GD 20)	mg/kg	F	2180	6	24900	4	80	11	919	6	PH-38326	4.2.3.5.2.2
7.5 (GD 20)	mg/kg	F	7590	22	105000	16	280	37	3875	27	PH-38326	4.2.3.5.2.2

Human Exposure												
10[b]	mg		350		6680		7.6		145.6			

a = Nominal dose (or actual doses of 4.7, 11.0, 50.0 – females; 4.1, 12.3, 48.3 – males for satellite groups) – PH-38233
b = popPK analysis for Phase 2/3 HFrEF patients, study 20964 (2.7.2.3.1.6)

MoE = margins of exposure (when compared to the human plasma levels)
M+F = exposure data of males and females were pooled, since there were no gender-related differences
Fraction unbound: mouse 7.99%, rat 4.55%, rabbit 3.69%, dog 10.2%, man 2.18% (A50454)

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) for the M-1 metabolite of vericiguat are displayed in this table.

			Total Exposure				**Unbound Exposure**					
			C_{max}		**$AUC_{(0-24hr)}$**		**$C_{max,u}$**		**$AUC_{(0-24hr),u}$**			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Mouse – Oral (Diet)												
5 (Day 359)	mg/kg	M	20	0	317	0	3	0.1	48	0.1	R-13312	4.2.3.4.1.1
6 (Day 359)	mg/kg	F	48	0	546	0	7	0.3	83	0.1	R-13312	4.2.3.4.1.1
15 (Day 359)	mg/kg	M	54	0	889	0	8	0.3	135	0.2	R-13312	4.2.3.4.1.1
20 (Day 359)	mg/kg	F	158	0.1	2170	0.1	24	1	330	1	R-13312	4.2.3.4.1.1
50 (Day 359)	mg/kg	M	162	0.1	2670	0.1	25	1	406	1	R-13312	4.2.3.4.1.1
60 (Day 359)	mg/kg	F	297	0.2	5590	0.1	45	2	850	1	R-13312	4.2.3.4.1.1
150 (Day 359)	mg/kg	M	468	0.3	8020	0.2	71	3	1219	2	R-13312	4.2.3.4.1.1
250 (Day 359)	mg/kg	F	1170	1	22700	1	178	7	3450	6	R-13312	4.2.3.4.1.1

Test Article: Vericiguat

Total and unbound exposure (at steady-state) and the respective margins of exposure (MoE) for the M-1 metabolite of vericiguat are displayed in this table.

			Total Exposure				**Unbound Exposure**					
			C_{max}		**$AUC_{(0-24hr)}$**		**$C_{max,u}$**		**$AUC_{(0-24hr),u}$**			
Daily Dose	**Unit**	**Sex**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**µg/L**	**MoE**	**µg· h/L**	**MoE**	**Report No.**	**Location in CTD**
Rat – Oral (Gavage)												
2	mg/kg	M	102	0.1	406 [a]	0	3	0.1	13	0	R-13305	4.2.3.4.1.2
2	mg/kg	F	72	0	384 [a]	0	2	0.1	12	0	R-13305	4.2.3.4.1.2
2	mg/kg	M+F	80	0.1	389 [a]	0	3	0.1	12	0	R-13305	4.2.3.4.1.2
6	mg/kg	M	178	0.1	1770	0	6	0.2	55	0.1	R-13305	4.2.3.4.1.2
6	mg/kg	F	252	0.2	2840	0.1	8	0.3	89	0.2	R-13305	4.2.3.4.1.2
6	mg/kg	M+F	203	0.1	2230	0.1	6	0.2	70	0.1	R-13305	4.2.3.4.1.2
20	mg/kg	M	747	0.5	8320	0.2	23	1	260	0.4	R-13305	4.2.3.4.1.2
20	mg/kg	F	858	1	9120	0.3	27	1	285	0.5	R-13305	4.2.3.4.1.2
20	mg/kg	M+F	693	0.43	8600	0.2	22	1	269	0.43	R-13305	4.2.3.4.1.2

a $AUC_{(0-7)}$ instead of $_{(0-24)}$

f_u mice = 15.2%, f_u rat = 3.13%, f_u human = 1.63%

Estimated Human Exposure [a]												
10	mg		1610		38000		26.2		619.4			

a Based on Modeling & Simulation report 17457

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（バッチ毎）一覧

Test Article: Vericiguat

Proposed Specification Batch No.	Purity (%)	Report No. and Location in CTD	Study Type
BXR4JU6	[redacted]	PH-36714 4.2.3.2.4	Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Wistar Rats with 4-Weeks Daily Administration by Gavage Followed by a 2-Weeks Recovery Period
BXR5B6L	[redacted]	PH-37470 4.2.3.2.5	Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Wistar Rats (13-Weeks Daily Administration by Gavage)
BXR5B6L	[redacted]	PH-37477 4.2.3.2.9	Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Beagle Dogs (13-Weeks Daily Administration by Gavage)
BXR5B6L	[redacted]	PH-37948 4.2.3.5.1.1	Study on Fertility and Early Embryonic Development in Rats after Administration by Gavage
BXR5B6L	[redacted]	PH-38325 4.2.3.5.2.1	Prenatal Developmental Toxicity Study in Rats after Administration by Gavage
BXR5B6L	[redacted]	PH-36774 4.2.3.7.7.1	In vitro 3T3 NRU (neutral red uptake) phototoxicity assay
BXR5B6P	[redacted]	PH-38233 4.2.3.2.2	Subchronic Toxicity Study in CD-1 Mice 13-Weeks Administration by Diet with Dose Adjustment
BXR5B6P	[redacted]	PH-37899 4.2.3.2.6	Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Wistar Rats (26-Week Daily Administration by Gavage)
BXR5B6P	[redacted]	R-9363 4.2.3.2.10	39-Week Oral (Gavage) Administration Toxicity Study in the Dog

Test Article: Vericiguat

Proposed Specification Batch No.	**Purity (%)**	**Report No. and Location in CTD**	**Study Type**
BXR5B6P	[redacted]	PH-38403 4.2.3.7.3.2	Mechanistic 13-week study in pigmented rats
BXR5B6P	[redacted]	R-13305 4.2.3.4.1.2	104 Week Oral (Gavage) Administration Carcinogenicity Study in the Rat
BXR4WR9	[redacted]	PH-36756 4.2.3.2.8	Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Beagle Dogs (4 Weeks Daily Administration by Gavage)
BXR4WR9	[redacted]	A51658 4.2.3.3.1.1	Bacterial Reverse Mutation Study using Salmonella *typhimurium* (Ames-Test)
BXR4WR9	[redacted]	A52063 4.2.3.3.1.2	Forward Cell Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus (TK+/-) in Mouse Lymphoma L5178Y Cells
BXR4WR9	[redacted]	A51623 4.2.3.3.2.1	Study on the Mutagenic Potential of in the Bone Marrow Micronucleus Test after Two I.P. Administrations to Male Mice
BXR5B6N	[redacted]	PH-38326 4.2.3.5.2.2	Prenatal Developmental Toxicity Study in Rabbits after Administration by Gavage
BXR5B6N	[redacted]	PH-39764 4.2.3.5.4.2	Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Neonatal Wistar Rats
BXR6010	[redacted]	R-12839 4.2.3.5.3.2	Oral (Gavage) Study of Pre- and Postnatal Development in the Rat
BXR6010	[redacted]	R-13312 4.2.3.4.1.1	104 Week Oral (Dietary) Administration Carcinogenicity Study in the Mouse

Test Article: Vericiguat

Proposed Specification Batch No.	**Purity (%)**	**Report No. and Location in CTD**	**Study Type**
BXR6010	[redacted]	R-13305 4.2.3.4.1.2	104 Week Oral (Gavage) Administration Carcinogenicity Study in the Rat
BXR61CV	[redacted]%	R-13312 4.2.3.4.1.1	104 Week Oral (Dietary) Administration Carcinogenicity Study in the Mouse
BXR61CV	[redacted]%	R-13305 4.2.3.4.1.2	104 Week Oral (Gavage) Administration Carcinogenicity Study in the Rat

Note: This table excludes the GLP definitive studies in juvenile animals, as it is not pivotal to this submission.

2.6.7.5　単回投与毒性試験

ベルイシグアトの単回投与毒性試験は実施していない。

2.6.7.6 反復投与毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Adminis-tration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Mouse/ Crl:CD-1(ICR)BR	Oral, diet	2 weeks	0, 100, 300, 1000 ppm [0, 28, 79, 257 mg/kg/day (females); 0, 17, 53, 166 mg/kg/day (males) for main groups]	Toxicity: 6F, 6M per group; TK:15F, 15M per group	1000 ppm (257 mg/kg/day – females; 166 mg/kg/day - males)	**Antemortem**: No effects on survival, body weight, food intake. Increased girth (1 female at 1000 ppm and 1, 2, and 4 males at 100, 300, and 1000 ppm, respectively) was considered related to changes in GI motility. Slightly increased water intake (females at 1000 ppm, males at ≥100 ppm). This, together with slightly decreased plasma creatinine and urea were considered secondary to test article-related vasodilative effects. Slight effects on hematology (decreased erythrocytes and hematocrit at 300 ppm and 1000 ppm (females only) and slightly increased MCH (females ≥100 ppm) without dose dependency. The slight hemodilution may be secondary to the hemodynamic effects of the test article, and was of no toxicologic relevance due to the low magnitude of change relative to controls and the lack of dose dependency. **Postmortem**: Dilated cecum in 2 females at 1000 ppm without histopathologic correlate may be related to MoA-related smooth muscle relaxation. Minimal to slight centrilobular hepatocyte hypertrophy in 4 of 6 males at 1000 ppm was considered adaptive. Slight reduction in corpora lutea in ovaries of 3 of 6 females at 1000 ppm without impact on sexual cycle was considered non-adverse.	PH-38271 (Non-GLP) 4.2.3.2.1

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Adminis-tration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Mouse/ Crl:CD-1(ICR)BR	Oral, diet	2 weeks	0, 100, 300, 1000 ppm [0, 28, 79, 257 mg/kg/day (females); 0, 17, 53, 166 mg/kg/day (males) for main groups]	Toxicity: 6F, 6M per group; TK:15F, 15M per group	1000 ppm (257 mg/kg/day – females; 166 mg/kg/day - males)	**Toxicokinetics (Day 11)**: See table below.	PH-38271 (continued) 4.2.3.2.1

		Males			Females		
Diet conc. [ppm]		**100**	**300**	**1000**	**100**	**300**	**1000**
Dose*	**[mg/kg]**	**17**	**46**	**167**	**24**	**72**	**241**
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	27900	77800	242000	28800	75900	230000
$AUC_{(0-24)norm}$	[kg·h/L]	1.67	1.68	1.45	1.20	1.06	0.952
C_{max}	[µg/L]	1780	5230	14200	1730	4500	14500
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.107	0.113	0.0849	0.0716	0.0629	0.0600
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	95.1	100	97.4	100	100	100
t_{max}	[h]	7	23	7	23	23	7

* Daily test article intake of satellite animals

a No-Observed-Adverse-Effect Level

F= Female; GI = Gastrointestinal; M = Male; MoA = Mode of Action; MCH = Mean Corpuscular Hemoglobin; TK = Toxicokinetic

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Adminis-tration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Rat/ Wistar (Hsd Cpb:WU)	Oral, gavage [Ethanol/ Solutol HS 15®/tap water (10/40/50 v/v/v)]	2 weeks or 3 days (interim necropsy)	0, 10, 30, 100 for 14 days or 0, 100 for 3 days	5F, 5M (main groups and interim necropsy groups); 6F, 6M (satellite TK groups)	10	**Antemortem:** Rats tolerated administration of vericiguat at 10 and 30 mg/kg/day for 2 weeks without mortality, whereas the MTD was exceeded at 100 mg/kg/day [one male at 100 mg/kg/day died on Day 4 and reduced body weight (up to 20% in males and 13% in females) was observed as well as poor general condition with secondary findings (e.g. tremor, piloerection, diarrhea), including organ weights changes (decreases in liver, thymus, spleen, prostate and seminal vesicle weights) and histopathological findings such as reduced fat content (associated with decreased triglyceride levels) in the liver and atrophy of prostate/seminal vesicles or uterus.] Piloerection and diarrhea occurred in males at ≥30 mg/kg/day and females at 100 mg/kg/day. Water intake was increased in males at ≥30 mg/kg/day and females at ≥10 mg/kg/day. Based on a lack of clear dose response and/or inconsistent changes between sexes, the changes in aldrin epoxidase, glutathione-S-transferase, epoxide hydrolase and carnitine acetyltransferase were considered to be within variability and not considered adverse or toxicologically relevant. **Postmortem:** Findings considered related to the MoA of vericiguat included prominent vessels in the heart, prominent Paneth cells in the small intestine (≥30 mg/kg/day males, 100 mg/kg/day females); and prominent zona glomerulosa and hypertrophy/vacuolation of the zona fasciculata of the adrenal glands at ≥10 mg/kg/day. In males at ≥30 mg/kg/day and females at 100 mg/kg/day, bone changes (growth plate alterations and hyperostosis) were also considered secondary to the pharmacological mode of action.	PH-40501 (Non-GLP) 4.2.3.2.3

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Adminis-tration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Rat/Wistar (Hsd Cpb:WU)	Oral, gavage [Ethanol/ Solutol HS 15®/tap water (10/40/50 v/v/v)]	2 weeks or 3 days (interim necropsy)	0, 10, 30, 100 for 14 days or 0, 100 for 3 days	5F, 5M (main groups and interim necropsy groups); 6F, 6M (satellite TK groups)	10	**Toxicokinetics (Day 14)**: See table **Conclusion**: Rats tolerated doses of 10 and 30 mg/kg/day; MTD was exceeded at 100 mg/kg/day. All findings were considered secondary to the excessive pharmacological MoA of vericiguat. Based on poor general condition at 100 mg/kg/day as well as the histopathological bone findings attributed to excessive pharmacological effects at 30 mg/kg/day, the NOAEL was 10 mg/kg/day.	PH-40501 (continued) 4.2.3.2.3

		Males			Females		
Dose	**[mg/kg]**	**10**	**30**	**100**	**10**	**30**	**100**
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	30700	75900	179000	35400	98000	274000
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	3.1	2.57	2.11	3.6	3.35	2.98
C_{max}	[µg/L]	3080	7530	13100	3480	9420	23100
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.308	0.251	0.131	0.348	0.314	0.231
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	1.93	2.48	19.1	3.17	3.95	10.3
t_{max}	[h]	4.00	4.00	4.5	7.00	4.50	7.00

a No-Observed-Adverse-Effect Level.

F= Female; GI = Gastrointestinal; M = Male; MoA = Mode of Action; MTD = Maximum tolerated dose; TK = Toxicokinetic

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Adminis-tration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Dog/ Beagle	Oral, gavage (0.5% Tylose)	2 weeks	0, 1, 3, 10	1F, 1M per group	10	**Antemortem**: No noteworthy findings in clinical signs, body weights, food consumption, ECGs, blood pressure, hematology, and clinical chemistry. Potentially mild liver enzyme induction of phase-I enzymes **Postmortem**: No remarkable organ weight or necropsy findings. Minimal centrilobular hypertrophy in liver of the females at ≥3 mg/kg/day (considered to be induced by enzyme induction) and a borderline (minimal) change in the vasculature of the papillary muscle of the left heart (minimal media hypertrophy together with accumulation of a bluish myxoid matrix in single papillary muscle arteries) in females at 10 mg/kg/day. **Toxicokinetics** (Day 14): See table	PH-40741 (Non-GLP) 4.2.3.2.7

		Males			Females		
Dose	**[mg/kg]**	**1**	**3**	**10**	**1**	**3**	**10**
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	604	2130	8010	1350	7840	7690
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	0.604	0.711	0.801	1.35	2.61	0.769
C_{max}	[µg/L]	52.1	131	810	175	1190	706
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.0521	0.0436	0.0810	0.175	0.395	0.0706
t_{max}	[h]	2.00	2.00	2.00	1.00	2.00	2.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	31.8	84.4	6.26	3.72	9.59	30.9

a No-Observed-Adverse-Effect Level.

F= Female; M = Male

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

2.6.7.7.1 マウス 13 週間混餌投与毒性試験

Test Article: Vericiguat

Report Title: Subchronic Toxicity Study in CD-1 Mice 13 Weeks Administration by Diet with Dose Adjustment

Species/Strain: Mouse/Crl:CD-1(ICR)BR
Initial Age: 6 weeks
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]
Dose Volume: NA

Duration of Dosing: 94 to 98 days
Duration of Postdose: NA
Method of Administration: Oral, diet
Vehicle/Formulation: Mixture with diet [V1530-0 ssniff R/M-H (meal)]

Report Number: PH-38233
Location in CTD: 4.2.3.2.2
GLP Compliance: Yes

Special Features: Actual daily doses (mg/kg/day) were 0, 5.01, 15.77, 49.57 (females) and 0, 4.96, 14.78, 49.65 (males) – for the main groups; 0, 4.7, 11.0, 50.0 (females); 0, 4.1, 12.3, 48.3 (males) for the satellite groups
No-Observed-Adverse-Effect Level: 50 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg) – nominal	0 (Control)		5		15		50	
No. of Animals	F:9	M:9	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Toxicokinetics – Day 76								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	NA	7340	10800	19500	36100	89400	128000
C_{max} (µg/L)	NA	NA	370	559	941	1820	4430	6710
T_{max} (hr)	NA	NA	0	14.0	5.00	14.0	5.00	5.00

Repeat-Dose Toxicity (Mouse 13-week) **Report No.:** PH-38233

Daily Dose (mg/kg) – nominal	0 (Control)		5		15		50	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	1[a]	0	0	0	0	0	0	1[a]
Body Weight (%) [b]	30.27 g	39.54 g	-0.4	-2.5	+3.0	0	0	-3.6
Food Consumption (%) [b, c]	6.810 (g/animal/day)	5.557 (g/animal/day)	-15.9	-6.9	+1.3	-10.3	-18.6	-10.3
Water Consumption (%) [b, d]	5.349 (g/animal/day)	4.971 (g/animal/day)	[+21.5]	[+30.8]	[+22.8]	[+34.8]	[+72.3]	[+21.4]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry [e]								
Creatinine (mcmol/L) [f]	34.7	35.6	33.7	[33.0]*	33.7	[32.6]**	[32.0]**	33.7
Urea (mmol/L) [f]	8.626	-	7.943	-	7.332	-	[7.049]*	-
Organ Weights(%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histomorphology	-	-	NE	NE	NE	NE	-	-

Repeat-Dose Toxicity (Mouse 13-week) **Report No.:** PH-38233

a Deaths related to blood collection, not test article-related.
b At end of dosing period (Day 92). For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.
c Mean food intake data on Day 92 were without statistical significance and therefore the % differences from control could be explained by the individual animal activity and displaced food (spillage), particularly in controls.
d Increase considered secondary to vasodilative effects of the test article.
e Control and treatment group values are mean absolute values on Day 87.
f Serum biochemistry findings were considered secondary to hemodynamic effects and subsequent changes in renal perfusion.

NA = Not applicable; NE = Group not examined.; No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ or $p \leq 0.001$

2.6.7.7.2 ラット 4 週間反復投与毒性試験（2 週間休薬）

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Rat/Wistar (Hsd Cpb:WU)
Initial Age: 6 weeks
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]
Dose Volume: 10 mL/kg

Duration of Dosing: at least 31 days
Duration of Postdose: 17 (males)/18 (females) days
Method of Administration: Oral Gavage
Vehicle/Formulation: Ethanol/Solutol HS 15®/tap water (10/40/50 v/v/v)

Report Number: PH-36714
Location in CTD: 4.2.3.2.4
GLP Compliance: Yes

Special Features: Serum Biochemistry (Clinical Chemistry) parameters included measurement of T3, T4, and TSH (Day 25/26 of the dosing phase) and Day 15 of the recovery phase). Enzyme activity determined from homogenized liver tissue; immunotoxicological evaluation (blood samples and spleen specimens from the first 5 rats/sex/group at necropsy).
No-Observed-Adverse-Effect Level: <15 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetics – Day 22								
No. of Animals/Time Point	3	3	3	3	3	3	3	3
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•h/L)	NA	NA	86430	74606	157916	151914	252674	240246
C_{max} (µg/L)	NA	NA	8982	8004	15583	16042	24258	23602
T_{max} (hr)	NA	NA	7.00	4.00	4.00	7.00	7.00	7.00

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%) [a]	224.2 g	346.8 g	+4.4	-1.0	+5.0	-2.8	+4.5	[-8.8*] [b]
Transient body weight loss (Week 1)						[P]	[P]	[P]
Food Consumption (%) [a]	18.8 g/day	25.7 g/day	+8.5	+10.5	+17.0	+10.9	+19.1	+13.6
Transient reduced food consumption (Week 1)							[P]	[P]
Water Consumption (%) [a]	26.8 g/day	36.8 g/day	[+20.9]	[+15.8]	[+37.7]	[+33.7]	[+49.3]	[+37.5]
Clinical Observations								
No. of animals	F:20	M:20	F:10	M:10	F:10	M:10	F:20	M:20
High stepping gait			[3]	[1]	[4]	[2]	[9]	[6]
Uncoordinated gait					[1]	[3]	[2]	[6]
Muscle tone diminished							[1]	[1]
Squatting position								[1]
Decreased motility						[3]	[11]	[11]
Increased salivation			[2]	[2]	[3]	[2]	[5]	[7]
Change in feces consistency		[1]		[3]		[3]	[3]	[5]
Increased girth							[3]	[1]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Tense (agitated) general behavior					[1]	-	[5]	-
Piloerection							[6]	[6]
Digging and cleaning movements					[1]		[2]	[1]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology								
Erythrocytes (T/L) [d]	8.178	-	8.217	-	7.813	-	[7.594**]	-
Hemoglobin(g/L) [d]	147.7	-	153.0	-	148.4	-	[143.0]	-
Basophils (g/L) [e]	0.051	-	0.074	-	[0.114**]	-	[0.120**]	-
Hematocrit (L/L) [d]	0.4797	-	0.4963	-	0.4620	-	[0.4510**]	-
Reticulocytes (%) [e]	1.64	2.28	1.94	2.50	2.11	2.67	[2.52**]	[3.18*]
Serum Biochemistry								
Triglycerides (mmol/L) [d]	1.377	1.666	[1.060*]	1.402	[0.845**]	[1.157**]	[0.736**]	[0.816**]
Creatinine (mcmol/L) [d]	58.9	56.1	58.0	53.6	[54.5**]	55.7	[52.0**]	55.3
Cholesterol (mmol/L) [f]	2.112	2.297	2.016	1.963	[1.739**]	[1.785**]	[1.681**]	[1.679**]
Protein (g/L) [d]	64.07	64.77	64.05	63.49	[59.89**]	62.42	[56.91**]	[62.00*]
Urea (mmol/L) [d]	6.617	-	7.111	-	7.109	-	[7.637*]	-

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Urinalysis								
Volume (mL) [e]	2.25	3.45	4.50	4.75	[5.49**]	[7.29**]	[4.57*]	5.13
Density (kg/L) [e]	1.0636	1.0653	1.0481	[1.0468*]	[1.0402**]	[1.0369**]	[1.0438*]	[1.0446**]
Creatinine (mmol/L) [e]	12.527	14.315	9.364	[10.182*]	[7.466**]	[6.842**]	[8.011*]	[9.204**]
Protein (g/L) [e]	0.429	3.050	0.333	2.097	0.336	[1.159**]	0.413	[0.904**]
Protein*Vol (mg) [e]	0.95	10.30	1.28	8.56	1.50	7.98	1.74	[4.83**]
Protein/Creatinine (mg/mmol) [e]	35.2	213.4	37.4	204.0	43.7	172.3	52.8	[105.4**]
Urine Crystals	-	-	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]
Organ weights [a, c] (%)								
Adrenals [d]	61.8 mg	50.4 mg	+11	+20	+11	+14	[+20**]	+15
Spleen [d]	541.6 mg	701.9 mg	+12	+0.5	+13	-0.2	+17	+6
Prostate [d]	NA	740.6 mg	NA	-5	NA	-14	NA	[-25**]
Seminal vesicles [d]	NA	1079.4 mg	NA	-3	NA	-15	NA	[-33**]
Liver [d]	10721.5 mg	16952.9 mg	+12*	+2	+9	-4	[+16**]	-9
Gross Pathology (Incidence)								
Prostate, reduced in size								[2]
Seminal vesicle, reduced in size								[3]
Small intestine, elongated				[8]		[5]	[5]	[8]
Large intestine, elongated				[5]		[2]	[3]	[8]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Histopathology (Incidence)								
Heart								
Prominent vessels - Minimal						[2]	[2]	[8]
Jejunum								
Hypertrophic/vacuolated Paneth cells								
Minimal							[3]	[4]
Slight								[1]
Ileum								
Hypertrophic/vacuolated Paneth cells								
Minimal					[3]	[5]	[5]	[4]
Slight							[2]	[5]
Liver								
Prominent bile ducts (slight)								[2]
Hypertrophy								
Minimal								[2]
Slight								[1]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Periportal fat deposit								
Minimal	6	6	5	6	[5]	5	[6]	[1]
Slight	4		3		[1]			
Kidneys								
Prominent distal tubules (minimal)								[4]
Basophilic tubules (decrease)								
Minimal	6	8	7	6	[2]	6	[2]	[3]
Slight	1			1			[1]	
Prostate gland								
Atrophy (minimal)		0						[3]
Seminal vesicles								
Atrophy								
Minimal		1						[1]
Slight								[1]
Adrenal glands								
Hypertrophy - zona glomerulosa								
Minimal			[3]	[7]	[2]	[1]	[6]	[2]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Slight					[1]	[8]		[5]
Moderate								[3]
Hypertrophy zona fasciculata								
Minimal			[3]	[1]	[2]	[3]	[4]	[4]
Spleen								
Hematopoiesis								
Minimal	5	7	5	4	5	5	[4]	[2]
Slight	3	1	2		2		[6]	[6]
Moderate			1					[1]
Bone/Femur								
Thickened growth plate								
Minimal		2	[3]	2	[2]	[3]	[3]	
Slight		1				[5]	[4]	[4]
Moderate							[1]	[2]
Marked							[1]	[1]
Extensive								[1]
Remodeling/hyperostosis								
Minimal					[3]	[4]		[1]
Slight					[1]	[2]	[3]	[5]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Moderate							[5]	[2]
Marked							[2]	[1]
Immunotoxicology	-	-	-	-	-	-	-	-
Additional Examinations								
Enzyme Activity in Liver Tissue [j]								
ECOD (nmol/g*min) [g]	4.9	7.4	4.4	6.8	4.3	8.2	3.5*	7.1
EROD (nmol/g*min) [g]	0.52	0.47	0.40	0.30*	0.27*	0.51	0.26*	0.36
ALD (nmol/g*min) [g]	34.6	225.2	30.4	168.6**	28.8	160.2**	27.6	126.6**
CAT (nmol/g*min) [g]	200	66	262	90	218	104*	344**	151**
GS-T (µmol/g*min) [g]	83	105	79	90	87	86*	75	74**
GLU-T (nmol/g*min) [g]	818	1090	600	848*	620	921	502*	697**

Note: In treated males, ALD and GLU-T values were similar to control values in other studies conducted by Bayer-AG. In treated females, ECOD, EROD, CAT and GLU-T values were similar to control values seen in other studies conducted by Bayer-AG.

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings								
Postdose Evaluation [i]								
No. of Animals Evaluated	10	10	NE	NE	NE	NE	10	10
Clinical Observations								
High stepping gait							[4]	[1]
Uncoordinated gait								[1]
Decreased motility							[1]	-
Increased salivation							[4]	[2]
Increased girth							[2]	-
Tense, agitated							[2]	-
Piloerection								[1]
Body Weight (%) [a d]	240.0	389.2					+5.8	-4.9*
Food Consumption (%) [a]	18.7	27.3					+8.6	+0.7
Hematology								
Basophils (g/L) [e]	0.048	-					[0.070*]	-
Serum Chemistry								
Triglycerides (mmol/L) [d]	1.223	2.143					1.268	[1.550*]
Creatinine (mcmol/L) [d]	62.7	65.0					61.2	[61.0*]
Cholesterol (mmol/L) [g]	1.928	2.226					1.940	[1.808**]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Protein (g/L) [d]	68.90	68.97					[64.80*]	[66.20*]
Glucose (mmol/L) [d]	5.241	5.178					5.203	[5.403*]
Urinalysis								
Volume (mL) [e]	12.79	12.31					[6.02*]	17.14
Creatinine (mmol/L) [e]	4.508	7.398					[7.792**]	5.511
Protein (mmol/L) [e]	0.140	1.348					[0.284*]	[0.733*]
Organ Weights [a, c] (%)								
Adrenals [d]	62.8	60.8					+18	[+30*]
Spleen [d]	605.5	897.8					+14	[-12]
Seminal vesicles [d]		1089.4						[+21*]
Gross Pathology								
Small intestine, elongated								[1]
Large intestine, elongated								[1]
Histopathology								
Heart								
Prominent vessels (minimal)							[1]	[2]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		15		30		60	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Bone/Femur								
Thickened growth plate								
Minimal								[2]
Slight								[4]
Remodeling/hyperostosis								
Minimal								[2]
Slight							[1]	[5]
Moderate								[1]
Enzyme Activity in Liver Tissue [j]								
ECOD (nmol/g*min) [g]	3.2	5.3					2.2*	3.5*
EROD (nmol/g*min) [g]	0.21	0.30					0.13*	0.17
ALD (nmol/g*min) [g]	22.6	161.1					14.8*	100.1
CAT (nmol/g*min) [g]	112	34					106	24
EH (nmol/g*min) [g]	216	472					180	252*
GS-T (µmol/g*min) [g]	74	93					58	71**
GLU-T (nmol/g*min) [g]	452	777					321	436*

Repeat-Dose Toxicity (Rat 4-week) **Report No.:** PH-36714

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.
b Reduced body weight over the entire study period in males at 60 mg/kg/day
c Absolute weights differed from controls in the direction indicated. Number indicates percent difference for the absolute organ weights.
d Dunnett Exact Homogenous Test
e Bonferroni/Mann-Whitney U-test
f The urinary crystals were considered nonadverse in the absence of any degenerative or regenerative lesions in kidneys and urinary bladder and since no crystals were observed at the end of the 2-week recovery period.
g Dunnett Exact Homogenous Test after logarithmic transformation
h Students' t-test (MS-Excel)
i Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible
j The changes in enzyme activity in liver tissue are of equivocal relationship to treatment and considered nonadverse.

NA = Not applicable; P = Present; NE = Group not examined.; No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ or $p \leq 0.001$

2.6.7.7.3 ラット 13 週間反復投与毒性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Rat/Wistar (HsdRCCHan:Wist)
Initial Age: 7 weeks
Date of First Dose: [redacted]
Dose Volume: 10 mL/kg

Duration of Dosing: up to 93 days
Duration of Postdose: NA
Method of Administration: Gavage
Vehicle/Formulation: Ethanol/Solutol HS®15/Tap water (10/40/50 v/v/v)

Report Number: PH-37470
Location in CTD: 4.2.3.2.5
GLP Compliance: Yes

Special Features: None
No-Observed-Adverse-Effect Level: 10 mg/kg

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Toxicokinetics – Day 69								
No. of Animals/Time Point	3	3	3	3	3	3	3	3
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•h/L)	NA	NA	23500	16200	72900	52600	212000	146000
C_{max} (µg/L)	NA	NA	1930	1440	5630	4310	14400	10900
T_{max} (hr)	NA	NA	7.00	4.00	7.00	7.00	7.00	7.00

Repeat-Dose Toxicity (Rat 13-week) **Report No.:** PH-37470

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)		1 [a]	1 [a]					1 [b]
Body Weight (% [c]) [f]	233.3	358.0	+2.3	+0.2	+6.4	+6.7	+7.5*	+3.3
Food Consumption (%) [c g]	13.9 (g/animal/day)	18.6 (g/animal/day)	+10.8**	+3.8	+14.4**	+8.6	+20.9**	+11.8**
Water Consumption (%) [c g]	24.2 (g/animal/day)	31.1 (g/animal/day)	+8.7	-3.9	[+19.0]	-6.8	[+30.2**]	[+27.7**]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry								
Triglycerides (mmol/L) [f]								
Day 34/35	1.372	-	1.122	-	1.205	-	[0.622**]	-
Day 90/91	1.485	1.886	1.420	1.901	1.576	1.921	[0.863*]	[0.868**]
Protein (g/L) [f]								
Day 34/35	73.28	69.36	72.81	69.47	72.73	68.94	[69.46]	[63.68*]
Day 90/91	80.00	71.19	78.39	69.96	79.47	72.67	[74.65*]	[66.04*]
Creatinine (μmol/L) [f]								
Day 34/35	59.6	57.9	57.6	55.7	56.9	55.2	[56.0*]	[52.2*]
Day 90/91	65.0	60.1	61.9	57.5	[60.9**]	[56.6*]	[56.1**]	[55.8**]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 13-week) **Report No.:** PH-37470

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Phosphate (mmol/L) [f]								
Day 34/35	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 90/91	2.446	-	2.234	-	[2.002**]	-	[1.974**]	-
Urinalysis								
Volume (mL) (Day 85)	-	14.09	-	17.51	-	16.54	-	[26.06]
Urine Crystals								
Day 21/22 [h]	P		[P]	[P]	[P]	[P]	[P]	[P]
Day 84/85 [h]							[P]	
Organ weights(%) [c,d]								
Adrenals (mg) [f]	76.3	52.6	-1	+14	+7	[+25*]	+11	[+25*]
Spleen (mg) [f]	560.9	704.6	[+24*]	+1	[+27**]	+1	[+29**]	[+19*]
Gross Pathology (Incidence)								
Small intestine								
Dilation						[1]		
Elongation						[1]		[3]
Change – in - contents						[1]		
Large intestine								
Dilation						[1]		
Elongation						[1]		[3]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 13-week) **Report No.:** PH-37470

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Change – in - contents						[1]		
Histopathology (Incidence)								
Heart								
Prominent myocardial vessels, minimal								[2]
Jejunum								
Hypertrophy Paneth cells, minimal						[1]		[4]
Dilation, slight								[1]
Ileum								
Hypertrophy Paneth cells								
Minimal			1			[1]	[2]	[5]
Slight								[2]
Dilation, slight								[2]
Cecum								
Diffuse inflammation								
Minimal		2			1	1	1	[3]
Slight						1		[1]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 13-week) **Report No.:** PH-37470

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10	F:10	M:10
Spleen								
Hematopoiesis								
Minimal	1	8		6	3	6	1	[4]
Slight	7	1	6	3	2	2	5	[4]
Moderate	2		3		4		4	[1]
Adrenal glands								
Hypertrophy zona glomerulosa								
Minimal			[2]	[4]	[4]	[4]	[4]	[4]
Slight					[1]	[1]	[4]	[5]
Vacuolation zona fasciculata, minimal						[1]		[2]
Bone/Femur								
Remodeling/hyperostosis, minimal							[4]	[4]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 13-week) **Report No.:** PH-37470

a Deaths of the control male (Week 5) and low-dose female (Week 13) were associated with blood collection.
b The cause of death of one high-dose male (Week 6) could not be determined due to autolysis. Histopathological findings included hypocellularity/depletion of bone marrow (femur and sternum), lymphoid depletion of spleen, tissue mineralization of heart and aorta. Based on the lack of signs of severe toxicity and the fact that no other animals in the high-dose group died prior to scheduled necropsy, this death was not attributed to test article.
c At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
d Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights
f Dunnett Test
g Mann-Whitney U-test
h Urinary crystals were not considered adverse as they were not associated with any degenerative, regenerative, hyperplastic, or inflammatory changes in the urinary tract, and, except for one animal, were not seen in the urinary sediment close to the end of the study (Day 84/85).

NA = Not applicable
No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
* $p<0.05$ **$p<0.01$

2.6.7.7.4 ラット 26 週間反復投与毒性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Rat/HsdRCCHan:Wist
Initial Age: Females - 6 weeks; Males – 7 weeks
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]
Dose Volume: 10 mL/kg

Duration of Dosing: 181-185 days
Duration of Postdose: Not Applicable
Method of Administration: Oral (gavage)
Vehicle/Formulation: Ethanol/Kolliphor HS®15/Tap water, (10/40/50 v/v/v)

Report Number: PH-37899
Location in CTD: 4.2.3.2.6
GLP Compliance: Yes [a]

Special Features: Micronucleus assay using 5 males (Day 140 peripheral blood) – see [2.6.7.8]. Clinical Chemistry and Urinalysis Investigative Parameters – special bone biomarkers – PTH and calcitriol (blood), CTX-I (in blood and urine); note that for females, CTX-I clearance could not be calculated because the concentration was below the limit of detection in urine and/or blood). Pathology - Length of right femur and right humerus
No-Observed-Adverse-Effect Level: 30 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals per time point	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics – Day 149								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	NA	16800	13800	62600	45000	167000	150000
C_{max} (µg/L)	NA	NA	1530	1360	6000	4700	18400	12500
T_{max} (hr)	NA	NA	4.00	2.00	4.00	4.00	4.00	2.00

Repeat-Dose Toxicity (Rat 26-week) **Report No.:** PH-37899

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	1 [b]	0	1 [b]	0	0
Body Weight (%) – Day 182/183 [c]	276.3 g	465.7 g	+1.8	-4.5	+2.0	-3.1	+3.2	-5.4
Food Consumption – Day 169 (%) [d]	15.6 g	20.4 g	+5.8	-2.9	+3.2	-4.9	+6.4	-2.0
Water Consumption – Day 169 (%) [d]	27.1 g	28.4 g	[+17.7]	+0.4	[+24.4**]	+2.1	[+30.6**]	[+16.6**]
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology [e]								
Thrombocytes – g/L (not toxicologically relevant)								
Day 28/29	867.3	823.2	754.0	760.7	759.9	711.9	826.1	714.7
Day 86/87	816.7	740.8	763.1	781.2	812.6	762.9	813.9	738.5
Day 175/176	1039.0	1025.6	[911.2*]	929.2	[913.8*]	925.8	[889.8**]	[850.6**]
Serum Biochemistry [e]								
Creatinine (µmol/L)								
Day 30/31	54.8	54.1	52.1	53.2	54.2	[49.8**]	51.6	[50.3**]
Day 84/85	58.4	59.9	56.0	56.9	55.1	56.3	[52.8**]	[53.5**]
Day 177/178	62.8	57.0	60.8	55.7	61.9	55.7	[58.0**]	[54.7]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 26-week) **Report No.:** PH-37899

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20
Cholesterol (mmol/L)								
Day 30/31	-	1.907	-	1.894	-	1.911	-	[1.535**]
Day 84/85	-	2.073	-	2.156	-	2.034	-	[1.707*]
Day 177/178	-	2.190	-	2.271	-	2.250	-	[1.779*]
Sodium (mmol/L)								
Day 30/31	-	146.3	-	147.3	-	146.4	-	[148.6*]
Day 84/85	-	148.8	-	149.7	-	149.5	-	[150.4*]
Day 177/178	-	147.5	-	148.4	-	[149.4*]	-	[150.8**]
Chloride (mmol/L)								
Day 30/31	-	96.8	-	96.0	-	[95.0*]	-	[94.8**]
Day 84/85	-	96.3	-	95.2	-	95.2	-	94.9
Day 177/178	-	97.0	-	94.8**	-	95.9	-	[95.5*]
Urinalysis/Urine Chemistry								
Volume (ml) [e]								
Day 24/25	28.22	28.80	29.95	32.14	22.19	38.38	38.00	45.79
Day 71/72	23.52	13.76	27.45	18.21	23.01	21.69	30.28	[30.45*]
Day 169/170	6.23	10.29	11.07	[17.33]	[13.36*]	[21.93**]	[16.04*]	[26.02**]
Urine Crystals [f]								
Day 24/25							[P]	[P]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 26-week)			**Report No.:** PH-37899					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20
Day 71/72					[P]	[P]	[P]	[P]
Day 169/170						[P]	[P]	[P]
Investigative Parameters – bone biomarkers	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology (Incidence)								
Cecum								
Dilatation					[1]		[2]	[4]
Large Intestine								
Consistency Changes						[1]		[3]
Elongated								[2]
Small Intestine								
Consistency Changes						[1]		[3]
Elongated								[2]
Histopathology (Incidence)								
Adrenal Glands								
Hypertrophy/Hyperplasia (zona glomerulosa)								
Minimal		1	[2]	[10]	[6]	[9]	[7]	[5]

Repeat-Dose Toxicity (Rat 26-week) **Report No.:** PH-37899

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20
Slight			[2]	[3]	[3]	[9]	[10]	[12]
Moderate								[3]
Medullary Change (cell populations more distinct indicative of activation of chromaffin cells)	1			[3]	[5]	[8]	[3]	[17]
Heart								
Prominent vasculature								
Minimal		3		3		5		[8]
Slight								[2]
Liver								
Hypertrophy (hepatocellular)								
Minimal	1				[5]		[7]	
Slight					[1]			
Prominent bile ducts								
Minimal	5		2		1		[9]	
Slight					1		[2]	

Repeat-Dose Toxicity (Rat 26-week) **Report No.:** PH-37899

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		3		10		30	
No. of Animals	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20	F:20	M:20
Mesenteric Lymph Node								
Plexiform change								
Minimal				[1]	[2]	0	[3]	[4]
Slight				[2]	[1]	[2]	[3]	[2]
Moderate				[1]		[1]		[1]

a GLP compliant with the exception of the method for determination of CTX and calcitriol which were not validated. The determinations were performed according to manufacture method.
b Incidental mortality (one male each at 3 and 10 mg/kg/day) was considered related to spontaneous inflammation in the bladder or prostate.
c At end of dosing period. For controls, group means are shown. For dose groups, percent differences from controls are shown.
d At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated-groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).
e Control and treatment group values are mean absolute values.
f Urinary crystals were considered nonadverse as they were not associated with any degenerative, regenerative, hyperplastic or inflammatory changes in the urinary tract.

CTX = C-terminal telopeptide; NA = Not applicable; P = Present; NE = Group not examined; No. = Number.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.
* $p \leq 0.05$ **$p < 0.01$

2.6.7.7.5 イヌ 4 週間反復投与毒性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Dog/Beagle
Initial Age: 21-25 weeks
Date of First Dose: [redacted]
Dose Volume: 2 mL/kg

Duration of Dosing: 4 weeks
Duration of Postdose: NA
Method of Administration: Oral (gavage)
Vehicle/Formulation: Polyethylene Glycol (PEG) 400

Report Number: PH-36756
Location in CTD: 4.2.3.2.8
GLP Compliance: Yes

Special Features: Dose reduction from 25 to 15 mg/kg in Week 3
No-Observed-Adverse-Effect Level: 2.5 mg/kg

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2.5		7.5		25/15	
No. of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics – Day 25			F/M:6		F/M:6		F/M:6	
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•h/L)	NA	NA	6390		14100		17600	
C_{max} (µg/L)	NA	NA	939		2220		2630	
T_{max} (hr)	NA	NA	0.891		0.630		0.871	

Repeat-Dose Toxicity (Dog 4-week) **Report No.:** PH-36756

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2.5		7.5		25/15	
No. of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	0	0	0	1 [a]
Body Weight Gain - kg (%)	1.1	1.6	1.1 (0%)	1.1 (-31%)	1.3 (+18%)	[0.9] (-44%)	[0.7] (-36%)	[0.9] (-44%)
Food Consumption: reduced	-	-	-	-	-	-	[+]	-
Clinical Observations								
Stronger pulse beats			[3]	[3]	[3]	[3]	[3]	[3]
Rectal prolapses								
Reversible							[1]	[2]
Non-Reversible					[1]	[1]		[1]
Salivation					[2]	[3]	[3]	[3]
Vomited					[+]		[+]	
Food				1	[2]	3	[2]	
Mucus/Foam (yellowish)	1			2	[2]	1	[2]	2
Mucus/Foam (whitish)	1	3		2	[3]	3	[3]	3
Tremor	-	-	-	-	-	-	[2]	-
Nutritional State (Reduced) [b]	-	-	-	-	-	-	[P]	[P]
Reflexes	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Temperature	-	-	-	-	-	-	-	-

Repeat-Dose Toxicity (Dog 4-week) **Report No.:** PH-36756

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2.5		7.5		25/15	
No. of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart rate [b] (beats/min.)								
Week 1	112	131	[171]	157	[181]	169	[203]	[182]
Week 4	106	101	131	123	137	138	[169]	[178]
Blood Pressure [b] (mm Hg; Systolic/Diastolic)								
Week 1	142/72	140/66	[111/54]	131/75	[103/61]	[124/70]	[105/58]	[117/60]
Week 4	148/84	152/82	[109/63]	156/91	[115/61]	[122/77]	[104/53]	[114/63]
Hematology								
Reticulocytes (%) – Week 2	1.47	1.13	1.73	1.17	2.00	0.97	1.90	2.20 [c]
Serum Biochemistry								
Sodium (mmol/L) – Week 2	144.0	-	143.7	-	143.7	-	138.0 [d]	-
Potassium (mmol/L) – Week 2	4.77	-	4.77	-	4.87	-	4.17 [d]	-
Chloride (mmol/L) – Week 2	111.3	-	109.3	-	109.3	-	106.0 [d]	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Enzyme Activity in Liver Tissue	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ weights (Organ Weight (g) / Body Weight (g) x 100)								
Kidneys	0.51	0.50	0.52	0.56	0.54	[0.61]	[0.61]	[0.59]
Adrenals	0.0167	0.0130	0.0185	0.0153	0.0187	0.0161	[0.0215]	[0.0199]

Repeat-Dose Toxicity (Dog 4-week) **Report No.:** PH-36756

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2.5		7.5		25/15	
No. of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Gross Pathology (Incidence)								
Mesenterial Lymph Nodes								
Discoloration/s, red				1		1		[3]
Histopathology (Incidence)								
Heart								
Hypertrophy, myocardial arteries								
Minimal	1		[1]	[1]		[1]		[1]
Slight				[1]	[2]	[1]	[2]	[1]
Myocardial fibrosis								
Slight					[1]			
Moderate					[1]			
Focal inflammatory infiltrates								
Slight							[1]	
Kidney								
Hypertrophy, juxtaglomerular apparatus								
Minimal					[1]			[1]
Slight							[3]	[1]

Repeat-Dose Toxicity (Dog 4-week) **Report No.:** PH-36756

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		2.5		7.5		25/15	
No. of Animals	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Basophilic tubules								
Minimal		1	1		1	1		
Slight							[1]	
Moderate							[1]	
Adrenals								
Increased width, zona glomerulosa								
Minimal							[1]	[1]
Slight							[1]	
Rectum								
Inflammation								
Slight					[1]		[1]	
Moderate						[1]		[1]

a One high-dose male was sacrificed on Day 15 due to a rectal prolapse which could not be repositioned.
b Heart rate and blood pressure measurements 2 hrs after administration.
c A slight increase in reticulocyte count occurred in one high-dose male only (during Week 2 only) and therefore was considered incidental. This finding is included in this table to provide clarification of the results as presented in the study report.
d The slight decreases in sodium, potassium, and chloride occurred in one high-dose female only (during Week 2 only) and therefore were considered incidental. These findings are included in this table to provide clarification of the results as presented in the study report.
NA = Not applicable; P = Present; M = Male; F = Female; No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.* $p \leq 0.05$ **$p < 0.01$

2.6.7.7.6 イヌ 13 週間反復投与毒性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Dog/Beagle
Initial Age: 50 weeks – 54 weeks
Date of First Dose: [redacted]
Dose Volume: 2 mL/kg

Duration of Dosing: 13 weeks
Duration of Postdose: NA
Method of Administration: Oral/Gavage
Vehicle/Formulation: Poly Ethylene Glycol (PEG) 400

Report Number: PH-37477
Location in CTD: 4.2.3.2.9
GLP Compliance: Yes

Special Features: NA
No-Observed-Adverse-Effect Level: 5 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1.25		2.5		5	
No. of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Toxicokinetics – Day 87			M/F:8		M/F:8		M/F:8	
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•h/L)	NA	NA	5820		10600		21800	
C_{max} (µg/L)	NA	NA	696		1490		3070	
T_{max} (hr)	NA	NA	1.41		1.19		0.917	

Repeat-Dose Toxicity (Dog 13-week) **Report No.:** PH-37477

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1.25		2.5		5	
No. of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain - kg (%)	0.9	1.7	1.1 (+22%)	[1.5] (-12%)	[0.3] (-67%)	[1.1] (-35%)	[0.7] (-22%)	[0.6] (-65%)
Food Consumption: reduced							[+]	[+]
Clinical Observations								
Salivation			[2]	1	[1]	[3]	[4]	[4]
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography								
QTcF-interval								P [a]
Increase - slight (Day 87, 2 hours after administration)								
Heart Rate	92	98	117	140	125	124	[164]	140
Increase (beats/min.; Day 11, 2 hours after administration)								
Blood Pressure								
Decrease (mm Hg)								
Day 11, 2 hours after dosing	141/70	168/94	116/54	136/61	120/65	135/69	125/71	[108/60]
Day 87, 2 hours before dosing	127/55	161/70	150/69	158/69	151/72	129/48	[117/42]	150/78

Repeat-Dose Toxicity (Dog 13-week) **Report No.:** PH-37477

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1.25		2.5		5	
No. of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Biochemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology (Incidence)								
Heart								
Arterial hypertrophy in papillary muscle								
Minimal							[2]	[1]
Slight							[1]	[1]

a A slight increase (8%) of QTcF intervals in 5 mg/kg/day-dosed males was considered to represent biological variability and not test article-related since comparable findings were not seen in the 4-week and 39-week studies reaching comparable exposure multiples.

NA = Not applicable; + = Change Present; No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings

2.6.7.7.7 イヌ 39 週間反復投与毒性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Dog/Beagle
Initial Age: 27 to 32 Weeks
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]
Dose Volume: 1 mL/kg

Duration of Dosing: 39 Weeks
Duration of Postdose: NA
Method of Administration: Oral (Gavage)
Vehicle/Formulation: Poly Ethylene Glycol (PEG) 400

Report Number: R-9363
Location in CTD: 4.2.3.2.10
GLP Compliance: Yes [a]

Special Features: Clinical Chemistry and Urinalysis Investigative Parameters – special bone biomarkers of PTH (blood), P1NP (blood), CTX-I (blood), CTX-II (urine); osteocalcin (blood); calcitriol/vitamin D (blood)
No-Observed-Adverse-Effect Level: 5 mg/kg/day

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		1.5		5	
No. of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Toxicokinetics [b] – Day 273			M/F:8		M/F:8		M/F:8	
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•h/L)	BLLOQ	BLLOQ	2380		7200		12000	
C_{max} (µg/L)	BLLOQ	BLLOQ	327		934		1490	
T_{max} (hr)	NA	NA	0.707		0.771		1.00	

Repeat-Dose Toxicity (Dog 39-week) **Report No.:** R-9363

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		1.5		5	
No. of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (kg) (%) [c]	2.08 kg	2.34 kg	0.29 (+14%)	0.89 (+38%)	0.06 (+2.9%)	0.59 (+25%)	0.8 (+39%)	1.12 (+48%)
Food Consumption	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations								
Dosing Phase								
Salivation								
Minimal	2	1	[2]	[2]	[4]	[4]	[3]	[4]
Moderate	1		[1]	[1]	[2]	[1]	[1]	[2]
Vomit, moderate, **red**, frothy						[1]		
Postdose Observations (after gavage dose)								
Salivation			[1]	[1]	[2]	[1]		
Vomit, white, liquid						[1]		
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure	-	-	-	-	-	-	-	-

Repeat-Dose Toxicity (Dog 39-week) **Report No.:** R-9363

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		0.5		1.5		5	
No. of Animals	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4
Body Temperature	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Investigative Parameters – bone biomarkers	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcitriol/Vitamin D Analysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-	-	-

a GLP with the exception that no on-site quality assurance inspection of the Vitamin D sample receipt or experimental phase was conducted.
b Geometric means, usually n = 8 (n = 4 per gender)
c For control, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.

- = No noteworthy findings; No. = Number
BLLOQ = Below the lower limit of quantitation; CTX = C-terminal telopeptide; P1NP = Procollagen type 1 N-terminal propeptide PTH = Parathyroid hormone;

2.6.7.8 In Vitro遺伝毒性試験

2.6.7.8.1 細菌を用いる復帰突然変異試験（Ames 試験）

Test Article: Vericiguat

Test for Induction of: Point mutations
Strains: S. typhimurium: TA1535, TA1537, TA98, TA100, TA102
Metabolizing System: S9, 10% (direct plate incorporation) and 30% (pre-incubation), rat, Aroclor 1254-induced
Treatment: Direct plate incorporation (48 or 72 hrs at 37°C) and pre-incubation (60 min at 37°C)

No. of Independent Assays: 2
No. of Replicate Cultures: 3
No. of Cells Analyzed/Culture: >1x10^8
Vehicle for Positive Controls: Phosphate buffer for Mitomycin C, Cyclophosphamide, N-Nitrosodimethylamine, Cumene hydroperoxide and Sodium azide,
DMSO for all others
Vehicle for Test Article: DMSO

Report No.: A51658
Location in CTD: 4.2.3.3.1.1
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]20[redacted]

Rationale for Selection of Concentrations: Solubility limit

Cytotoxic Effects: Yes. Precipitates in the agar were found starting from 2500 µg/plate onwards in all tester strains in the two tests with and without metabolic activation. Growth inhibition of the background lawn was not observed.

Genotoxic Effects*: None
*Appropriate positive control chemicals induced marked and reproducible increases in revertant colony numbers with all strains.

Geonotoxicity (Ames test) **Report No.:** A51658

Without Activation	Test Article	Concentration [µg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	TA 102
Plate Incorporation	DMSO	0	17 ± 2	118 ± 8	9 ± 3	19 ± 3	201 ± 7
	PB	0	17 ± 4	122 ± 3	8 ± 1	18 ± 2	221 ± 19
	BAY 1021189	100	17 ± 2	119 ± 10	8 ± 2	16 ± 3	212 ± 22
	BAY 1021189	250	19 ± 1	125 ± 11	7 ± 1	17 ± 2	209 ± 15
	BAY 1021189	500	15 ± 3	111 ± 15	7 ± 1	19 ± 2	214 ± 7
	BAY 1021189	1000	15 ± 3	117 ± 4	8 ± 2	18 ± 3	214 ± 8
	BAY 1021189	2500 P	12 ± 2	124 ± 7	6 ± 1	14 ± 2	217 ± 4
	BAY 1021189	5000 P	13 ± 4	116 ± 6	6 ± 1	17 ± 6	205 ± 10
	Sodium azide	5	808 ± 111	620 ± 13			
	NF	10				1037 ± 64	
	4-NPDA	10			64 ± 12		
	Mitomycin C	0.2					395 ± 9
Pre-Incubation	DMSO	0	16 ± 2	109 ± 7	7 ± 2	17 ± 1	195 ± 8
	PB	0	17 ± 2	117 ± 4	8 ± 2	18 ± 1	179 ± 9
	BAY 1021189	100	14 ± 2	104 ± 4	7 ± 2	18 ± 2	203 ± 9
	BAY 1021189	250	15 ± 3	112 ± 1	6 ± 2	20 ± 2	187 ± 28
	BAY 1021189	500	15 ± 3	115 ± 12	6 ± 1	18 ± 4	186 ± 11
	BAY 1021189	1000	15 ± 2	119 ± 10	7 ± 0	18 ± 2	183 ± 8
	BAY 1021189	2500 P	15 ± 3	116 ± 4	7 ± 1	19 ± 3	178 ± 11
	BAY 1021189	5000 P	16 ± 4	117 ± 7	5 ± 1	19 ± 2	186 ± 20
	Sodium azide	5	915 ± 24	996 ± 10			
	NF	10				683 ± 216	
	4-NPDA	10			61 ± 7		
	Mitomycin C	0.2					458 ± 49
	Cumene	50					596 ± 17

P – Precipitation; DMSO = Dimethyl sulfoxide; PB = Phosphate Buffer 4-NPDA = 4-Nitro-o-phenylenediamine; NF = 2-Nitro-9H-fluorene

Geonotoxicity (Ames test) **Report No.:** A51658

With Activation	Test Article	Concentration [µg/tube]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	TA 102
Plate Incorporation	DMSO	0	15 ± 1	122 ± 7	13 ± 3	39 ± 6	233 ± 9
	PB	0	16 ± 3	125 ± 5	15 ± 1	39 ± 6	246 ± 14
	BAY 1021189	100	13 ± 2	128 ± 7	12 ± 2	39 ± 5	221 ± 19
	BAY 1021189	250	15 ± 1	119 ± 10	14 ± 1	34 ± 7	215 ± 26
	BAY 1021189	500	15 ± 3	124 ± 13	14 ± 2	36 ± 11	215 ± 8
	BAY 1021189	1000	15 ± 3	120 ± 15	14 ± 3	35 ± 3	229 ± 25
	BAY 1021189	2500 P	13 ± 1	118 ± 6	17 ± 1	29 ± 6	238 ± 19
	BAY 1021189	5000 P	11 ± 2	117 ± 10	17 ± 2	32 ± 8	228 ± 19
	2-AA	2.5	164 ± 5	1247 ± 79	159 ± 24	903 ± 110	
	2-AA	10					846 ± 39
	BP	2.5		549 ± 150		218 ± 68	
	Cyclophosphamide	400	552 ± 20				
Pre-Incubation	DMSO	0	18 ± 2	129 ± 11	19 ± 2	43 ± 2	267 ± 6
	PB	0	17 ± 2	128 ± 6	17 ± 1	42 ± 2	262 ± 31
	BAY 1021189	100	16 ± 2	126 ± 16	21 ± 3	41 ± 2	287 ± 6
	BAY 1021189	250	16 ± 3	128 ± 9	20 ± 3	39 ± 2	284 ± 27
	BAY 1021189	500	17 ± 1	121 ± 9	22 ± 2	38 ± 1	267 ± 24
	BAY 1021189	1000	16 ± 2	122 ± 13	19 ± 1	34 ± 2	257 ± 16
	BAY 1021189	2500 P	14 ± 2	129 ± 9	22 ± 2	37 ± 7	268 ± 21
	BAY 1021189	5000 P	13 ± 1	113 ± 5	21 ± 3	35 ± 6	257 ± 14
	2-AA	2.5	128 ± 9	352 ± 28		435 ± 39	
	2-AA	5			61± 10		
	2-AA	10					517 ± 10
	BP	2.5				171 ± 10	
	DMNA	5		1461 ± 110			
	Cyclophosphamide	400	763 ± 30				

P – Precipitation; DMSO = Dimethyl sulfoxide; PB = Phosphate Buffer; 2-AA = Antracene-2-amine; BP = Benzo[a]pyrene; DMNA = N-Nitrosodimethylamine

2.6.7.8.2 マウスリンフォーマ TK 試験

Test Article: Vericiguat

Test for Induction of: Gene mutations and chromosome aberrations
Cells: Mouse lymphoma L5178Y
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced male rat liver S9
Treatment: Assay 1: Pulse treatment for 3 hours without or with S9 mix
Assay 2: Continuous treatment for 24 hours without S9 mix; Pulse treatment for 3 hours with S9 mix

No. of Independent Assays: 2
No. of Replicate Cultures: 2
No. of Cells Analyzed/Culture: Totally approximately 8 x 10^5 cells (in four replicates)
Vehicle for Positive Controls: DMSO for 3-Methylcholanthrene and 4-Nitroquinoline 1-oxide
Vehicle for Test Article: DMSO

Report No.: A52063
Location in CTD: 4.2.3.3.1.2
GLP Compliance: Yes
Date of Treatment: [redacted]20[redacted]

Rationale for Selection of Concentrations: Solubility limit

Cytotoxic Effects: Yes. In pre-experiments for cytotoxicity with pulse (3 hours) and continuous (24 hours) treatment, vericiguat dissolved in DMSO, was tested up to a maximum concentration of 200 µg/mL. Cytotoxic effects of vericiguat could only be observed in the experiments with metabolic activation starting at 100 µg/mL. In the experiments without metabolic activation, no cytotoxicity occurred after 3 hours pulse treatment (assay 1) or after 24 hours continuous treatment (assay 2) at any test concentration.

Genotoxic Effects*: None

*Positive controls induced significant increases in mutant frequency indicating the sensitivity of the test system.

Geonotoxicity (Mouse lymphoma Tk assay) **Report No.:** A52063

Metabolic Activation	Test article	Treatment period	Concentration (µg/mL)	Relative total growth [a] (%)	Mutant colonies per 10^6 cells [a]
Without S9 mix (Assay 1)	Dimethyl sulfoxide	3 hours	1 % (v/v)	100	154
	BAY 1021189		10	91	182
	BAY 1021189		25	92	150
	BAY 1021189		50	83	152
	BAY 1021189		100 [p]	73	166
	BAY 1021189		200 [p]	82	151
	4-Nitroquinoline 1-oxide		0.1	75	704
With S9 mix (Assay 1)	Dimethyl sulfoxide	3 hours	1 % (v/v)	100	131
	BAY 1021189		10	89	146
	BAY 1021189		25	83	144
	BAY 1021189		50	87	122
	BAY 1021189		100 [p]	56	120
	BAY 1021189		200 [p]	48	152
	3-Methylcholanthrene		2	69	743
Without S9 mix (Assay 2)	Dimethyl sulfoxide	24 hours	1 % (v/v)	100	93
	BAY 1021189		10	105	108
	BAY 1021189		25	106	91
	BAY 1021189		50	105	110
	BAY 1021189		100 [p]	100	77
	4-Nitroquinoline 1-oxide		0.025	95	374
With S9 mix (Assay 2)	Dimethyl sulfoxide	3 hours	1 % (v/v)	100	122
	BAY 1021189		10	113	102
	BAY 1021189		25	105	125
	BAY 1021189		50	104	93
	BAY 1021189		100 [p]	75	85
	3-Methylcholanthrene		2	92	585

[a] Mean value of 2 replicate cultures
[p] precipitates

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

2.6.7.9.1 雄マウス腹腔内投与骨髄小核試験

Test Article: Vericiguat

Test for Induction of: Bone marrow micronuclei
Species/Strain/Sex: Mice/NMRI/male
Age: 9 to 10 weeks
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCE)
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000 PCE and 1000 NCE

Treatment Schedule: 2 times, 24 hr interval
Sampling Time: 24 hrs after 2nd administration
Method of Administration: Intraperitoneal
Vehicle/Formulation: 0.5% Tylose solution

Report No.: A51623
Location in CTD: 4.2.3.3.2.1
GLP Compliance: Yes
Date of Dosing: [redacted]
20[redacted]

Dose Selection: The highest dose was selected based on dose finding experiments showing lethality after IP administration of vericiguat at doses ≥ 250 mg/kg vericiguat in aqueous Tylose solution (0.5%). Treatment of 2 male and 2 female mice with 125 mg/kg vericiguat in 0.5% Tylose on 2 consecutive days resulted in all animals showing slight hypoactivity/reduced general condition ("apathy"); therefore 125 mg/kg was chosen as the highest dose for the subsequent pivotal study.

Toxic/Cytotoxic Effects: Slight hypoactivity/reduced general condition ("apathy") at 125 mg/kg.

Genotoxic Effects*: None
*The positive control compound gave the expected statistically significant ($p<0.05$) increase in micronucleated polychromatic erythrocyte cell counts as compared to the negative control 24 hours after administration, thus demonstrating the ability of the test system to detect cytogenic damage.

Evidence of Exposure: Clinical signs of toxicity

Test Article	Dose [mg/kg]	No. of Evaluated PCE	Mean PCE/NCE [%]			Mean MN/NCE [%]			Mean MN/PCE [%]		
Vehicle	0	2000	0.82	±	0.11	1.00	±	1.00	1.20	±	0.67
Vericiguat	31.25	2000	0.78	±	0.13	0.80	±	0.84	0.90	±	0.65
Vericiguat	62.5	2000	0.74	±	0.24	0.60	±	0.55	1.00	±	0.50
Vericiguat	125	2000	0.65	±	0.19	2.20	±	1.10	2.70	±	1.30
Cyclophosphamide	30	2000	0.91	±	0.09	2.00	±	1.22	19.60*	±	1.82

* $p< 0.05$ in one-sided t-test. Treatment effects of the test item were investigated in an analysis of variance at the 5% level.

2.6.7.9.2 雄ラット小核試験（ラット 26 週間反復投与毒性試験内実施）

Test Article: Vericiguat

Test for Induction of: Micronuclei (peripheral blood)
Species/Strain/Sex: Rat/HsdRCCHan:Wist
Age: Males – 7 weeks
Cells Evaluated: Polychromatic erythrocytes (PCE)
No. of Cells Analyzed/Animal: For each sample, approximately 20,000 reticulocytes (RET) were analyzed to determine the frequency of micronucleated reticulocytes (% MN-RET). As an indication of toxicity, the fraction of RET in the blood sample (% RET) was calculated.

Treatment Schedule: Samples collected
Sampling Day: Day 140 (after 139 doses)
Method of Administration: Oral (gavage)
Vehicle/Formulation: Ethanol/Kolliphor HS®15/Tap water, (10/40/50 v/v/v)

Report No.: PH-37899
Location in CTD: 4.2.3.2.6
GLP Compliance: Yes
Date Dosing Initiated: [redacted]-20[redacted]
Date of Sampling: [redacted]-20[redacted]

Dose Selection: Doses for the 26-week study were selected based on the 13-week study in which vericiguat doses of 0, 3, 10 and 30 mg/kg were generally well tolerated.
Toxic/Cytotoxic Effects: As an indication of toxicity, the fraction of reticulocytes in the blood sample was calculated.
Genotoxic Effects*: None
*A test was considered positive if there was a relevant and significant increase in the number of reticulocytes showing micronuclei in comparison to the negative control.
Evidence of Exposure: Clinical signs of exposure, pharmacological-mediated effects, Day 149 toxicokinetic analysis (main study)

Test Article	Dose [mg/kg]	Mean MN-RET [%]			Mean Frequency of RET [%]		
Negative Control	0	0.12	±	0.03	1.10	±	0.54
Vericiguat	3	0.09	±	0.02	0.79	±	0.12
Vericiguat	10	0.12	±	0.04	0.88	±	0.17
Vericiguat	30	0.11	±	0.02	1.03	±	0.22

2.6.7.10 がん原性試験

2.6.7.10.1 マウス 2 年間混餌投与がん原性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Mouse/Crl:CD1(ICR)
Initial Age: 7 to 8 weeks
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]

Duration of Dosing: 95 weeks (Females)/106 Weeks (Males)
Method of Administration: Oral (diet)
Vehicle/Formulation: 5LF2 EU Rodent Diet (expanded, ground fine)
Treatment of Controls: 5LF2 EU Rodent Diet (expanded, ground fine)

Report No.: R-13312
Location in CTD: 4.2.3.4.1.1
GLP Compliance: Yes

Basis for High Dose Selection: The high dose provided total plasma levels anticipated to exceed 25-fold the human AUC at the maximum intended clinical dose.
Special Features: Females were sacrificed early from Day 645 as the survival of females in the control group reached the specified sacrifice criteria of 15 animals, as outlined by the Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research.

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of TK Animals	F:42	M:42	F:42	M:42	F:42	M:42	F:42	M:42	F:42	M:42
Toxicokinetics (Vericiguat Exposure) – Study Day 359										
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA [a]	NA [a]	17600	10800	59700	31400	180000	117000	522000	271000
C_{max} (µg/L)	NA [a]	NA [a]	962	672	3320	1560	9170	7130	27500	14100
T_{max} (hr)	NA [a]	NA [a]	24.0	24.0	10.0	5.00	10.0	24.0	24.0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of TK Animals	F:42	M:42	F:42	M:42	F:42	M:42	F:42	M:42	F:42	M:42
Toxicokinetics (M1 Exposure) – Study Day 359										
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μg•hr/L)	NA	NA	546	317	2170	889	5590	2670	22700	8020
C_{max} (μg/L)	NA	NA	47.9	20.1	158	53.9	297	162	1170	468
T_{max} (hr)	NA	NA	24.0	24.0	10.0	0	10.0	0	10.0	15.0
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Died/Sacrificed Moribund (Main Study)	45	25	37	25	31	36	23	33	29	32
Terminal Sacrifice	15	35	23	35	29	24	37	27	31	28
Survival (%)	25	58	38	58	48	40	63[b]	45	52	47
Body Weight Change (g)										
Days 1 to 92	-	7.5	-	7.6	-	8.0	-	8.2	-	8.7***
Days 92 to 197	3.3	-	4.1	-	3.0	-	2.9	-	2.2*	-
Food Consumption (%) [c]										
Days 218 to 365	3.8 g/an/day	-	2.6	-	2.6	-	7.9	-	13.2*	
Days 386 to 729	-	4.3 g/an/day	-	2.3	-	-2.3	-	4.7	-	7.0**

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Water Consumption (%) [c]										
Day 1 to 618	5.0 g/an/day	-	12.0	-	12.0	-	[32.0]**	-	[32.0]**	
Day 1 to 702	-	5.7 g/an/day	-	8.8	-	1.8	-	[14.0]**	-	[26.3]***
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palpable Masses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights										
Liver [d]										
Absolute Organ Weight (%) [c]	1.639 g	2.008 g	8	15	11	6	[20]	[30]*	[26]**	[34]**
Organ to Body Weight (%) [c]	4.4125%	4.4885%	0	15	2	9	11	[27]*	[25]***	[31]**
Organ to Brain Weight (%) [c]	312.2976 %	394.3569 %	9	16	12	8	[25]*	[30]*	[33]***	[35]**

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Macroscopic Observations										
Liver [d]										
Large	3	2	3	1	2	4	7	2	5	7
Ovaries		NA		NA		NA		NA		NA
Cysts [h]	36	NA	31	NA	40	NA	39	NA	51	NA
Histopathology										
Neoplastic Findings – Test Article-Related	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neoplastic Findings – Incidental/Spontaneous										
Abdominal Cavity (No. Examined)	2	0	1	1	1	1	1	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Sarcoma NOS	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Adipose, Brown (No. Examined)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adipose, Brown, Interscapular (No. Examined)	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Adipose, Uterine Broad Ligament (No. Examined)	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	0	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	0	NA
Adipose, White (No. Examined)	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Adrenal Gland (No. Examined)	60	59	60	60	60	59	60	56	60	58
B-Benign pheochromocytoma	0	0	1	0	0	1	0	2	0	0
B-Cortical adenoma	0	5	0	1	0	2	0	0	0	3
B-Subcapsular cell adenoma	0	6	2	9	0	9	0	6	1	5
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	4	0	2	1	3	0	2	1
M-Subcapsular cell carcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Aorta (No. Examined)	60	60	60	60	59	60	59	60	57	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	3	1	3	1	2	1	2	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Brain (No. Examined)	60	60	60	60	60	59	59	60	60	60
B-Benign granular cell meningioma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	2	0	0	1	2	0	1	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Cecum (No. Examined)	57	59	56	58	55	55	59	59	60	55
B-Adenoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F-Hemolymphoreticular tumor	2	1	1	0	2	0	1	0	0	0
Colon (No. Examined)	57	60	58	60	56	58	59	60	60	56
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	2	1	1	0	1	0
Connective Tissue (No. Examined)	2	2	2	1	1	0	1	0	2	0
F-Hemolymphoreticular tumor	1	0	2	0	1	0	0	0	0	0
M-Fibrosarcoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Sarcoma NOS	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Duodenum (No. Examined)	56	58	57	57	56	55	58	58	59	55
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
Ear (No. Examined)	2	4	2	5	1	5	4	4	3	0
B-Squamous cell papilloma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Epididymis (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
B-Leydig cell adenoma	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	1	NA	0	NA	2	NA	2	NA	1
I-Locally invasive tumor	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Esophagus (No. Examined)	60	60	59	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	2	0	0	1	1	0	1	2
Eye (No. Examined)	59	60	60	59	56	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Eyelid (No. Examined)	60	60	60	59	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0
Femur+Marrow (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Hemangioma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	3	1	9	1	6	5	4	2	3	5
N-Metastatic tumor	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
Gallbladder (No. Examined)	58	58	57	58	56	53	57	60	57	55
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	2	0	0	1	1	0
GALT/Peyers Patch (No. Examined)	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemolymphoreticular System (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Histiocytic sarcoma	2	2	2	0	3	2	3	1	1	2
M-Leukemia NOS	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
M-Lymphocytic leukemia	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
M-Malignant lymphoma-lymphoblastic	0	0	1	0	1	0	1	1	0	2
M-Malignant lymphoma-lymphocytic	7	2	7	2	9	4	6	4	4	1
M-Malignant lymphoma-pleomorphic	4	2	0	2	1	0	3	1	3	2
Harderian Gland (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma	2	9	3	10	10	9	0	12	0	5
F-Hemolymphoreticular tumor	3	0	7	1	4	1	2	1	4	1
M-Adenocarcinoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Heart (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	5	1	5	3	7	2	2	4
Ileum (No. Examined)	57	57	57	57	56	56	59	58	58	54
F-Hemolymphoreticular tumor	1	0	1	0	1	0	3	1	2	0
Jejunum (No. Examined)	55	59	58	58	57	55	58	59	59	54
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kidney (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma	0	1	0	1	0	0	0	3	1	0
F-Hemolymphoreticular tumor	5	2	8	1	9	4	6	3	2	3
M-Carcinoma	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
M-Renal mesenchymal tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Lacrimal Gland (No. Examined)	58	60	59	60	56	60	59	60	59	58
F-Hemolymphoreticular tumor	2	1	9	0	7	4	7	3	3	1
Larynx (No. Examined)	60	60	59	60	60	59	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	3	0	0	2	2	2	1	1
Liver (No. Examined)	59	60	60	60	59	60	60	60	60	60
B-Hemangioma	1	2	0	0	0	0	0	0	0	2
B-Hepatocellular adenoma	0	5	0	10	0	10	1	5	0	7
F-Hemolymphoreticular tumor	7	3	10	1	6	4	10	2	6	4
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Hemangiosarcoma	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
M-Hepatocellular carcinoma	0	3	0	5	1	7	0	4	0	1
N-Metastatic tumor	1	1	0	2	0	0	0	0	0	1
Lung (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Bronchiolo-alveolar adenoma	1	7	3	10	5	10	4	1	0	3
F-Hemolymphoreticular tumor	3	3	6	1	9	4	8	4	3	3
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M-Bronchiolo-alveolar carcinoma	4	9	5	3	4	10	3	5	3	8

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
N-Metastatic tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph Node (No. Examined)	0	0	0	1	2	2	1	0	3	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	1	2	2	1	0	3	0
Lymph Node, Axillary (No. Examined)	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Bronchial (No. Examined)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Iliac (No. Examined)	0	0	1	0	0	2	0	1	0	1
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
Lymph Node, Inguinal (No. Examined)	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Mandibular (No. Examined)	60	59	60	59	60	60	60	60	60	59
F-Hemolymphoreticular tumor	4	2	8	2	6	4	5	3	5	2
Lymph Node, Mediastinal (No. Examined)	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Mesenteric (No. Examined)	57	58	55	58	58	60	59	57	59	58
F-Hemolymphoreticular tumor	5	3	7	3	6	4	6	2	4	3
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Lymph Node, Renal (No. Examined)	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Mammary Gland (No. Examined)	60	33	59	19	58	17	58	19	58	21
F-Hemolymphoreticular tumor	3	0	4	0	3	0	2	0	1	0
M-Adenocarcinoma	2	0	2	0	2	0	4	0	0	0
M-Adenosquamous carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mandibular Salivary Gland (No. Examined)	59	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	5	1	6	0	2	2	4	3	0	1
Mesentery (No. Examined)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Muscle, Biceps Femoris (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	4	0	2	3	1	0	1	1
Muscle, Diaphragm (No. Examined)	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nasal Cavity (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	59	60	60
B-Adenoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
B-Fibroma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	1	2	2	2	1	0	0
Nerve, Optic (No. Examined)	60	58	59	59	57	57	60	59	58	56
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Nerve, Sciatic (No. Examined)	60	58	58	60	59	59	60	59	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	1	1	3	0	2	2	2	1	1	1
Oral Cavity (No. Examined)	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
B-Squamos cell papilloma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ovary (No. Examined)	60	NA	59	NA	59	NA	60	NA	60	NA
B-Benign granulosa cell tumor	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA	2	NA
B-Benign luteoma	0	NA	1	NA	3	NA	0	NA	2	NA
B-Benign mixed sex cord stromal tumor	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
B-Cystadenoma	0	NA	1	NA	2	NA	2	NA	1	NA
B-Leiomyoma	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
B-Tubulostromal adenoma	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	2	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	6	NA	5	NA	4	NA	2	NA
I-Locally invasive tumor	2	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Oviduct (No. Examined)	58	NA	60	NA	60	NA	60	NA	58	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	4	NA	3	NA	6	NA	2	NA
I-Locally invasive tumor	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
Pancreas (No. Examined)	59	60	60	60	58	60	60	60	59	60
B-Islet cell adenoma	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0
F-Hemolymphoreticular tumor	2	2	6	1	5	3	5	2	3	2
I-Locally invasive tumor	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Parathyroid (No. Examined)	53	57	55	56	57	49	56	55	57	58
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Parotid Salivary Gland (No. Examined)	60	60	60	60	60	59	60	60	60	59
F-Hemolymphoreticular tumor	3	0	5	0	3	1	2	3	1	2
Pituitary (No. Examined)	57	60	57	59	58	58	58	58	54	58
B-Adenoma	3	1	4	0	1	3	3	4	3	3
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
M-Carcinoma	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Preputial/Clitoral Gland (No. Examined)	58	60	57	60	59	60	58	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	3	0	2	3	3	2	1	2

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Prostate (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
B-Adenoma	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	1	NA	1	NA	4	NA	4	NA	2
M-Adenocarcinoma	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
Rectum (No. Examined)	57	60	58	60	56	60	59	59	60	58
F-Hemolymphoreticular tumor	1	0	4	0	1	0	7	1	2	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Seminal Vesicle (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	1	NA	0	NA	1	NA	2	NA	1
Skin/Subcutis (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Benign basal cell tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
B-Benign hair follicle tumor	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B-Keratoacanthoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Squamous cell papilloma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	1	2	5	0	3	2	3	2	1	2
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Fibrosarcoma	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Fibrosarcoma, pleiomorphic	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
M-Hemangiosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Sarcoma NOS	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Spinal Cord, Cervical (No. Examined)	60	60	60	59	60	60	59	60	60	59
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
Spinal Cord, Lumber (No. Examined)	59	60	59	59	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Spinal Cord, Thoracic (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
Spleen (No. Examined)	59	60	60	60	59	60	60	60	60	59
B-Hemangioma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	10	2	11	4	11	6	11	6	6	4
I-Locally invasive tumor	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Hemangiosarcoma	1	1	0	2	2	1	1	1	0	2
N-Metastatic tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Sternum+Marrow (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	3	2	9	1	7	6	4	3	3	5
N-Metastatic tumor	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Stomach (No. Examined)	59	60	60	60	60	60	60	60	60	59
B-Benign neuroendocrine cell tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
B-Squamous cell papilloma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
F-Hemolymphoreticular tumor	3	3	7	0	6	3	4	2	2	1
I-Locally invasive tumor	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Metastatic tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Sublingual Salivary Gland (No. Examined)	59	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	2	0	1	0	2	1	2	0	1	0
Tail (No. Examined)	15	5	5	8	9	1	3	3	4	6
B-Fibroma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Hemangioma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Testis (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
B-Hemangioma	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1
B-Leydig cell adenoma	NA	4	NA	3	NA	6	NA	7	NA	2
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	1	NA	0	NA	1	NA	1	NA	0
M-Leydig cell carcinoma	NA	0	NA	0	NA	1	NA	1	NA	0
Thoracic Cavity (No. Examined)	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
M-Malignant mesothelioma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thymus (No. Examined)	54	53	58	52	57	54	56	48	56	52
B-Benign thyoma	1	0	0	1	4	0	3	1	2	1
F-Hemolymphoreticular tumor	8	2	9	3	12	4	10	1	4	4
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Thyroid (No. Examined)	60	60	59	60	59	60	60	60	60	60
B-Follicular cell adenoma	1	2	0	0	0	0	0	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	1	1	2	0	0	2	1	0	1	1
Tongue (No. Examined)	60	60	60	59	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
Trachea (No. Examined)	60	59	60	59	60	59	60	59	59	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	3	0	1	3	2	2	0	3
Urinary Bladder (No. Examined)	58	60	58	60	56	59	60	60	60	59
B-Mesenchymal proliferative lesion	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	3	1	7	0	5	1	6	2	2	1
M-Carcinoma, transitional cell	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Uterus (No. Examined)	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA
B-Hemangioma	1	NA	1	NA	0	NA	4	NA	0	NA

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
B-Leiomyoma	1	NA	5	NA	2	NA	3	NA	1	NA
B-Polyp, endometrial stromal	1	NA	8	NA	8	NA	3	NA	5	NA
B-Polyp, glandular	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	1	NA	5	NA	6	NA	5	NA	3	NA
M-Hemangiosarcoma	1	NA	0	NA	0	NA	1	NA	2	NA
M-Histiocytic sarcoma	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA
M-Leiomyosarcoma	1	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
M-Stromal sarcoma	1	NA	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA
Vagina (No. Examined)	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA
B-Hemangioma	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	2	NA	0	NA	1	NA	0	NA
M-Leiomyosarcoma	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
Non-Neoplastic Findings/Primarily Related to Exaggerated Pharmacology										
Gallbladder (No. Examined)	58	58	57	58	56	53	57	60	57	55
Choleliths										
Minimal	0	10	1	9	1	3	2	8	[4]	[13]
Slight	0	0	0	0	0	0	0	0	[2]	[2]
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	[4]	[1]

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Hyalinosis										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	[1]	[2]
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0	[1]	[1]
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	[3]	[1]
Harderian Gland (No. Examined) [e]	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Degeneration/inflammation										
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	[1]	[12]
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0	[3]	[8]
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	[9]	[6]
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	[45]	[15]
Liver (No. Examined)	59	60	60	60	59	60	60	60	60	60
Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular [f]										
Minimal	0	3	0	6	1	4	2	[15]	[17]	[32]
Slight	1	1	0	0	0	0	2	[2]	[7]	[5]
Moderate	0	0	0	2	0	0	0	[2]	0	[2]
Mammary Gland (No. Examined)	60	33	59	19	58	17	58	19	58	21
Dilation/Secretion										
Minimal	6	0	10	0	13	0	[19]	0	[21]	0

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Slight	3	0	2	0	1	0	[5]	0	[3]	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	[1]	0	[1]	0
Mesenteric Lymph Nodes (No. Examined) [g]	57	58	55	58	58	60	59	57	59	58
Plasma cells, increased incidence										
Minimal	1	1	1	0	0	1	[7]	[17]	[15]	[17]
Non-Neoplastic Findings Related to Age [h]										
Lacrimal gland (No. Examined)	58	-	59	-	56	-	59	-	59	-
Acinar cell atrophy										
Minimal	6	-	2	-	6	-	9	-	13	-
Slight	4	-	3	-	3	-	1	-	3	-
Moderate	2	-	1	-	1	-	1	-	6	-
Marked	1	-	2	-	2	-	2	-	0	-
Liver (No. Examined)	59	-	60	-	59	-	60	-	60	-
Infiltrate, inflammatory cell										
Minimal	26	-	35	-	26	-	26	-	33	-
Slight	3	-	2	-	3	-	9	-	9	-
Moderate	0	-	1	-	0	-	3	-	5	-

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Necrosis, focal										
Minimal	1	-	0	-	1	-	5	-	8	-
Slight	2	-	1	-	1	-	5	-	1	-
Pigment										
Minimal	2	-	3	-	2	-	9	-	10	-
Slight	0	-	0	-	1	-	0	-	1	-
Ovaries (No. Examined)	60	NA	59	NA	59	NA	60	NA	60	NA
Cysts	44	NA	36	NA	40	NA	49	NA	53	NA
Hyperplasia, cystopapillary										
Minimal	1	NA	1	NA	0	NA	3	NA	7	NA
Slight	1	NA	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hyperplasia, luteal cells, diffuse										
Minimal	1	NA	0	NA	0	NA	4	NA	3	NA
Slight	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Moderate	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	0	NA

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

	0 (Control)		Vericiguat Dose Groups							
Nominal Daily Dose (mg/kg)	0	0	6	5	20	15	60	50	250	150
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Hyperplasia, sex cord stromal, mixed, diffuse										
Slight	1	NA	0	NA	1	NA	0	NA	4	NA
Moderate	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
Hyperplasia, tubulostromal										
Minimal	1	NA	0	NA	0	NA	3	NA	4	NA
Slight	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA	5	NA
Moderate	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA
Pigment										
Minimal	7	NA	1	NA	5	NA	10	NA	20	NA
Slight	0	NA	0	NA	0	NA	4	NA	5	NA
Moderate	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA

Carcinogenicity (Mouse) **Report No.:** R-13312

a In 2 out of 144 samples low concentrations of vericiguat were found. The respective samples were reanalyzed according to internal SOPs and the positive control was confirmed in one of the two samples. The concentration of 9.73 µg/L in this sample was much lower (more than 40-fold) than the Cmax values of the lowest dose groups. Therefore, the result of the positive control sample was regarded as not relevantly influencing the exposure evaluations.
b Adjusted for accidental deaths.
c For controls, group means are shown. For treated groups, percent difference from controls is shown.
d Organ weight and macroscopic findings in the liver were considered adaptive and non-adverse.
e The non-neoplastic findings in the Harderian gland were not associated with any ocular changes and are not relevant to humans, as higher primates and humans do not have Harderian glands.
f Centrilobular hepatocyte hypertrophy was considered to be induced by enzyme induction.
g Non-neoplastic findings in mesenteric lymph node were considered adaptive and nonadverse.
h Higher incidences of common age-related background findings were observed in vericiguat-treated females and were likely associated with the higher proportion of longer-lived, aged animals in the treated groups at the time of necropsy. As a consequence of higher mortality rate in control females, the number of aged surviving females in vericiguat treatment groups was disproportionately higher at the time of necropsy in Week 93/94.

Statistically significant based on actual data (not on percent difference) at * p<=0.05; ** p<=0.01; *** p<=0.001
- = No noteworthy findings; No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.B = Benign; F = Hemolymphoreticular (Primary tumor or metastasis of a tumor listed under hemolymphoreticular system); g/an/day = grams per animal per day; I = Local infiltration (Local invasion originating from a primary tumor in an adjacent organ); M = Malignant; N = Metastatic; NA = Not Applicable; NOS = Not Otherwise Specified; TK = Toxicokinetic; an = animal

2.6.7.10.2 ラット2年間経口投与がん原性試験

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Rat/RccHan:WIST
Initial Age: 6 to 7 weeks
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]

Duration of Dosing: 104 Weeks
Method of Administration: Oral (gavage), once daily
Vehicle/Formulation: Ethanol/Kolliphor HS 15®/purified water or water for irrigation (10/40/50 v/v/v)
Treatment of Controls: Vehicle (Group 1) or Water (Group 2)

Report No.: R-13305
Location in CTD: 4.2.3.4.1.2
GLP Compliance: Yes

Basis for High-Dose Selection: 20 mg/kg/day was chosen because it was recommended by the Food and Drug Administration (FDA) based on observed clinical findings suggestive of exaggerated pharmacology associated with the test item, which included abnormal gait and agitated behavior at higher dose levels.
Special Features: None

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of TK Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Toxicokinetics (Vericiguat Exposure) – Study Day 359										
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	NA	NA	NA	16200	11300	49000	30500	148000	11700
C_{max} (µg/L)	NA	NA	NA	NA	1460	1050	4150	2760	12400	9760
T_{max} (hr)	NA	NA	NA	NA	4.00	4.00	4.00	4.00	7.00	4.00
Toxicokinetics (Vericiguat Exposure) (F+M Pooled) – Study Day 359										
	F+M		F+M		F+M		F+M		F+M	
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA		NA		13500		38600		131000	
C_{max} (µg/L)	NA		NA		1240		3380		10600	

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of TK Animals	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15	F:15	M:15
Toxicokinetics (M1 Exposure) – Study Day 359										
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	NA	NA	NA	384[a]	406[a]	2840	1770	9120	8320
C_{max} (µg/L)	NA	NA	NA	NA	71.7	102	252	178	858	747
T_{max} (hr)	NA	NA	NA	NA	7.00	4.00	7.00	4.00	4.00	2.00
Toxicokinetics (M1 Exposure) (F+M Pooled) – Study Day 359										
	F+M		F+M		F+M		F+M		F+M	
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA		NA		389[a]		2230		8600	
C_{max} (µg/L)	NA		NA		80		203		693	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Died/Sacrificed Moribund (Main Study)	21	25	24	23	20	23	23	24	25	22
Terminal Sacrifice	39	35	36	37	40	37	37	36	35	38
Survival (%)	65	58	60	62	67	62	62	60	58	63
Body Weight Change(%) [b]										
Day 1 to 29	-	122.1 g	-	-1.9	-	-0.9	-	-5.2	-	-8.4**
Day 29 to 92	-	98.7 g	-	-0.3	-	-7.9*	-	-8.3*	-	-10.4**

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Food Consumption (%) [b]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Water Consumption (%) [b]										
Day 1 to 726		30.4 g/an/day		-17.1***		2.3		[11.2]*		[15.1]**
Day 1 to 135	24.5 g/an/day		-12.2**		-0.4		[12.2]**		[17.1]***	
Day 141 to 723	27.0 g/an/day		-12.6**		1.1		[12.2]**		[16.3]***	
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palpable Masses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Pathology										
Urine Volume (ml)										
Day 171/172	10.6	16.4	19.6	19.3	15.8	16.9	15.8	18.6	15.8	[26.9]*
Day 352/353	11.7	11.9	18.0	17.8	15.3	12.6	14.8	17.0	13.4	19.8
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Macroscopic Observations										
Cecum (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Distention	2	7	1	0	6	[14]	4	[11]	[12]	[19]
Distention, gaseous	0	2	0	0	1	[3]	0	[4]	[1]	[3]
Neoplastic Findings – Test Article-Related/Not Statistically Significant [c]										
Adrenal (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Pheochromocytoma	0	4	2	2	1	4	1	6	0	[10]
Testis (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
Adenoma, Leydig cell	NA	2	NA	0	NA	1	NA	0	NA	[6]
Neoplastic Findings – Incidental/Spontaneous										
Adrenal (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma, cortical	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	2	1	0	0	1	1	1
M-Carcinoma, cortical	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Osteosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Pheochromocytoma, malignant	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Aorta (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	59	59
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	3	1	0	0	0	1	1
I-Locally invasive tumor	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
N-Metastatic tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Bone, Other (No. Examined)	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0
B-Chondroma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
M-Osteosarcoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Brain (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Tumor, granular cell	3	3	2	3	0	3	0	2	0	2
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	3	1	0	0	0	0	0
I-Locally invasive tumor	1	0	2	0	5	0	1	0	0	0
M-Astrocytoma	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
M-Glioma, mixed	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
M-Medulloblastoma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Meningioma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M-Tumor, granular cell	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0
X-Carcinoma, primary unknown	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Cecum (No. Examined)	58	57	59	59	58	59	58	59	60	58
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	0	1	0	0	0	1	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Colon (No. Examined)	60	60	58	60	59	60	59	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Connective Tissue (No. Examined)	2	3	0	3	1	1	2	0	2	1
B-Lipoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Mesothelioma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Cranial Cavity (No. Examined)	4	1	3	3	5	1	2	2	2	1
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	3	0	1	0	1	0
Duodenum (No. Examined)	60	60	58	60	59	60	60	60	60	60
B-Leiomyoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Epididymis (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
B-Osteoma	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	2	NA	1	NA	0	NA	0	NA	1
M-Mesothelioma	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Esophagus (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
I-Locally invasive tumor	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Eye (No. Examined)	59	59	59	60	59	60	60	60	59	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	0	1	0	0	0	0	1	0
M-Melanoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Femur+Marrow (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Osteoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	3	1	0	0	1	2	1
N-Metastatic tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemolymphoreticular System (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
M-Granulocytic leukemia	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Histiocytic sarcoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Lymphocytic leukemia	1	1	1	2	1	0	0	1	1	0
M-Lymphoma-lymphoblastic	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
M-Lymphoma-lymphocytic	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Harderian Gland (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	1	1	0	0	0	1	0
M-Adenocarcinoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Heart (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Paraganglioma	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	2	0	0	0	0	0	1
I-Locally invasive tumor	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
M-Schwannoma, endocardial	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
N-Metastatic tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Ileum (No. Examined)	58	58	59	59	58	60	58	59	60	59
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Jejunum (No. Examined)	59	60	59	59	59	60	60	60	60	59
B-Adenoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Kidney (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	3	1	0	0	1	1	1
M-Liposarcoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Lacrimal Gland (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0
Larynx (No. Examined)	60	60	60	60	60	59	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	0	1	1	0	0	0	0	1
Liver (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma, hepatocellular	1	0	0	1	0	0	2	0	1	1
B-Cholangioma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	3	1	0	0	2	2	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Carcinoma, hepatocellular	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
N-Metastatic tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lung (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma, bronchiolo-alveolar	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	2	1	0	0	1	2	1
I-Locally invasive tumor	0	1	0	0	0	0	1	0	2	1

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
N-Metastatic tumor	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
X-Carcinoma, metastatic, primary unknown	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Lymph Node (No. Examined)	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Axillary (No. Examined)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Iliac (No. Examined)	2	4	4	2	1	0	3	2	3	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	0	2	1	0	0	1	1	0
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Lymph Node, Mandibular (No. Examined)	60	60	59	59	58	59	60	60	59	60
B-Hemangioma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	3	1	1	0	1	2	1
Lymph Node, Mediastinal (No. Examined)	2	3	3	10	2	3	0	3	2	3
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	0	0	0	0	0	2	0
N-Metastatic tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Lymph Node, Mesenteric (No. Examined)	59	60	59	59	60	60	59	59	60	58
B-Hemangioma	0	3	0	2	0	3	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	3	1	1	1	0	0	1	2	1
Lymph Node, Popliteal (No. Examined)	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Lymph Node, Renal (No. Examined)	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mammary Gland (No. Examined)	56	31	60	22	59	33	58	29	56	25
B-Adenoma	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0
B-Fibroadenoma	7	0	11	0	9	0	9	0	6	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
M-Adenocarcinoma	3	0	2	0	1	0	2	0	0	0
M-Adenocarcinoma arising in fibroadenoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Mandibular Salivary Gland (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
M-Adenocarcinoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Muscle, Biceps femoris (No. Examined)	60	60	59	60	60	60	60	60	60	60
B-Hemangioma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Muscle, Other (No. Examined)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
M-Sarcoma, NOS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nasal Cavity (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	59
B-Chondroma	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	0	1	1	0	0	0	1	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
N-Metastatic tumor	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Nerve, Sciatic (No. Examined)	59	59	58	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Ovary (No. Examined)	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA
B-Adenoma, tubulostromal	0	NA	0	NA	1	NA	2	NA	0	NA
B-Thecoma	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA
B-Cystadenoma	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
B-Luteoma	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA
B-Tumor, granulosa cell	2	NA	0	NA	4	NA	3	NA	5	NA
B-Tumor, sex cord stromal, mixed	1	NA	2	NA	0	NA	2	NA	2	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	1	NA
I-Locally invasive tumor	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
Oviduct (No. Examined)	60	NA	60	NA	59	NA	60	NA	59	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	1	NA
Pancreas (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma, acinar cell	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
B-Adenoma, islet cell	0	4	0	3	0	4	1	0	0	3
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	1	1	0	0	0	1	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
M-Adenocarcinoma, ductal cell	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Carcinoma, islet cell	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Parathyroid (No. Examined)	52	55	52	55	53	56	52	51	56	53
B-Adenoma	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Parotid Salivary Gland (No. Examined)	59	60	60	60	60	60	59	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1
Pituitary (No. Examined)	60	60	59	60	60	59	60	60	60	59
B-Adenoma, pars distalis	25	25	37	23	26	25	27	25	26	18
B-Adenoma, pars intermedia	3	0	0	1	2	2	0	2	1	1
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	2	1	0	0	0	0	1
M-Carcinoma, pars distalis	2	0	2	0	5	0	2	0	1	0
Preputial/Clitoral Gland (No. Examined)	60	60	59	60	60	60	60	60	60	59
B-Papilloma, squamous cell	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	2	1	0	0	0	1	0
M-Carcinoma, squamous cell	0	0	0	2	0	0	1	1	1	1
Prostate (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	2	NA	3	NA	0	NA	0	NA	1

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Rectum (No. Examined)	60	60	59	60	60	60	60	60	60	60
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Seminal Vesicle (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	59	NA	60	NA	60
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	1	NA	1	NA	0	NA	0	NA	1
Skin/Subcutis (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	59	60	60
B-Dermal fibroma	0	0	0	1	1	0	0	1	0	2
B-Fibroma	1	2	1	1	0	1	0	2	0	0
B-Keratoacanthoma	0	3	0	1	0	3	0	1	0	2
B-Lipoma	0	1	1	1	0	0	0	1	0	2
B-Papilloma, squamous cell	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
B-Tumor, hair follicle	0	2	0	1	1	4	0	3	0	1
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	3	0	0	0	0	1	1
I-Locally invasive tumor	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
M-Basal cell tumor	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
M-Carcinoma, squamous cell	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
M-Fibrosarcoma	2	1	1	1	0	1	0	0	1	1
M-Sarcoma NOS	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Schwannoma	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Spinal Cord (No. Examined)	60	60	60	60	59	60	60	60	60	60
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Spleen (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	3	1	0	0	2	2	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Sternum+Marrow (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	3	1	0	0	2	1	1
N-Metastatic tumor	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Stomach (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Papilloma, squamous cell	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	1	0	0	0	0	1	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0
Sublingual Salivary Gland (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
B-Adenoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Testis (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
B-Adenoma, Leydig cell	NA	2	NA	0	NA	1	NA	0	NA	6
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
M-Mesothelioma	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0
Thoracic Cavity (No. Examined)	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M-Schwannoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Thymus (No. Examined)	56	54	57	58	56	58	58	56	57	59
B-Thyoma	8	3	10	4	6	4	10	2	3	4
F-Hemolymphoreticular tumor	0	2	1	2	1	0	0	1	1	1
I-Locally invasive tumor	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
M-Thyoma	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
Thyroid (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	59
B-Adenoma, C-cell	6	5	9	11	5	6	5	6	6	6
B-Adenoma, follicular cell	2	3	1	6	4	4	3	2	1	3
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	2	0	0	0	0	1	1
M-Carcinoma, C-cell	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
M-Carcinoma, follicular cell	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Trachea (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
Ureter (No. Examined)	59	57	59	59	60	59	60	60	60	58
F-Hemolymphoreticular tumor	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Urinary Bladder (No. Examined)	58	59	59	60	59	60	60	60	59	60
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	1	2	0	0	0	1	1	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Uterus (No. Examined)	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA
B-Adenoma	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA
B-Granular cell tumor	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
B-Polyp, endometrial stromal	10	NA	5	NA	10	NA	9	NA	15	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	1	NA
I-Locally invasive tumor	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
M-Adenocarcinoma	3	NA	0	NA	1	NA	2	NA	3	NA
M-Carcinoma	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	1	NA
M-Carcinoma, squamous cell	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0	NA
M-Sarcoma, endometrial stromal	0	NA	0	NA	0	NA	2	NA	1	NA
M-Schwannoma	1	NA	1	NA	3	NA	2	NA	0	NA

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Vagina (No. Examined)	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA
F-Hemolymphoreticular tumor	0	NA	1	NA	1	NA	0	NA	1	NA
M-Sarcoma, stromal	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA
M-Schwannoma	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0	NA
Vas Deferens (No. Examined)	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
F-Hemolymphoreticular tumor	NA	0	NA	1	NA	0	NA	0	NA	0
Zymbal Gland (No. Examined)	54	59	59	58	58	56	57	57	57	56
B-Adenoma, sebaceous cell	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
B-Papilloma, squamous cell	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
F-Hemolymphoreticular tumor	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1
I-Locally invasive tumor	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
M-Carcinoma	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Non-Neoplastic Findings/Related to Exaggerated Pharmacology										
Adrenal (No. Examined)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Hyperplasia, medullary, focal [c]										
Minimal	1	3	1	5	0	3	0	5	[5]	[12]
Slight	1	4	0	1	1	4	0	2	[5]	[10]
Moderate	1	2	0	2	1	1	0	0	[1]	[8]

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

	0 (Vehicle Control)		0 (Water Control)		Vericiguat Dose Groups					
Daily Dose (mg/kg)	0		0		2		6		20	
No. of Animals at Study Start	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60	F:60	M:60
Marked	0	0	1	0	0	0	0	1	[1]	[2]
Medullary change [c,d]										
Minimal	0	0	1	1	0	2	1	3	3	[8]
Cecum (No. Examined)	58	57	59	59	58	59	58	59	60	58
Dilatation										
Minimal	0	4	1	0	3	[7]	1	[9]	[5]	[8]
Slight	0	3	0	0	3	[7]	2	[5]	[4]	[10]
Testis (No. Examined)	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60	NA	60
Hyperplasia, Leydig cell, focal [c]	NA		NA		NA		NA		NA	
Minimal	NA	3	NA	2	NA	3	NA	2	NA	[3]
Mild	NA	1	NA	0	NA	0	NA	3	NA	[6]
Moderate	NA	0	NA	0	NA	0	NA	1	NA	0
Marked	NA	0	NA	0	NA	0	NA	0	NA	[1]

Carcinogenicity (Rat) **Report No.:** R-13305

a $AUC_{(0-7)}$ instead of $AUC_{(0-24)}$ for M1
b For vehicle controls, group means are shown; for water control and treated groups, percent difference from vehicle control is shown.
c The non-statistically significant numerical increases of benign pheochromocytoma and Leydig cell tumors in males at 20 mg/kg/day associated with focal medullary hyperplasia (both sexes) and focal Leydig cell hyperplasia, as well as the non-proliferative finding of medullary change, indicative of an activation of chromaffin cells, are considered related to the pharmacological mode of action of vericiguat resulting in a compensatory and recurrent activation of the renin-angiotensin-aldosterone and adrenergic system.
d Adrenal medullary change characterized by multifocal slightly enlarged, clusters of cells that showed prominent nuclei and pale eosinophilic or scantly vacuolated cytoplasm, suggesting a different distribution of epinephrine and norepinephrine storing cells and thereby, indicative of an activation of chromaffin cells.

Statistically significant based on actual data (not on percent difference) at * p<=0.05; ** p<=0.01; *** p<=0.001
- = No noteworthy findings, [ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity, B = Benign; F = Hemolymphoreticular (Primary tumor or metastasis of a tumor listed under hemolymphoreticular system); g/an/day = grams per animal per day; I = Local infiltration (Local invasion originating from a primary tumor in an adjacent organ); M = Malignant; N = Metastatic; X = Metastatic, primary unknown; NA = Not Applicable; NOS = Not Otherwise Specified; No. = Number; TK = Toxicokinetic; an = animal

2.6.7.11 生殖発生毒性試験： 重要な試験以外の試験

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral (gavage) (Solution in Ethanol/Kolliphor HS 15®/Purified water (10/40/50 v/v/v)	Once daily from GD 6 to LD 4	0, 30, 50	6F/group	**Mortality**: One female in the 30 mg/kg/day dose group was found dead on GD 10, but the cause of morbidity could not be concluded. **Clinical Observations**: At 30 and 50 mg/kg/day, maternal toxicity was evident based on salivation, raised hair, pink staining around mouth, and panting/labored respiration during gestation. Instances of hunched posture, salivation, subdued/ sluggish behavior, raised hair, and thin appearance were evident during lactation. **Body Weight:** At 50 mg/kg/day, maternal body weight losses and reduced body weight gain during gestation were noted. Improvement was observed during lactation. Similar effects were seen at 30 mg/kg/day, albeit to a lesser extent, with initial body weight losses noted during the first 2 days of dosing and lower body weight gain, compared to control, during gestation, with improvement in lactation. **Food consumption**: At 30 mg/kg/day, reduced maternal food consumption during the first 4 days of dosing. Slight improvement was observed thereafter. At 50 mg/kg/day, food consumption was reduced throughout gestation and during lactation, with significant reductions during the first week of dosing.	R-11952 (Non-GLP) 4.2.3.5.3.1

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Rat/ Crl:WI(Han)	Oral (gavage) (Solution in Ethanol/Kolliphor HS 15®/Purified water (10:40:50 v/v/v)	Once daily from GD 6 to LD 4	0, 30, 50	6F/group	**Parturition and Litter Data:** At 30 and 50 mg/kg/day, findings included fewer mean implantation sites, higher mean post implantation loss, resulting in fewer pups/litter and slightly lower viability indices. Three dead pups were noted in 50 mg/kg/day litters and two dead pups were noted in a 30 mg/kg/day litter. **Offspring Observations:** At 30 and 50 mg/kg/day, lower pup weights on PND 1 and 4 were noted, with a slightly higher percentage of male pups at 50 mg/kg/day. A distended urinary bladder was seen in two pups of two litters at 30 mg/kg/day. No milk was evident in the stomach of 25% of the pups of one litter at 50 mg/kg/day. **Conclusion**: A dose level of 30 mg/kg/day or higher was considered to induce maternal toxicity and resulted in secondary effects on litters, including higher post-implantation loss. It was recommended that a high dose level of 30 mg/kg/day be selected for the subsequent pre- and post-natal study.	R-11952 (continued)

F = Female; GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; PND = Post-natal Day

2.6.7.12 生殖発生毒性試験： 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Test Article: Vericiguat

Design Similar to ICH S5(R2) 4.1.1 Yes
Species/Strain: Rat/Wistar (Hsd Cpb: WU)
Age at Study Start: 11 to 12 weeks
Study Start Date: [redacted]

Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GDs 14 to16
Method of Administration: Oral Gavage
Dosing Volume: 10 mL/kg
Formulation/Vehicle: Ethanol/Solutol HS 15®/Tap water (10/40/50 v/v/v)

Report No.: PH-37948
Location in CTD: 4.2.3.5.1.1
GLP Compliance: Yes

Special Features: For cohabitation, high-dose females housed with untreated males, high-dose males housed with untreated females, mid-dose females housed with mid-dose males, low-dose females housed with low-dose males, control females housed with control males.

Treatment Interval (females): 2 weeks prior to mating and during mating (cohabitation), and through GD 7

Treatment Interval (males): 4 weeks prior to mating, during mating (cohabitation), and up to the day before necropsy

No-Observed-Adverse-Effect Level: 50 mg/kg/day (female and male fertility parameters and early embryonic development), 15 mg/kg/day (female and male general toxicity parameters)

Toxicokinetics: Not conducted

Fertility and Early Embryonic Developmental Toxicity Study in Rats **Report No.:** PH-37948

	Females				Males			
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50	0 (Control)	5	15	50
No. of Animals at Study Start	24	24	24	24	24	24	24	24
Noteworthy Findings								
Mortality	0	0	1 [a]	[3]	0	0	1 [b]	[1]
Physical Examination								
Piloerection	0	0	0	[22] [c]	-	-	-	-
Body Weight Gain (g)								
Premating Day 1-8	NA	NA	NA	NA	22.0	21.8	17.2	[1.6]**
Premating Day 8-15	NA	NA	NA	NA	13.5	14.7	12.7	[22.4]**
Premating Day 15-22	NA	NA	NA	NA	13.8	17.3	13.7	15.8
Premating Day 22-29	NA	NA	NA	NA	10.5	9.4	7.5	11.7
Premating Day 1-8	7.5	8.3	7.5	[2.6]*	NA	NA	NA	NA
Premating Day 8-15	2.3	5.9*	6.7**	[16.1]**	NA	NA	NA	NA
GD 0-7	28.7	28.4	29.1	29.5	NA	NA	NA	NA
GD 7-14	29.5	28.5	30.6	30.9	NA	NA	NA	NA

Fertility and Early Embryonic Developmental Toxicity Study in Rats **Report No.:** PH-37948

	Females				Males			
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50	0 (Control)	5	15	50
No. of Animals at Study Start	24	24	24	24	24	24	24	24
Food Consumption (g/day)								
Premating Week 1	NA	NA	NA	NA	25.2	24.9	23.2*	[17.8]**
Premating Week 2	NA	NA	NA	NA	24.1	24.8	25.4	[26.2]*
Premating Week 3	NA	NA	NA	NA	23.9	25.0	24.4	25.6
Premating Week 4	NA	NA	NA	NA	24.9	25.9	25.1	26.0
Premating Week 1	16.9	16.7	15.7**	[11.7]**	NA	NA	NA	NA
Premating Week 2	17.2	17.6	18.4**	[19.7]**	NA	NA	NA	NA
GD 0-7	20.7	21.4	21.6	22.7**	NA	NA	NA	NA
GD 7-14	23.6	24.4	25.2	27.1**	NA	NA	NA	NA
Water Intake (visual inspection)								
Increased	0	0	1	[13]	0	0	0	[8]
Urination								
Increased (during premating and mating)				[19]				[1]

Fertility and Early Embryonic Developmental Toxicity Study in Rats **Report No.:** PH-37948

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
No. of Females Used	24	24	24	21
No. Females Cohabited	24	24	24	21
No. Females Inseminated	24	24	23	21
No. Females with Implantations	16	21	17	20
Time to Insemination (days)				
All females included	3.1	2.9	2.6	4.1
Without remated females	2.5	2.9	2.6	3.4
Insemination Index (%)	100	100	95.8	100
Fertility Index (%)	66.7	87.5	73.9	95.2
Gestation Index (%)	100	100	100	100
No. of Estruses per Female				
Pretreatment	1.8	1.6	1.8	1.3
During Treatment	3.4	3.0	2.8	2.6
Reproductive Parameters (Mean Values)				
No. Corpora lutea	15.4	14.7	15.1	15.2
Implantations	13.6	13.9	14.5	14.1
Preimplantation loss	1.8	0.8	0.6	1.1

Fertility and Early Embryonic Developmental Toxicity Study in Rats **Report No.: PH-37948**

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
No. of Females Used	24	24	24	21
Postimplantation loss	0.9	0.7	0.8	1.3
Viable embryos	2.09	2.39	2.52	2.12
Gross Examination	-	-	-	-
Organ Weights				
Testes	-	-	-	-
Ovaries	-	-	-	-

a The death (Day22) of the 15 mg/kg/day female was related to a gavage error (perforated esophagus).
b The death (Day 34) of the 15 mg/kg/day male was considered unlikely to be related to test article since mortality occurred in 1 of 24 rats at a dose that was well tolerated in repeat-dose toxicity studies up to 26 weeks in duration.
c Piloerection noted approximately 1 hr after dose administration.

– = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
GD = Gestation Day (or post coitum); LLOQ = Lower limit of quantitation; NA = Not applicable; No. = Number
Insemination Index = No. of females insemination x 100 / No. of females paired.
Fertility Index = No. of females with implantation sites x 100 /No. of females inseminated.
Gestation Index = Gestation index on GD 14 and 16 (post coitum) [%] (e.g. % of implantations with viable embryos).

* Statistically significant compared to control = $p < 0.05$

** Statistically significant compared to control = $p < 0.01$

2.6.7.13 生殖発生毒性試験： 胚・胎児発生に関する試験

2.6.7.13.1 ラット胚・胎児発生毒性試験

Test Article: Vericiguat

Design Similar to ICH S5(R2) 4.1.3 Yes
Species/Strain: Rat/Wistar (Hsd Cpb: WU)
Age on GD 0: 12 to 16 weeks (females)
Study Start Date: [redacted]-20[redacted]
Special Features: Toxicokinetics (GD 6 and 17) from satellite groups

Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GD 21 (main groups)
Method of Administration: Oral Gavage
Dosing Volume: 10 mL/kg
Formulation/Vehicle: Ethanol/Solutol HS 15®/Tap water (10/40/50 v/v/v)

Report No.: PH-38325
Location in CTD: 4.2.3.5.2.1
GLP Compliance: Yes

Treatment Interval: GD 6 through 17 (females scheduled for cesarean-section on GD 21), GD 6 through 17 (females scheduled for TK blood collection)

No-Observed-Adverse-Effect Level: 5 mg/kg (maternal toxicity); 50 mg/kg/day (developmental toxicity)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Toxicokinetics [a]				
No. of Females for Toxicokinetics (GD 17)	4	4	4	4
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	28600	67100	240000
C_{max} (µg/L)	NA	2700	5490	17700
T_{max} (hr)	NA	7.00	3.48	5.28

Effects on Embryo-Fetal Development in Rats			**Report No.:** PH-38325	
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Total No. of Females	22	22	22	22
Noteworthy Findings				
Mortality (No. of Females)	0	0	0	1 [b]
Physical Examinations				
Excretory Products				
Feces, light-colored	0	0	0	[2]
Increased Urination	0	0	0	[6]
Absolute Body Weight Gain (g)				
GD 6-17	55.6	49.8	[48.0]*	[35.8]**
GD 0-21	135.1	133.7	129.0	119.9*
Corrected Body Weight Gain (g) GD 0-21 [c]	39.7	37.1	37.4	32.0
Food Consumption (g/animal/day)				
GD 0-3	20.7	20.6	21.2	20.1
GD 3-6	20.9	21.7	22.2	22.5
GD 6-9	20.0	16.7**	[13.9]**	[7.2]**
GD 9-12	21.7	20.6	[19.6]*	[15.6]**
GD 12-15	22.3	21.6	21.5	20.7
GD 15-18	23.8	23.3	22.9	23.2
GD 18-21	26.5	27.6	[28.5]*	[31.7]**

Effects on Embryo-Fetal Development in Rats			**Report No.:** PH-38325	
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
Total No. of Females	22	22	22	22
Water Intake (visual inspection)				
Increased				[16]
Gross Examination	-	-	-	-
Reproductive Parameters (mean values)				
No. Inseminated Females Evaluated	22	22	22	21
No. Females with Implantations	21	22	21	21
Fertility Index (%)	95.5	100	95.5	100
No. Corpora lutea	15.3	14.9	14.5	14.7
No. Implantations	14.1	14.1	13.6	14.0
Preimplantation loss	1.2	0.8	0.9	0.7
Females with Total Resorptions	0	0	0	0
% Females with Viable Fetuses (of those with implantation sites)	100	100	100	100
Postimplantation loss [d]	0.6, 0.6	0.4, 0.4	0.7, 0.7	1.1, 1.1
Dead fetuses	0	0	0	0

Effects on Embryo-Fetal Development in Rats			**Report No.:** PH-38325	
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	5	15	50
No. of Animals				
Total No. of Females	22	22	22	22
No. of Litters Evaluated	21	22	21	21
Reproductive Parameters (mean values)				
No. of fetuses	13.6	13.7	13.0	12.9
% Females	54.2	49.4	47.7	50.1
% Males	45.8	50.6	52.3	49.9
Live Fetal Weights (g)				
Females	4.89	4.83	4.81	4.65
Males	5.13	5.03	5.03	4.96
Placental Weight (g)	0.61	0.60	0.63	0.60
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined [e]	1/285	3/302	8/272	0/270
Fetal Morphology – fetal incidence (litter incidence)				
No. fetuses examined	285	302	272	270
No. fetuses with malformations / (%)	2 (0.7)	3 (1.0)	3 (1.1)	5 (1.9)
External examination	-	-	-	-
Skeletal examination	-	-	-	-
Visceral examination				
Cranially extended thymus [f]	10(7)	20(14)	21(13)	37**(16*)

Effects on Embryo-Fetal Development in Rats **Report No.:** PH-38325

a No plasma concentrations (above LLOQ) were found in the samples from the control group.
b One female in the 50 mg/kg/day dose group was found dead on GD 13. Gross pathology data included a perforated esophagus, suggesting that the animal died due to a handling error during test article administration.
c Corrected body weight gain was determined by subtracting the uterus weight on GD 21 from the body weight gain from GD 0 to 21 (main groups, only).
d Post implantation loss values are presented as females with implantations, females with viable fetuses.
e Placental findings included: double placenta, engorged placenta, or greenish/yellowish border and were considered incidental because of the lack of dose dependency and occurrence as spontaneous findings in this strain of rat.
f Cranially extended thymus (described as the thymus being localized more cranially, without any effect on size or shape) was considered of uncertain relationship to treatment and not toxicologically relevant. This finding was a common, highly variable variation in the conducting test facility. Data expressed as fetal incidence followed by (litter incidence) parenthetically.

- = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
GD = Gestation Day (post coitum); LLOQ = Lower limit of quantitation; mkd = mg/kg/day; NA = Not applicable; No. = Number
Fertility Index = No. of females with implantation sites x 100 /No. of females inseminated.
* Statistically significant compared to control = $p < 0.05$
** Statistically significant compared to control = $p < 0.01$

2.6.7.13.2 ウサギ胚・胎児発生毒性試験

Test Article: Vericiguat

Design Similar to ICH S5(R2) 4.1.3 Yes
Species/Strain: Rabbit/Crl:KBL(NZW)BR
Age on GD 0: Above 107 days (females)
Study Start Date: [redacted]-20[redacted]
Special Features: Toxicokinetics (GD 6 and 20) from satellite groups

Day of Mating: GD 0
Day of Cesarean-Section: GD 29
Method of Administration: Oral Gavage
Dosing Volume: 5 mL/kg
Formulation/Vehicle: 0.5% Tylose MH 300 (methylhydroxyethylcellulose)

Report No.: PH-38326
Location in CTD: 4.2.3.5.2.2
GLP Compliance: Yes

Treatment Interval: GD 6 through 20

No-Observed-Adverse-Effect Level: 0.75 mg/kg/day (maternal toxicity and developmental toxicity)

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	0.75	2.5	7.5
Toxicokinetics (GD 20) [a]				
No. of Females for Toxicokinetics	3	3	3	3
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	5590	24900	105000
C_{max} (µg/L)	NA	509	2180	7590
T_{max} (hr)	NA	2.00	4.00	4.82
Mortality (No. of Females)				
Found Dead	0	1 [b]	0	0
Sacrificed due to Abortion	0	0	[3] [c]	[8] [c]

Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbits			**Report No.:** PH-38326	
Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	0.75	2.5	7.5
Total No. of Females	20	20	20	20
Noteworthy Findings				
Physical Examinations (No. of affected females)				
Feces				
Light-colored	0	0	[1]	[1]
No feces	0	0	[1]	0
Reduced amount				
Day 0-5	2	2	4	1
Day 6-29	8	10	10	[14]
Soft	0	1	1	[5]
Reddish Excretion	0	0	[1]	[6]
Urine				
Discoloration, orange	1	0	[2]	[2]
Discoloration, light yellow	0	1	[2]	[3]
Absolute Body Weight Gain (g) – Females with viable fetuses				
GD 6-20	99.5	90.4	63.6	132.5
GD 0-29	321.2	318.8	287.5	393.4
Corrected Body Weight Gain (g) GD 0-29	-143.9	-135.3	-151.8	-91.4

Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbits			**Report No.:** PH-38326	
Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	0.75	2.5	7.5
Total No. of Females	20	20	20	20
Body Weight Loss – Females with Abortions			[3]	[8]
Food Consumption, Decreased – Females with Abortions			[P]	[P]
Food Consumption (g/animal/day) – Females with viable fetuses				
GD 0-3	126.4	119.2	119.8	115.9
GD 3-6	144.2	145.1	150.7	154.4
GD 6-9	137.2	145.0	149.7	113.9
GD 9-12	123.7	131.9	130.9	124.9
GD 12-15	90.5	90.1	96.4	92.1
GD 15-18	91.6	95.2	98.9	114.4
GD 18-20	94.6	92.6	99.6	130.6
GD 20-21	99.1	94.4	101.0	135.2
GD 21-24	98.5	99.0	101.5	122.3
GD 24-27	91.5	99.5	100.7	113.7
GD 27-29	99.1	109.4	104.9	127.5

Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbits			**Report No.:** PH-38326	
Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	0.75	2.5	7.5
Total No. of Females	20	20	20	20
Water Intake (visual inspection)	-	-	-	-
Gross Examination	-	-	-	-
Reproductive Parameters (mean values)				
No. Mated Females Evaluated	20	19	20	19
No. Females with Implantations	17	18	20	19
Fertility Index (%)	85.0	94.7	100	100
No. Corpora lutea	9.5	9.2	8.5	10.4
No. Implantations	8.7	8.6	8.1	9.9
Preimplantation loss	0.8	0.7	0.4	0.5
Females with Total Resorptions	0	0	0	1
Females with Abortions [c]	0	0	[3]	[8]
No. Females with Viable Fetuses (of those with implantation sites)	17	18	17	[10**]
Gestation Index (%)	100.0	100.0	[85.0]	[52.6]
Postimplantation loss [d]	0.8, 0.8	0.5, 0.5	0.6, 0.6	[2.8*, 1.9]
Dead fetuses	0	0	0	0

Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbits			**Report No.:** PH-38326	
Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	0.75	2.5	7.5
No. of Animals				
Total No. of Females	20	20	20	20
No. Females with Implantations (excludes females with abortions)	17	18	17	11
No. of live fetuses	7.9	8.1	7.4	7.8
% Females	45.3	54.8	50.4	56.9
% Males	54.7	45.2	49.6	43.1
Live Fetal Weights (g) – Litter Mean				
Females	39.83	38.67	37.54	37.86
Males	39.47	39.48	39.30	40.25
Placental Weight (g)	5.13	5.15	5.14	5.31
Placental Morphology				
No. abnormal placentas/total examined	7/134	2/145	3/126	5/78
Whitish, Punctiform Areas – fetal incidence (litter incidence)	0	0	0	[3(3)]

Effects on Embryo-Fetal Development in Rabbits **Report No.:** PH-38326

Daily dose (mg/kg)	0 (Control)	0.75	2.5	7.5
No. of Animals				
Total No. of Females	20	20	20	20
No. fetuses examined	134	145	126	78
Fetal Morphology – fetal incidence (litter incidence)				
No. fetuses with malformations / (%)	37 (27.6)	39 (26.9)	29 (23.7)	31 (39.7)
External examination	-	-	-	-
Visceral examination	-	-	-	-
Skeletal examination	-	-	-	-

a No plasma concentrations (above LLOQ) were found in the samples from the control group.
b One female in the 0.75 mg/kg/day dose group was found dead on GD 10. Gross pathology data included a perforated esophagus, suggesting that the animal died due to a gavage error.
c Due to abortions, 3 females in the 2.5 mg/kg/day dose group and 8 females in the 7.5 mg/kg/day dose group were prematurely sacrificed from GD 24 to 29.
d Post implantation loss values are presented as females with implantations, females with viable fetuses.
– = No noteworthy findings.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
[P] = Present
GD = Gestation Day (post coitum); LLOQ = Lower limit of quantitation; NA = Not applicable; No. = Number
Fertility Index = No. of females with implantation sites x 100 /No. of females inseminated.
Gestation Index = Gestation index on GD 29 [%] (e.g. % of implantations with viable embryos).
* Statistically significant compared to control = $p < 0.05$
** Statistically significant compared to control = $p < 0.01$

2.6.7.14 生殖発生毒性試験： 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function

Test Article: Vericiguat

Report No.: R-12839
Location in CTD: 4.2.3.5.3.2
GLP Compliance: Yes

Design Similar to ICH S5(R2) 4.1.2 Yes
Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han)
Age on Start of Study: 8 to 10 weeks
Study Start Date (In-life Start Date): [redacted]
Day of Mating: GD 0
Treatment Interval (F_0 generation): GD 6-through LD 21
Special Features: None

Method of Administration: Oral Gavage
Dosing Volume: 10 mL/kg
Formulation/Vehicle: Ethanol/Kolliphor HS 15®/Purified water (10/40/50 v/v/v)
Litters Culled/Not Culled: Culled to 8 pup/litter on PND 4 (4 pups/sex/litter where possible)

No-Observed-Adverse-Effect Level: 7.5 mg/kg/day for maternal toxicity and pup development, 15 mg/kg/day for maternal reproductive toxicity

Toxicokinetics: Not conducted

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	7.5	15	30
No. of Mated F_0 Females	22	22	22	22
No. of Pregnant F_0 Females	22	20	21	22
Noteworthy Findings				
F_0 Females				
Mortality	0	0	0	1 [a]
Physical Examinations				
Piloerection	-	-	[P]	[P]
Absolute Body Weight Gain (g)				
GD 6-20	100.5	100.1	[89.9*]	[89.2*]
LD 1-21	26.4	38.7***	[39.6***]	[48.3***]

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function			**Report No.:** R-12839	
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	7.5	15	30
No. of Mated F_0 Females	22	22	22	22
No. of Pregnant F_0 Females	22	20	21	22
Food Consumption (%) [b]				
GD 6-20	20.6 g/animal/day	-2.0	[-11.1]	[-15.5]
LD 1-21	48.0 g/animal/day	-3.4	[-7.5]	[-10.9]
Gross Examination (LD 22)	-	-	-	-
Mean Duration of Gestation (days)	23.3	23.1	23.0	23.3
No. of Females with Total Litter Loss	0	0	0	[1]
No. of Females with Stillborn Pups	1	0	0	[6]
Post-Implantation Loss	1.45	0.95	0.90	[1.57]
No. of Litters Evaluated	22	20	21	21
Noteworthy Findings				
F_1 Litter Data (Preweaning)				
Mean No. of Implantation Sites	11.77	11.80	10.95	11.19
Mean No. Pups Born	10.45	10.85	10.05	10.10
Mean No. Live Pups Day 1	10.27	10.75	10.00	9.40
Mean No. Live Pups Day 4 (Pre-cull)	10.27	10.75	10.00	9.20

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function **Report No.:** R-12839

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	7.5	15	30
Mean No. Live Pups Day 4 (Post-cull)	7.86	7.85	7.67	7.30
Mean No. Live Pups Day 21	7.86	7.85	7.67	7.10
No. of Total Litter Deaths	0	0	0	1
Livebirth Index (mean %)	99	100	100	[94]
PND 4 Viability Index (mean %)	100	99	100	[86]
Pup Body Weight (%) [b]				
Male				
Day 1 [c]	7.51 g	-4.3	-6.4	[-17.4***]
Day 21	50.95 g	[-14.7*]	[-18.0**]	[-23.7***]
Female				
Day 1 [c]	7.23 g	-5.0	-7.3	[-17.3***]
Day 21	49.79 g	[-14.2*]	[-16.8**]	[-24.8***]
Mean % Male Pups Day 1	49	48	48	49
Pup Clinical Observations				
Dead pup	1	1	1	[10]
Moribund pup sacrifice	0	0	0	[4]
Cannibalized	0	0	0	1
Missing	0	1	0	[7]

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function **Report No.:** R-12839

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	7.5	15	30
F_1 Generation – Landmark Development				
Pinna Unfolding - mean day of occurrence [d]	2.15	[2.30]	[2.46]	[2.68]
Incisor Eruption - mean day of occurrence	9.62	[10.22[	[10.07]	[10.08]
Eye Opening - mean day of occurrence	14.40	14.39	[14.71]	[14.69]
Surface Righting – percent positive	80.08	[69.90]	[70.63]	[53.22]
Air Righting	-	-	-	-
Pupillary Reflex	-	-	-	-
F_1 Generation – Sexual Maturation				
Balano-preputial Separation – mean PND for complete development	47	48	48	[53***]
Vaginal Opening (days)	33	[35*]	[35]	[36***]
F_1 Neurobehavioral Assessment				
F_1 Locomotor Activity				
Increased Mobile Activity/Fewer Instances of Rearing	-	-	-	[P]
Learning and Memory	-	-	-	-
Acoustic Startle	-	-	-	-
F_1 Macroscopic Observations				
No Milk in Stomach (in stillborn pups or those that died shortly after birth)	0	1	1	[13] [e]

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function **Report No.:** R-12839

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	7.5	15	30
F_1 Males (Postweaning)				
No. Evaluated Postweaning	20	20	20	20
No. Died or Sacrificed Moribund	1 [f]	0	0	0
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight Change (%) [b]				
Maturation Day 22 to 29	42.7 g	[-8.7*]	[-13.6***]	[-19.2***]
Maturation Day 36 to 43	42.9 g	-0.9	-7.7	-6.8
Maturation Day 57 to 64	28.3 g	4.6	13.4	6.0
No. of Males that Mated	19	19	20	19
No. of Fertile Males	19	19	19	19
F_1 Females (Postweaning)				
No. Evaluated Postweaning	20	20	20	20
No. Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	1 [g]
Clinical Observations	-	-	-	-
Necropsy Observations	-	-	-	-
Body Weight Change (%) [b]				
Maturation Day 22 to 29	37.8 g	[-9.8*]	[-9.5*]	[-17.7***]
Maturation Day 36 to 43	23.3 g	0.9	-4.3	3.0

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function **Report No.:** R-12839

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)	7.5	15	30
Maturation Day 57 to 64	13.7 g	-19.7	-13.1	4.4
GD 0 to 4	12.7 g	6.3	-4.7	-0.8
GD 10 to 13	12.1	-4.1	-8.3	4.1
No. of Females Mated	20	20	20	20
No. of Pregnant Females	20	20	19	20
Mean No. Corpora Lutea	13	13	13	12
Mean No. Implantation Sites	12	11	12	11
Mean % Pre-implantation Loss	6.8	11.2	5.0	6.8
F_2 Litters				
Mean No. Live Embryos	11	10	11	11
Mean No. Early Resorptions	1	1	1	0
Mean No. Late Resorptions	0	0	0	0
Mean % Post-implantation Loss	4.4	11.0	5.6	3.3

Effects on Pre- and Postnatal Development, Including Maternal Function **Report No.:** R-12839

a No mortality was observed during the gestation phase for F_0 dams. One female administered was removed from the study on LD 2, following a total litter loss on LD 1. This animal had five stillborn pups, one pup died after birth (LD 0) and the remaining pup died on LD 1.
b For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data.
c Day 1 mean adjusted for litter size.
d Mean values for pinna unfolding on LD 2 were within historical control ranges.
e The higher incidence of macroscopically reported 'no milk in stomach' in the high-dose group pups correlated to the higher incidences of stillbirth and increased pup mortality and is not considered toxicologically relevant.
f One control male was sent to necropsy after the pairing phase (Post-Pairing Day 2) due to the worsening condition of a protruding eye. This was an incidental finding and of no toxicological consequence.
g One female maternally administered 30 mg/kg/day did not show any evidence of mating; however, the animal showed an increase in body weight and a change in body shape after the pairing phase. The animal was sent to necropsy; examinations revealed the animal was pregnant, at approximately GD 15/16, with seven live embryos and two early resorptions noted in utero. This unscheduled death was due to the lack of evidence of mating; therefore, it was unrelated to test item administration.

– = No noteworthy findings.
No. = Number
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
[P] = Present
GD = Gestation Day; LD = Lactation Day; PND = Postnatal Day
* Statistically significant compared to control = $p < 0.05$; ** Statistically significant compared to control = $p < 0.01$; *** Statistically significant compared to control = $p < 0.001$

2.6.7.15　幼若動物毒性試験

2.6.7.15.1 幼若ラット 4 週間反復投与用量設定試験

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Rat/ RCCHan: Wist	Oral (gavage) Ssuspension in 0.5% Tylose	Once daily for 4 weeks (starting at PND 10)	0, 3, 10, 30	5F, 5M per group (main study); 6F, 6M in the control group & 21F, 21M in the TK satellite groups	**Mortality**: At 30 mg/kg/day, 2 males died on Day 11 or 12 and 1 additional male was sacrificed in moribund condition on Day 12 with clinical signs of decreased motility, high-stepping gait, labored breathing, poor general condition and piloerection. Due to animal welfare reasons, all 30 mg/kg/day-dosed animals were killed on Day 12. **Body Weight**: Decreased in both sexes at doses ≥10 mg/kg. At the end of the study, no difference from controls was noted in females dosed at 10 mg/kg/day. **Hematology**: A very slight, statistically significant increase in reticulocytes occurred in females at 10 mg/kg/day. **Clinical Chemistry**: A statistically significant increase in cholesterol occurred in females at 10 mg/kg/day, without histopathologic correlate. **Organ Weights (limited tissues)**: No toxicologically relevant differences in organ weights were noted. **Gross Pathology (limited tissues)**: Distention (1/5) and increased size of small intestine (2/5) occurred in males at 30 mg/kg/day.	PH-38809 (Non-GLP) 4.2.3.5.4.1

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dosing Period	Doses (mg/kg)	No. per Group	Noteworthy Findings	Report No. and CTD Location
Rat/ RCCHan:Wist	Oral (gavage) Suspension in 0.5% Tylose	Once daily for 4 weeks (starting at PND 10)	0, 3, 10, 30	5F, 5M per group (main study); 6F, 6M in the control group & 21F, 21M in the TK satellite groups	**Histopathology (limited tissues)**: Inflammation (minimal to slight) was noted in segments of large intestine (cecum, colon) and adjacent mesentery in 30 mg/kg/day-dose females and males. Prominent Paneth cells were noted predominantly in the ileum at 30 mg/kg/day. The intestinal dilation (as a mode of action of the compound) and subsequent inflammation likely represented the cause of morbidity/mortality at 30 mg/kg/day. **Toxicokinetics (Day 29)**: See table below	PH-38809 (continued)

Dose	[mg/kg]	Males 3	Males 10	Males 30 [a]	Females 3	Females 10	Females 30 [a]
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	3510	18800	-	7780	31200	-
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	1.17	1.88	-	2.59	3.12	-
C_{max}	[µg/L]	332	2000	-	721	2620	-
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	0.111	0.200	-	0.240	0.262	-
t_{max}	[h]	2.00	4.00	-	2.00	2.00	-
$C(24)/C_{max}$	[%]	14.8	7.4	-	14.3	11.5	-
R_{A3}		0.2	0.4	-	0.4	0.7	-
R_{A1}		0.4	0.9	-	0.6	1.2	-

$R_{A1}=C_{max,\ SS} / C_{max,Day\ 1.}$, $R_{A3} = AUC_{(0-24),\ SS} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1.}$

Conclusion: NOAEL = 3 mg/kg/day

a Due to early termination of the high-dose group on Day 12, no data at steady state.

F = Female; M = Male; LD = Lactation Day; PND = Post-natal Day; TK = Toxicokinetics

2.6.7.15.2 幼若ラット 4 及び 13 週間反復投与毒性試験（4 及び 8 週間休薬）

Test Article: Vericiguat

Species/Strain: Rat/Crl:WI(Han)
Initial Age: 10 days (PND10)
Date of First Dose: [redacted]-20[redacted]
Dose Volume: 5 mL/kg

Duration of Dosing: 4 or 13 weeks (Main Groups – 28 to 30 days or 91 to 93 days; Recovery Groups - 29 or 92 days; Satellite Groups – 1 day)
Duration of Postdose: 4 or 8 weeks (29 to 30 days or 56 to 57 days)
Method of Administration: Oral (gavage)
Vehicle/Formulation: Suspension in 0.5% Tylose

Report Number: PH-39764
Location in CTD: 4.2.3.5.4.2
GLP Compliance: Yes

Special Features: Toxicokinetics [Day 1 (satellite animals) and on Days 17, 35, and 72 from the 13-week cohort; femur and humerus measurements (length)]
No-Observed-Adverse-Effect Level: 3 mg/kg/day (Juvenile rat)

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
No. of Animals (per timepoint)	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3	F:3	M:3
Toxicokinetics – Study Day 72 [a]								
$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (µg•hr/L)	NA	NA	1680	1790	4670	4930	10800	14400
C_{max} (µg/L)	NA	NA	237	198	532	446	1700	1560
T_{max} (hr)	NA	NA	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00

Juvenile animal study			**Report No.:** PH-39764					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
No. of Animals (main/recovery)								
4-week/4-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
13-week/8-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
Noteworthy Findings								
Mortality (No. of Animals)								
4-Week + 4-Week Recovery Cohort	0	0	0	0	0	0	0	0
13-Week + 8-Week Recovery Cohort	0	1	0	0	0	0	10 [bc]	6 [c]
Cause of Early Death/Sacrifice in 13 week cohorts [c]								
Gavage Error (confirmed by gross and/or histopathologic findings; with or without correlating clinical signs)	0	1	0	0	0	0	2	2
Undetermined due to cannibalism or autolysis	0	0	0	0	0	0	5	2
With clinical signs indicative of gavage errors (labored breathing)	0	0	0	0	0	0	0	2
Severe intestinal inflammation/enteritis [d]	0	0	0	0	0	0	2	2
Undifferentiated sarcoma [b]	0	0	0	0	0	0	1	0

Juvenile animal study **Report No.:** PH-39764

Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
No. of Animals (main/recovery)								
4-week/4-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
13-week/8-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
Clinical Observations								
4-Week + 4-Week Recovery Cohort	-	-	-	-	-	-	-	-
13-Week Cohorts (Assigned to Main or Recovery Groups)								
Breathing changes (breathing sounds, accelerated, decelerated, labored)	0	1	0	0	0	0	2	5
Emaciation	0	0	0	0	0	0	2	4
Gait (high-stepping)	0	0	0	0	0	0	3	1
Hypothermic	0	0	0	0	0	0	1	2
Piloerection	0	0	0	0	0	0	2	2
Salivation (increased)	0	0	0	0	0	0	0	1
13-Week + 8-Week Recovery Cohort (Recovery Period)	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-

Juvenile animal study			**Report No.:** PH-39764					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
No. of Animals (main/recovery)								
4-week/4-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
13-week/8-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
Body Weight Gain	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-
Developmental Landmarks								
Open Field Motor Activity	-	-	-	-	-	-	-	-
Vaginal Opening	-	-	-	-	-	-	-	-
Balano-Preputial Separation	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Pathology								
Organ Weights	-	-	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology								
4-Week Interim Sacrifice								
Cecal Dilatation	0	0	0	0	0	0	[1]	[2]
Small Intestine, Changes in content consistency	0	0	0	0	0	[1]	[1]	[3]

Juvenile animal study			**Report No.:** PH-39764					
Daily Dose (mg/kg)	0 (Control)		1		3		10	
No. of Animals (main/recovery)								
4-week/4-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
13-week/8-Week Recovery	F:12/12	M:12/12	F:12/0	M:12/0	F:12/0	M:12/0	F:12/12	M:12/12
4-Week +4-Week Recovery	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
13-Week Terminal Sacrifice	-	-	-	-	-	-	-	-
13-Week + 8-Week Recovery [e]								
Small Intestine, Discoloration	0	0	NA	NA	NA	NA	[2]	[1]
Femur & Humerus Measurements	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology								
4-Week Interim Sacrifice	-	-	-	-	-	-	-	-
4-Week + 4-Week Recovery	-	-	NA	NA	NA	NA	-	-
13-Week Terminal Sacrifice	-	-	-	-	-	-	-	-
13-Week + 8-Week Recovery [e]								
Necrotizing Enteritis (slight to massive, seen only in early sacrifice/death animals)	-	-	NA	NA	NA	NA	[2]	[2]

Juvenile animal study **Report No.:** PH-39764

a No plasma concentrations (above LLOQ) were found in the samples from the control group.
b Main group female (No. 317) dosed at 10 mg/kg was sacrificed prematurely on Day 44 and revealed an undifferentiated sarcoma, a known background finding in rats, not test article-related.
c Mortality seen at 10 mg/kg/day within the first two weeks of dosing in the 13-week cohort (main and recovery groups) was predominantly related to gavage errors (including those documented or having clinical signs consistent with gavage error). Since similar mortality did not occur with repeat daily dosing in either the 4-week cohort or in the 4-week pilot study at the same dose reaching comparable exposure levels, the mortality observed in the first two weeks of the 13 week cohorts is considered an isolated incident due to gavage errors and not reproducible.
d GIT findings considered as a consequence of reduced gastrointestinal motility due to pharmacologically-mediated smooth muscle cell relaxation; severe intestinal inflammation that presented with necrotizing enteritis potentially due to dysbiosis and intestinal inflammation as a consequence of prolonged disturbance of intestinal motility.
e No findings seen in surviving animals in this recovery cohort.

GIT = Gastrointestinal; NA = Not applicable; No. = Number.
[ ] = Test article-related change based on incidence and/or severity.
- = No noteworthy findings.

2.6.7.16　局所刺激性試験

ベルイシグアトの局所刺激性試験は実施していない。

2.6.7.17 その他の毒性試験

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Mechanistic Studies						
Rat/Crl:LE	Oral (gavage) (Ethanol/ Kolliphor HS 15®/Tap Water (10/40/50)	2 Weeks	0, 10, 30	10 males/group	**Antemortem**: No test article-related mortality, clinical observations or body weight changes present. Food consumption was somewhat lower at 30 mg/kg/day during Week 1, but comparable to control in Week 2. Water consumption was higher than control at 10 and 30 mg/kg/day. **Gross Pathology**: No test article-related necropsy findings were noted. **Toxicokinetics (Day 11)**: See table	PH-38568 (Non-GLP) 4.2.3.7.3.1

Dose	[mg/kg]	10	30
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	46500	146000
$AUC_{(0-24)/norm}$	[kg·h/L]	4.65	4.85
C_{max}	[µg/L]	4180	12900
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.418	0.429
t_{max}	[h]	7.00	7.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	5.9	8.6
R_{A1}		1.7	1.8
R_{A3}		1.2	1.1

$R_{A1} = C_{max, SS} / C_{max, Day 1}$
$R_{A3} = AUC_{(0-24),SS} / AUC_{(0-24),Day 1}$

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Mechanistic Studies (continued)						
Rat/Crl:LE	Oral (gavage) (Ethanol/ Kolliphor HS 15®/Tap Water (10/40/50)	2 Weeks	0, 10, 30	10 males/group	**Conclusion**: NOAEL = 30 mg/kg/day Treatment with daily doses of 0, 10, or 30 mg/kg/day for two weeks was well tolerated by Long Evans rats. The effects seen in food and water consumption were also seen in Wistar rats. Exposure (AUC and C_{max}) at steady state was similar to that of the corresponding dose groups in the previous 26-week Wistar rat study (PH-37899).	PH-38568 (continued)

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Mechanistic Studies (continued)						
Rat/RjOrl:LE	Oral (gavage) (Ethanol/ Kolliphor HS 15®/Tap Water (10/40/50)	13 to 14 Weeks (97-99 days – main groups; 90 days – satellite TK groups)	0, 10, 30	10 males/group (main groups) 6 males/group (satellite TK groups)	**Antemortem**: No test article-related mortality, clinical observations or changes in body weights or food consumption present. Water consumption was higher than control at 10 and 30 mg/kg/day. **Gross Pathology**: No test article-related necropsy findings were noted. **Histopathology**: Examination of brain in 7 levels (including substantia nigra), the inner ear with the pigmented stria vascularis, and the retina with pigment epithelium did not reveal any test article-related findings. **Toxicokinetics (Day 90)**: See table	PH-38403 (GLP) 4.2.3.7.3.2

Dose	[mg/kg]	10	30
$AUC_{(0-24)}$	[µg·h/L]	43500	124000
$AUC_{(0-24)/norm}$	[kg·h/L]	4.35	4.12
C_{max}	[µg/L]	3650	11600
$C_{max,norm}$	[kg/L]	0.365	0.388
t_{max}	[h]	7.00	7.00
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	7.9	7.6
R_{A1}	[%]	1.2	1.8
$R_{A3)}$	[%]	1.3	1.3

$R_{A1} = C_{max,\,SS} / C_{max,\,Day\,1}$, $R_{A3} = AUC_{(0-24),SS} / AUC_{(0-24),Day\,1}$

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Mechanistic Studies (continued)						
Rat/RjOrl:LE	Oral (gavage) (Ethanol/ Kolliphor HS 15®/Tap Water (10/40/50)	13 Weeks (97-99 days – main groups; 90 days – satellite TK groups)	0, 10, 30	10 males/group (main groups) 6 males/group (satellite TK groups)	**Conclusion**: NOAEL = 30 mg/kg/day No evidence of possible effects of vericiguat on melanin-containing nervous tissue.	PH-38403 (continued)

Test Article: Vericiguat

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg/kg/day)[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Report Number
Phototoxicity						
Mouse fibroblasts (3T3 NRU)	In vitro	NA	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 45, 60 µg/mL	NA	Vericiguat was identified as a non-phototoxic compound with a photo-irritation-factor (PIF) [b] of 1. The positive control compound showed a PIF of 23.	PH-36774 (GLP) 4.2.3.7.7.1

a Doses expressed as mg/kg/day unless stated otherwise

b PIF model scores: <2 'no phototoxicity'; >2 and <5 'probable phototoxicity'; >5 ' phototoxicity'

NA = Not applicable; NRU = Neutral Red Uptake