目次

1. 非臨床試験計画概略.....5
2. 薬理試験（モジュール2.6.2）.....9
2.1 効力を裏付ける試験.....9
2.2 副次的薬理試験.....10
2.3 安全性薬理試験.....10
3. 薬物動態（モジュール2.6.4）.....11
3.1 分析方法.....11
3.2 吸収.....11
3.3 分布.....11
3.4 代謝.....12
3.5 排泄.....13
3.6 薬物動態学的薬物相互作用.....14
4. 毒性試験（モジュール2.6.6）.....16
4.1 単回投与毒性試験.....16
4.2 反復投与毒性試験.....16
4.2.1 ラットを用いた反復投与毒性試験.....16
4.2.2 イヌを用いた反復投与毒性試験.....17
4.3 遺伝毒性試験.....17
4.4 がん原性試験.....17
4.5 生殖発生毒性試験.....17
4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験.....17
4.5.2 胚・胎児発生に関する試験.....18
4.5.3 出生前及び出生後の発生に関する試験.....18
4.5.4 幼若動物を用いた試験.....18
4.6 局所刺激性試験.....18
4.7 その他の毒性試験.....18
4.7.1 毒性発現の機序に関する試験.....18
4.7.1.1 ラットを用いた探索的な7日間経口投与毒性試験.....18
4.7.1.2 In vitroにおけるイヌ培養肝細胞を用いた酵素誘導試験.....19
4.7.2 代謝物を用いた試験.....19
4.7.3 不純物を用いた試験.....19
4.7.4 光毒性試験.....20
4.7.5 その他の試験.....20
5. 考察及び結論.....21
6. 参考文献.....39

略語一覧

略語又は用語	定義／説明
AKT	protein kinase B, also known as PKB or AKT1　プロテインキナーゼB、PKB又はAKT1としても知られる
ALK	anaplastic lymphoma kinase　未分化リンパ腫キナーゼ
AMG 510/ sotorasib	previously known as 3365648 or AMG3365648　以前は3365648又はAMG 3365648とも表記
AUC_R	ratio of the area under the plasma concentration versus time curve in the presence and absence of an interacting drug　相互作用を有する薬物の存在下及び非存在下における血漿中濃度 - 時間曲線下面積比
AUC_t	area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint　0からt時間までの濃度 - 時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein　乳癌耐性タンパク
BDC	bile duct cannulated　胆管カニューレ
BID	twice daily　1日2回
BRAF	serine/threonine protein kinase B-Raf　セリン/スレオニンプロテインキナーゼB-Raf
BUN	blood urea nitrogen　血中尿素窒素
C118A	alanine substitution for cysteine at amino acid position 118　アミノ酸位置118におけるシステインのアラニン置換
C118S	serine substitution for cysteine at amino acid position 118　アミノ酸位置118におけるシステインのセリン置換
C51S	serine substitution for cysteine at amino acid position 51　アミノ酸位置51におけるシステインのセリン置換
C80L	leucine substitution for cysteine at amino acid position 80　アミノ酸位置80におけるシステインのロイシン置換
C_{max}	maximum observed concentration　最高血漿中濃度
c-RAF	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase　RAFプロトオンコジーンのセリン/スレオニンプロテインキナーゼ
CRC	colorectal cancer　結腸直腸癌
CT-26	murine colorectal tumor model　マウス結腸直腸癌由来細胞株
CYP	cytochrome P450　チトクロームP450
Cys12	cysteine at amino acid position 12　アミノ酸位置12のシステイン
DDI	drug-drug interactions　薬物相互作用
DRM	drug-related material　薬物関連物質
EGFR	epidermal growth factor receptor　上皮成長因子受容体
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase 1/2　細胞外シグナル制御キナーゼ1/2
G12C	cysteine substitution for glycine at amino acid position 12　アミノ酸位置12におけるグリシンのシステイン置換
GAPs	GTPase-activating proteins　GTPase活性化タンパク
GDP	guanosine 5’-diphosphate　グアノシン5'-二リン酸
GEFs	guanine nucleotide exchange factors　グアニンヌクレオチド交換因子
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
GST	glutathione transferase　グルタチオン転移酵素
GTP	guanosine 5’-triphosphate　グアノシン5'-三リン酸
H&E	hematoxylin and eosin　ヘマトキシリンエオジン
HER2	human epidermal growth factor receptor 2　ヒト上皮成長因子受容体2
hERG	human ether-à-go-go-related gene　ヒトether-à-go-go関連遺伝子
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog　Harveyラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ
$[I]_{50}$	apparent binding affinity　見かけの結合親和性
IC_{50}	half-maximal inhibition concentration　50%阻害濃度

略語又は用語	定義／説明
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use　医薬品規制調和国際会議
ki	inhibition constant　阻害定数
KIM-1	kidney injury molecule-1　腎障害分子-1
k_{obs}	observed rate of covalent bond formation　観察された共有結合形成速度
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (protein)　Kirstenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（タンパク）
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (gene)　Kirstenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（遺伝子）
KRAS C118A	KRAS protein with a C118A amino acid substitution　アミノ酸置換を伴うKRASタンパク
KRAS G12C	KRAS protein with a G12C amino acid substitution　アミノ酸置換を有するKRASタンパク
KRAS G12C/C118A	KRAS protein with G12C and C118A amino acid substitutions　G12CおよびC118Aアミノ酸置換を伴うKRASタンパク
KRAS G12C/C51S/C80L/C118S	KRAS protein with G12C, C51S, C80L, and C118S amino acid substitutions　G12C、C51S、C80L及びC118Sアミノ酸置換を伴うKRASタンパク
KRAS G12C-GDP	GDP-bound KRAS protein with a G12C amino acid substitution　アミノ酸置換を伴うGDP結合KRASタンパク
KRAS p.G12C	KRAS gene with a mutation resulting in a G12C amino acid substitution　アミノ酸置換をもたらす突然変異を有するKRAS遺伝子
LE	Long Evans
LLOQ	lower limit of quantitation　定量下限
LUAD	lung adenocarcinoma　肺腺癌
MAPK	mitogen-activated protein kinase　マイトジェン活性化プロテインキナーゼ
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase　マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ
MIA PaCa-2	human pancreatic cell line　ヒト膵癌由来細胞株
MIA PaCa-2 T2	human pancreatic cell line re-selected in vivo　In vivoで再選択されたヒト膵癌由来細胞株
mRNA	messenger ribonucleic acid　メッセンジャーリボ核酸
MSI	mass spectrometry imaging　質量分析イメージング
MSM	mechanistic static model　メカニズムに基づく静的モデル
NA	not applicable　適応せず
NCI-H358	human lung cancer cell line　ヒト肺癌由来細胞株
NF1	neurofibromin 1　ニューロフィブロミン1
NP	not performed　実施せず
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog　神経芽細胞腫RASウイルス癌遺伝子ホモログ
NSCLC	non-small cell lung cancer　非小細胞肺癌
OAT	organic anion transporter　有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporter polypeptide　有機アニオントランスポータートリペプチド
OCT	organic cation transporter　有機カチオントランスポーター
OSOM	outer stripe of th outer medulla　腎臓髄質外帯外層
pan-ErbB	pan-epidermal growth factor receptor　汎赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ
PBPK	physiologically based pharmacokinetic modling　生理学的薬物速度論
PDB ID	Protein Data Bank identifier　タンパクデータバンク識別子
PDX	patient-derived xenograft　患者由来異種移植片
p-ERK	phosphorylated ERK1/2　リン酸化ERK 1/2
P-gp	P-glycoprotein　p糖タンパク
PI3K	phosphoinositide 3-kinase　ホスホイノシチド3キナーゼ

略語又は用語	定義／説明
PK	pharmacokinetic　薬物動態
PLCε	phospholipase C epsilon　ホスホリパーゼCε
PO	by mouth; oral　経口
QD	once per day　1日1回
R1	ratio of intrinsic clearance values in the presence and absence of an interacting drug　相互作用を有する薬剤の有無における固有クリアランスの比
R1, gut	ratio of intrinsic clearance values in the presence and absence of an interacting drug in the gut　消化管での相互作用を有する薬剤の有無における固有クリアランスの比
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog; small GTPase　ラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ；低分子GTPアーゼ
SD	standard deviation　標準偏差
SD	Sprague Dawley
SHP-2	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2　Srcホモログ2ドメイン含有ホスファターゼ2
SOS1	son-of-sevenless homolog 1　son-of-sevelessホモログ1
SW480-1AC	one of the human colorectal carcinoma cell lines　ヒト結腸直腸癌由来細胞株
$t_{1/2}$	half-life　半減期
T3	Triiodothyronine　トリヨードチロニン
T4	Thyroxine　チロキシン
UDP	uridine diphosphate　ウリジン二リン酸
UGT	Glucuronosyltransferase　UDPグルクロン酸転移酵素
WT	wild type　野生型

1. 非臨床試験計画概略

Kirstenラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（*KRAS*：Kirsten and Mayer, 1967）は、低分子のグアノシン5'三リン酸加水分解酵素（GTPase）シグナル伝達タンパクをコードする癌遺伝子である（Chang et al, 1982）。KRASは、Harveyラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（HRAS, Chang et al, 1982、Harvey, 1964）及び神経芽細胞腫RASウイルス癌遺伝子ホモログ（NRAS, Hall et al, 1983、Taparowsky et al, 1983）を含む、ラット肉腫ウイルス腫瘍遺伝子ホモログ（RAS）ファミリータンパクの1種であり、細胞の増殖と生存に関与する多数の細胞内シグナル伝達経路の必須メディエーターとして機能する、低分子膜結合型グアノシン5'-三リン酸（GTP）結合タンパクである（Simanshu et al, 2017、Barbacid, 1987）。RASタンパクは、不活性型のグアノシン5'二リン酸（GDP）との結合状態と、活性型のGTPとの結合状態を交互に繰り返すことにより、分子スイッチとして機能する（Milburn et al, 1990、Pai et al, 1989）。Son-of-sevenlessホモログ1（SOS1）等のグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）は、GTPを付加しRASの活性化を促進するが、ニューロフィブロミン1（NF1）などのGTPase活性化タンパク（GAPs）は、GTPからGDPへの加水分解とRASの不活性化を促進する（Simanshu et al, 2017）。RASへのGTPの結合により、スイッチ1及び2領域の立体配座がシフトすることにより、RASをそのエフェクターであるRAFプロトオンコジーン、セリン／スレオニンプロテインキナーゼ（c-RAF）、ホスホイノシチド3キナーゼ（PI3K）及びホスホリパーゼCε（PLCε）と結合するために有利に配向させる（Vetter and Wittinghofer, 2001）。これらのエフェクターは、次にマイトジェン活性化プロテインキナーゼ（MAPK）経路を含む、それぞれのシグナル伝達経路のトリガーとして、細胞外シグナル調節キナーゼ1/2（ERK1/2）のリン酸化及び活性化を誘導する（Cully and Downward, 2008）。体細胞でのRASの活性化変異は癌の特徴であり、GAPとRASの関連を阻害することでエフェクターとの結合を安定化し、RASシグナルの伝達を増強する（Scheffzek et al, 1997）。

体細胞でのRASファミリーメンバーの活性化変異は、すべての癌の推定21%にみられる腫瘍のドライバー変異である（AACR Project GENIE Consortium, 2017）。変異の発現率が高いにもかかわらず、RAS変異は発見後35年以上、治療上の標的とすることは難しかった。EGFR、HER2、ALK及びBRAFなどの癌遺伝子とは対照的に、RASを標的とした治療法は承認されていない（Hobbs et al, 2016）。RASにおける最も一般的な発癌性変異はKRASのG12、G13及びQ61でみられ、これらは固形癌において高頻度に認められる（AACR Project GENIE Consortium, 2017、Hobbs et al, 2016、Karnoub and Weinberg, 2008）。癌細胞株を用いたいくつかの試験では、KRASの発現をノックダウンした場合、KRAS変異を有する細胞株でのみ生存率が低下することが示されている（McDonald et al, 2017）。特に注目すべきKRAS変異の1つであるG12Cは、白人で肺腺癌（LUAD）の約13%、結腸直腸癌（CRC）の3%、及びその他の固形癌の1～2%に存在する（AACR Project GENIE Consortium, 2017）。KRAS G12Cにおけるシステインは、KRASの不活性GDP結合型に存在し、最近特徴が明らかにされたポケット構造又は溝構造（P2ポケット）に隣接している（Ostrem et al, 2013）。最近の報告では、反応性を有する低分子がP2ポケットに結合し、アミノ酸位置12のシステインと選択的に共有結合を形成し、KRAS G12C活性を阻害することが示唆されている（Janes et al, 2018、Ostrem and Shokat, 2016、Patricelli et al, 2016）。

sotorasibはファーストインクラスのKRAS G12C阻害剤であり、アミノ酸位置95のヒスチジンにおける溝構造との新規の相互作用及び変異したシステインとの共有結合によりP2ポケットに不可逆的に結合することで、KRAS G12Cに対する選択性を高めている（Canon et al, 2019）。sotorasibが結合すると、KRAS G12Cは不活性型のGDP結合型立体配座に固定され、SOS1が触媒するGDPとGTPのヌクレオチド交換が妨げられる（Canon et al, 2019）。このKRAS G12Cの阻害により、RAF等の下流のエフェクターとの相互作用が阻害されることで、ERKのリン酸化が阻害される（Ostrem et al, 2013、Simanshu et al, 2017、Canon et al, 2019）。sotorasibは、KRAS G12C変異を有する腫瘍でのみ発癌シグナルの伝達と腫瘍細胞の増殖及び生存を阻害し、野生型（WT）のKRAS又はKRASの他の変異を有する腫瘍に対する阻害作用は示さなかった。

本概要の目的は、sotorasibをヒトで安全に使用するため、モジュール2.6及び4で提供される非臨床薬理、PK及び毒性について総合的に評価することである。sotorasibの開発過程における非臨床試験は、既存の規制ガイダンス、特に医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインS9（ICH S9, 2009）に従い実施した。

sotorasibの非臨床安全性評価は、副次的及び安全性薬理学試験（モジュール2.6.2）、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したラット及びイヌを用いた最長3カ月間の反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験、作用機序試験、代謝物及び不純物に関する試験、並びにin vitro光毒性試験を含むその他の毒性試験により評価した（モジュール2.6.6）。

sotorasibの非臨床安全性を評価する動物種としてSprague Dawley（SD）ラット及びビーグル犬を選択した。sotorasibはWTのKRASと比較してKRAS G12C変異に高い選択性を有し（モジュール2.6.2 2.1項）、またKRAS G12C変異は腫瘍組織でのみで認められ、正常組織では認められていない（AACR GENIE Consortium, 2017、Karnoub and Weinberg, 2008）。In vitroで生成したヒト代謝物は、ラット及びイヌのin vitroにおいても生成がみられた（モジュール2.6.4 5.1項）。In vivo非臨床毒性試験では、予定されている臨床投与経路に基づき経口（PO）投与を選択した。重要な非臨床試験はすべて、経済協力開発機構（OECD）テストガイドライン及びGLPの原則に従い、OECDにおいてデータの相互承認に署名している米国とカナダのGLP適合試験施設にて実施した。

GLP条件下で実施したラットを用いた28日間反復投与毒性試験において、sotorasibの30、100及び200 mg/kgを投与したときの忍容性は良好であり、使用した動物の10%に重篤な毒性が発現する投与量（STD_{10}）は200 mg/kgを超えていた。ラットで認められたsotorasib投与に関連した主な変化は軽微から軽度であり、白血球の増加、循環赤血球量（ヘモグロビン、赤血球数及びヘマトクリット）の減少、並びに病理組織学的検査における腎臓髄質外帯外側（OSOM）での腎尿細管上皮の変性／壊死であった。ラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験及び2カ月間回復性試験では、sotorasibのより高い用量（60、180及び750 mg/kg）まで評価しており、ヒトの臨床曝露量をカバーする、より高い全身曝露が得られた。sotorasib投与に関連した主な変化は、60 mg/kg以上で軽微から中等度の赤血球パラメータの減少、180 mg/kg以上で軽微から中等度の総ビリルビン増加、750 mg/kgでγ-グルタミルトランスフェラーゼ増加、60 mg/kg以上で軽度のコレステロール増加、180 mg/kg以上で軽度から重度のトリグリセリドの減少、並びに750 mg/kgで軽微から中等度のグロブリンの減少であった。腎尿細管の変性／壊死が認められ、これは28日間反復投与毒性試験でOSOMにおける近位尿細管等で

みられた臨床病理学的変化、剖検及び腎臓重量の変化を伴う所見と同様の特徴を示した。腎尿細管の変性／壊死の発現頻度及び重症度（軽微から顕著）は、28日間反復投与毒性試験における腎臓の変化と比較して高かった。3カ月間反復投与毒性試験でラットにおける腎毒性が重篤であった原因は、試験期間が長いこと及びsotorasibの全身曝露量が高いことに起因したものと考えられた。休薬期間終了時、すべての用量においてsotorasib投与に関連した腎臓の変化は部分的に回復したが、間質性線維組織の増殖及び糸球体硬化がみられ、これらは可逆的な変化ではないと考えられた。ラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験におけるSTD_{10}は180 mg/kgであった。

GLP条件下で実施したイヌを用いた28日間反復投与毒性試験において、sotorasibの10、30及び300 mg/kgを投与したときの忍容性は良好であった。重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は300 mg/kgを超えていた。イヌにおけるsotorasib投与に関連した主な変化は、軽微から軽度の網状赤血球数の減少を伴う赤血球系パラメータの減少であった。GLP条件下で実施したイヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験では、sotorasibのより高い全身曝露量を得るために、高い用量［200及び1000 mg/kg/dayとして100及び500 mg/kgの用量で1日2回（BID）投与］を用いて評価した。しかしながら、sotorasibの1000 mg/kg/dayを投与しても、ラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験と比較して高い曝露量は得られなかった。sotorasib投与に関連した所見として、胆嚢内の異物、軽微から軽度の血液学的検査パラメータ（赤血球系パラメータの減少）及び血液生化学的検査パラメータ（総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、コレステロール及びトリグリシリドの増加）の変化、肝臓（肝臓重量の増加を伴う肝細胞肥大）、下垂体（下垂体重量の増加を伴う好塩基球の肥大）又は甲状腺（甲状腺重量の減少を伴う濾胞上皮のコロイドの減少及び肥大）の病理組織学的変化がみられたが、これらは重篤な毒性ではなく、肝細胞酵素誘導に対する適応性反応又は二次的反応と判断した。イヌにおいて腎毒性は認められなかった。本試験におけるHNSTDは1000 mg/kg/dayであった。

sotorasibは、GLP条件下で実施した細菌を用いた復帰突然変異（Ames）試験、並びにラットを用いたin vivoでの哺乳類赤血球細胞を用いた小核試験及びアルカリコメットアッセイにおいて、遺伝毒性を示さなかった。

ラット及びウサギを用いた胚・児発生毒性試験において、sotorasibは催奇形性を示さなかった。ラットにおいて、試験に用いた最高用量（540 mg/kg）まで、胚・胎児の発生に影響しなかった。ウサギにおいて、投与期間中に母動物の体重増加及び摂餌量の減少が認められる用量レベル（100 mg/kg）でのみ、胎児において体重減少と中手骨骨化数の減少がみられた。胎児の骨化数の減少は、胎児の体重減少に関連した成長遅延によるものであり、母動物でみられた毒性による胎児への非特異的な影響であると判断した（Nitzsche, 2017）。

In vitroにおいて、sotorasibは光毒性を示さなかった。

ヒト血中代謝物であるAMG3368167（M24）、AMG3375854（M10）及びAMG3413829（M18）について、一又は二次的な薬理作用、in vitroでのヒトether-à-go-go関連遺伝子（hERG）カリウムチャネルへの影響並びに遺伝毒性について評価した結果、臨床的に問題となる安全上の懸念は認められなかった（モジュール2.6.2）。

sotorasibの原薬において、ICH Q3A（ICH Q3A(R2), 2006）及びICH Q3B（ICH Q3B(R2), 2006）に従い、閾値を超えるレベルの不純物を特定した。

結論として、非臨床薬理、薬物動態（PK）及び毒性試験の結果から、非臨床試験データは、ファーストインクラスのKRAS G12Cの特異的阻害剤であるsotorasibをKRAS G12C変異を有する進行NSCLC患者の治療を目的に臨床使用することを支持する。

2. 薬理試験（モジュール2.6.2）

sotorasibはKRAS G12C阻害剤であり、アミノ酸位置95のヒスチジンにおける溝構造との新規の相互作用及び変異したシステインとの共有結合によりP2ポケットに不可逆的に結合することで、KRAS G12Cに対する選択性を高める（Canon et al, 2019）。sotorasibが結合することで、KRAS G12Cは不活性型のGDP結合型立体配座に固定され、SOS1が触媒するGDPとGTPのヌクレオチド交換が妨げられる（Canon et al, 2019）。このKRAS G12Cの阻害により、RAF等の下流のエフェクターとの相互作用が阻害されることで、ERKのリン酸化が阻害される（Ostrem et al, 2013、Simanshu et al, 2017、Canon et al, 2019）。

2.1 効力を裏付ける試験

sotorasibは、in vitroにおいて組換えKRAS G12C細胞株でSOS1が触媒するヌクレオチド交換を阻害したが［50%阻害濃度（IC_{50}）=0.09 μM］、G12がWTであるKRAS細胞株にはほぼ作用しなかった（R20150198試験）。sotorasibは、*KRAS pG12C*遺伝子変異を有するすべての細胞株においてKRAS G12Cを共有結合により修飾し、KRAS G12Cによるシグナル伝達を阻害したが（IC_{50}：0.01～0.12 μM）、他の様々なKRAS変異細胞株、WTのKRAS及び他の癌遺伝子変異を有する細胞株ではERK1/2のリン酸化（p-ERK）を阻害しなかった。また、sotorasibは、すべての*KRAS p.G12C*変異を有する細胞株の生存を阻害したが（IC_{50}：0.004～0.032 μM）、他のKRAS変異又はWTのKRAS及び他の癌遺伝子変異を有する細胞株の生存率に影響しなかった。本試験において、sotorasibの共有結合形成の最大速度（k_{obs}）及び見かけの結合親和性（$[I]_{50}$）を、*KRAS p.G12C*変異を有するヒト膵癌由来細胞株であるMIA PaCa-2で測定した結果、それぞれ0.0013 sec^{-1}及び7.0×10^{-7} Mであり、$k_{obs}/[I]_{50}$比の最大は1.9×10^{3} M^{-1} sec^{-1}であった（R20150199試験）。

In vivoにおいて、sotorasibの効果を*KRAS p.G12C*変異を有するヒトNSCLC細胞株（NCI-H358）及びin vivoで再選択されたヒト膵癌由来細胞株（MIA PaCa-2 T2）を用い、腫瘍異種移植モデルにより検討した（R20190129試験、R20150188試験）。sotorasibは、KRAS G12Cを共有結合により修飾し、3 mg/kgの低用量で用量依存的かつ有意にp-ERKを阻害した。sotorasibの曝露量は0.5時間後に最大となり、続いて腫瘍におけるp-ERKの最大阻害効果が1～2時間後に最大となった。p-ERKの有意な阻害は、sotorasib 30又は100 mg/kgを単回投与した後48時間まで持続した。sotorasibによるKRAS G12Cの共有結合による修飾作用はp-ERKの阻害と相関しており、最大阻害作用は2時間までに認められた。

腫瘍異種移植モデルを用いた薬効薬理試験において、sotorasibは3 mg/kgで有意な腫瘍増殖抑制（TGI）作用を示し、NCI-H358（R20150190試験）及びMIA PaCa-2 T2（R20150189試験）において、100 mg/kgでそれぞれ49及び62%の腫瘍退縮作用を示した。sotorasibは、ヒト又はマウスのCRC由来細胞株（*KRAS p.G12V*変異を有するSW480-1AC又は*KRAS p.G12D*変異を有するCT-26）を用いた異種移植モデルにおいて、それぞれ100及び200 mg/kgの用量でも効果はみられず（R20150191試験、R20190128試験）、また、いずれの試験においても体重に影響しなかった（R20150189試験、R20150190試験、R20150191試験）。*KRAS p.G12C*変異を有するCRC患者由来異種移植片（PDX）モデルでは、sotorasibはp-ERKを用量依存的に阻害した。100 mg/kgの単回投与では、2時間後にp-ERKの最大阻害効果が認められ、この阻害は48時間まで持続した（R20190130試験）。同モデルを用い

た薬効薬理試験では、sotorasib投与により腫瘍の増殖が用量依存的かつ有意に抑制され、100 mg/kgで45%の腫瘍退縮作用が認められた（R20190131試験）。

In vitroでの腫瘍細胞の生存に関する併用投与試験において、複数の*KRAS p.G12C*変異細胞株を用い、MAPK経路におけるRASの上流及び下流に存在する種々のエフェクターに対する阻害剤、並びにAKTセリン／スレオニンキナーゼ（AKT）経路に対する阻害剤を用い、sotorasibとの併用効果について検討した結果、相乗的な腫瘍傷害作用が認められた（153894試験）。また、in vivoにおいて、sotorasibとEGFR/pan-erb-b 2受容体チロシンキナーゼファミリー（ErbB）、プロテインチロシンホスファターゼ非受容体Type 11（SHP-2）又はMAPK/ERKキナーゼ（MEK）阻害剤との併用で抗腫瘍活性の有意な増強が認められたが、死亡又は体重減少の徴候は認められず、カルボプラチン化学療法との併用でも毒性の増強は認められなかった（R20180033試験、153358試験、153397試験、R20180032試験）。

抗腫瘍炎症及び免疫応答に対するsotorasibの影響を評価する目的で、遺伝子操作によりKRAS G12Cを内因性に発現させたマウス結腸直腸癌由来細胞株（CT-26）を用いた腫瘍同種移植マウスモデルを作製した。In vitroにおいて、sotorasib処理によりp-ERKと腫瘍の生存を阻害し、また、主要組織適合性複合体（MHC）クラスI及び炎症性サイトカインの発現も増強した（Canon et al, 2019）。sotorasib投与により、*KRAS p.G12C*変異を有するCT-26腫瘍移植マウスの80%で恒久的な完全腫瘍退縮が認められた。sotorasibと免疫チェックポイントに対する阻害剤［抗programmed cell death protein 1（PD-1）抗体］を併用することで、sotorasib単剤投与よりも低い用量で、腫瘍への効果が有意に増加した（R20180034試験）。作用機序検討試験において、sotorasibが腫瘍内における炎症性サイトカイン及び抗原提示成分の産生を増強することにより、炎症性の腫瘍微小環境を誘導することが明らかとなっている。これらの作用に続き、増殖性のエフェクターT細胞、樹状細胞及びマクロファージを含む多数の抗腫瘍免疫細胞サブセットが浸潤した。再移植試験では、*KRAS*変異の有無にかかわらず、一度腫瘍が消失したマウスにおいてCT-26に対する抗腫瘍免疫が誘導されることが確認された（R20180001試験、R20190106試験、R20190128試験）。

2.2 副次的薬理試験

sotorasibのin vitroにおける選択性について、受容体、酵素、イオンチャネル及びトランスポーターを含む、様々な標的に対象に評価した。sotorasibは、KRAS G12Cに対して高い選択性を有することが示唆された（124452試験、124453試験、124787試験）。NCI-H358を用いたシステインプロテオームプロファイリングの結果、sotorasibはKRAS G12C由来ペプチドのアミノ酸位置12のシステインにのみ結合することが示された（R20150219試験）。

2.3 安全性薬理試験

hERGチャネルに対するsotorasibのIC_{50}は54.8 μMであり（150431試験）、予定している臨床用量範囲において、hERGチャネルとの臨床的に重要な相互作用は予想されなかった。テレメトリーを装着したイヌを用いた心血管系に対する安全性薬理試験では、sotorasibは300 mg/kgまでの用量で心電図又は血行動態パラメータに影響しなかった（150458試験）。

3. 薬物動態（モジュール2.6.4）

3.1 分析方法

マウス、ラット、イヌ、サル及びウサギの血漿中におけるsotorasib濃度を、高感度かつ特異的な分析法を用いて定量した。血漿試料はタンパク沈殿により抽出し、分析物は逆相液体クロマトグラフィーにより分離した。sotorasibは、タンデム質量分析で検出した。GLP条件下で実施した試験では、ラット（150506試験、151603試験）、イヌ（150505試験、151604試験）及びウサギ（152694試験）を用いて検証した結果、定量下限（LLOQ）は1 ng/mLであった。非GLP条件下で実施した試験におけるLLOQは、0.5～5.0 ng/mLであった。

3.2 吸収

sotorasibのPKについて、ヌードマウス、BALB/cマウス、Sprague Dayley（SD）ラット、ビーグル犬及びカニクイザルに単回静脈内（IV）及びPO投与して評価した（150529試験）。IV投与後、マウス及びイヌでは中程度のクリアランスを示し、ラット及びサルでは高いクリアランス（肝血流量と同程度）を示した。定常状態の分布容積（Vss）は体内総水分量と比較してすべての動物種で中程度であり、マウスで約0.74 L/kg、ラットで2.0 L/kg、イヌで0.73 L/kg、サルで0.76 L/kgであった。IV投与時のsotorasibの終末消失相における半減期（$t_{1/2,z}$）は、ヌードマウスで約0.42時間、Balb/cマウスで約0.47時間、ラットで約0.49時間、イヌで約0.41時間、サルで約0.71時間であった。いずれの動物種においても、単回PO投与でのsotorasibの最高血中濃度到達時間（t_{max}）の平均値は約0.25～1.2時間であった。マウス、ラット及びイヌにおいて、sotorasibのPO投与におけるバイオアベイラビリティは、マウスで約35%、ラットで30%、イヌで34%であった。反復PO投与後のsotorasibのPKについても検討した（モジュール2.6.6 3項）

3.3 分布

sotorasibは、in vitroにおいて極性を有するMadin-Darbyイヌ腎臓上皮細胞に対し、高い透過性（5.67×10^{-6}～11.2×10^{-6} cm/sec）を示した（150563試験）。

sotorasibは中程度に血漿タンパクに結合し、マウス、ラット、イヌ及びヒトを用いたin vitro試験において血球に選択的に分布しなかったことから、反復投与毒性試験に用いた動物種であるラット及びイヌと同様に、ヒトにおいてもsotorasibの曝露量を評価するために血漿中濃度を用いることは適切であることが示された（モジュール2.6.6 3項）。マウス、ラット、イヌ及びヒト血漿に対するsotorasibの結合能を0.25～25 μMの濃度範囲で評価した結果、検討した濃度範囲でsotorasibのマウス、ラット、イヌ及びヒト血漿への結合は2倍未満であった（in vitroにおけるマウス、ラット、イヌ及びヒトでの非結合型薬物濃度比の平均は、それぞれ約0.071、0.054、0.21及び0.112であった）（150530試験）。マウス、ラット、イヌ及びヒトにおけるsotorasibの血液／血漿分布比は、0.60～0.84の範囲であった（150532試験）。

雄のLEラット又は雌雄のSDラットを用いた全身分布試験において、[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質は単回PO投与後にほとんどの組織に対し可逆的に分布し（60 mg/kg/day）、投与後0.5時間ではほとんどの組織でC_{max}に達した（152495試験）。両系統のラットに共通して放射活性濃度が最も高かっ

た組織は、肝臓、腎臓、甲状腺、膵臓、眼窩外涙腺及び眼窩内涙腺であった。[^{14}C]-sotorasibを単回PO投与したときのLong Evans（LE）及びSDラットにおける組織分布パターンは類似していた。PO投与後の、[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の血液及び血漿中の0からt時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_t）は、雄よりも雌で高かったものの、その差は2倍未満であった。[^{14}C]-sotorasib由来放射活性は、ほとんどの組織で投与後336時間までにほぼ完全に消失した。投与後672時間の最終試料採取時点までに、血液及び腎臓、肺、心筋及び脾臓などの灌流性の高い組織でのみ、[^{14}C]-sotorasib由来放射活性が測定可能であった。

3.4 代謝

sotorasibのin vitroにおける代謝について、マウス、ラット、イヌ及びヒトの肝ミクロソーム及び肝細胞を用い高分解能質量分析法により評価した（150531試験）。ヒト肝細胞において生成された主な代謝物は、M10、M18及びM24であった。ヒト肝ミクロソーム及び肝細胞で生成されたsotorasibの代謝物は、反復投与毒性試験に用いた動物種である、ラット及びイヌの肝ミクロソーム及び肝細胞でも生成された。In vitroでは、ヒトに特有のsotorasibの代謝物は認められなかった。

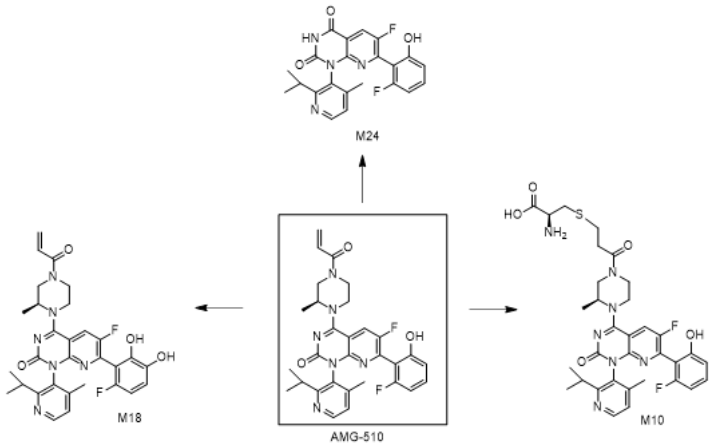
全体として、sotorasibは、胆管カニューレ（BDC）未処置の雌雄ラット及びBDC処置の雄ラットにPO投与後速やかに吸収され、広範な生体内変換を受け、主に非酵素的抱合及び代謝クリアランスにより消失した。[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質は、主に胆汁及び糞中に排泄された。sotorasibの生体内変化は主にグルタチオン抱合（Michael付加）、酸化及び程度は低いものの還元と脱アルキル化によって媒介された。sotorasibの二次代謝が多く認められ、二次代謝にはアミド加水分解、システイン抱合開裂、N-アセチル化、メチル化、グルクロン酸抱合及びスルホン化が含まれていた。最初のグルタチオン抱合によるsotorasibの生体内変換が主であり、BDC未処置の雄及び雌ラットでそれぞれ投与量の約21及び33%、BDCの雄ラットで投与量の約41%に相当した。一次的酸化に由来するsotorasibの代謝物は、BDC未処置ラットでは投与量の最大約20%、BDCラットでは投与量の約10%であった。アクロレイン部分の減少は、BDC未処置ラットではsotorasib投与量の最大約10%、BDC処置ラットでは投与量の約2.7%であったが、ピペラジン部分の脱アルキル化はBDC未処置ラットでは投与量の約10～13%、BDC処置ラットでは投与量の約6%であった。投与された[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質はほぼ完全に回収され、BDC未処置の雄ラット、BDC未処置の雌ラット及びBDC処置ラットでそれぞれ89.6、91.6及び95.2%であった。

sotorasibの代謝について、BDC未処置の雌雄イヌに[^{14}C]-sotorasibを単回PO投与（500 mg/kg/day）して評価した（153304試験）。全体として、雌雄イヌに[^{14}C]-sotorasib 500 mg/kgを単回投与してもほとんど吸収されず、主にsotorasibの未変化体として糞中に排泄された。[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の回収率は、雄及び雌でそれぞれ95.1及び96.1%であった。

sotorasibを反復投与した時の血中代謝物の特性を明らかにする目的で、雌雄ラット（200 mg/kg/day）、イヌ［1000 mg/kg/day（500 mg/kg BID）］又はヒト（960 mg/day）について混合血漿マトリックス試験を実施した（153303試験）。混合マトリックス試験の結果、sotorasibが酸化的N-脱アルキル化、グルタチオン抱合、酸化、そしてより程度は低いものの水素化、リジン抱合及びグルクロニド抱合を受け、雄雌ラット、イヌ、及びヒトの間で同様の代謝物が確認された。

ヒトで認められた主な代謝物はM10（M12のグルタチオン抱合によるシステイン抱合体への開裂体）、M18（酸化体）及びM24（還元脱アルキル化体）であった（図 1）。これら3種類の代謝物のうち、M18のみがsotorasibと同様に共有結合部位を保持しており、M18のみが一次的な薬理作用を有するものの、その効果はsotorasibと比較して著しく弱いことが報告されている（4.7.2項）。

図 1　ヒトにおけるsotorasibの主要な血中代謝物であるM10、M18及びM24



Source: Study 153303

M12（グルタチオン付加体）及びM24（酸化的脱アルキル化体）の生成に関与する酵素又は機序を明らかにする目的で、in vitroにおいて試験を実施した。遺伝子組換えグルタチオン転移酵素（GST）、ヒト肝サイトゾル又はヒト肝S9画分を用いた試験の結果、sotorasibからのM12生成は、主に非酵素的な反応（Michael付加）であり、GSTの寄与は限定的であることが示された（154076試験）。sotorasibからのM24生成は、主にチトクロームP450（CYP）3Aにより触媒された（150537試験）。

3.5　排泄

sotorasibの代謝及び排泄について、BDC未処置雌雄のラット又はBDC処置の雄ラットに[^{14}C]-sotorasib（60 mg/kg）を単回PO投与して評価した（152495試験）。BDC未処置ラットに[^{14}C]-sotorasibを単回PO投与したとき、放射性物質は速やかに排泄され、投与後48時間までに雄ラットで約82%、雌ラットで約77%が回収された。投与後168時間までの[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の排泄は、雄ではそれぞれ投与量の2.77（尿中）及び82.1%（糞中）、雌ではそれぞれ投与量の3.98（尿中）及び75.3%（糞中）であった。BDC未処置の雄及び雌ラットにおける[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の総平均回収率は、それぞれ投与量の89.6及び91.6%であった。

BDC処置の雄ラットにおける[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の排泄は、BDC未処置の雄ラットで認められた排泄パターンと同様であった。投与した[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の約85%が投与後48時間までに回収された。胆汁排泄は投与したsotorasib量の66.3%であったが、尿及び糞排泄はそれぞれ6.17と14.6%であった。[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の平均総回収率は95.2%であった。胆汁中及び尿中に回収された[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の総量から、PO投与量の約72%が吸収されたことが示唆された。排泄物中のsotorasibは、BDC未処置の雄及び雌ラットでそれぞれ投与量の6.26及び

12.2%であり、sotorasibの尿及び糞中排泄は、BDC未処置の雄ラットでそれぞれ投与量の0.572及び5.69%、BDC未処置の雌ラットでそれぞれ投与量の1.13及び11.1%であった。

BDC未処置の雄ラットと同様に、BDC処置の雄ラットにおけるsotorasibの排泄はわずかであり、尿中には投与量の3.44%、糞中には投与量の6.73%が排泄された。sotorasibは胆汁中では認められず、未変化体の胆汁クリアランスは認められなかった。以上のデータから、sotorasibはBDC未処置の雌雄ラット及びBDC処置の雄ラットにPO投与したとき、速やかに吸収され、広範な生体内変化を起こし、主に非酵素的抱合及び代謝クリアランスにより消失することが示された。[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質は主に胆汁及び糞中に排泄された（152495試験）。

BDC未処置の雌雄のイヌに[^{14}C]-sotorasibを単回PO（500 mg/kg/day）投与し、sotorasibの代謝及び排泄について評価した（153304試験）。PO投与後の[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の排泄は主に糞中であり、雄のイヌでは投与量の平均89.6%、雌のイヌでは投与量の平均92.7%であった。sotorasibの尿中排泄は主要な排泄経路ではなく、雄及び雌でそれぞれ投与放射能量の平均3.05及び2.17%であった。[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の大部分は、雌雄とも最初の48時間に回収された。全体の平均回収率は、雄及び雌のイヌで投与した[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質のそれぞれ95.1及び96.1%であった。[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質の排泄に顕著な性差は認められなかった。sotorasibは雌雄ともに糞中で最も多く認められた放射活性成分であり、雄及び雌のイヌでそれぞれ投与量の99.5及び103%であった。全体として、雌雄のイヌに[^{14}C]-sotorasib 500 mg/kgを単回投与したとき、[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質はほとんど吸収されず、主に未変化体として糞中に排泄された。

3.6 薬物動態学的薬物相互作用

sotorasib及びその代謝物であるM10、M18及びM24がCYPを介した薬物相互作用（DDI）を誘導する可能性についてin vitroで評価した（150535試験、153423試験、150536試験、153424試験）。
In vitro試験の結果、sotorasib及びその代謝物は、可逆的阻害、時間依存的阻害及び誘導により、CYP3Aを介したDDIを生じる可能性が示唆された。そのため、CYP3AのDDIについて臨床試験で確認した（モジュール2.7.2）。臨床試験及びin vitroにおけるsotorasib濃度、並びにsotorasibのPK特性から、sotorasibによるその他のCYPを介したDDIのリスクは極めて低いものと予想された（表 1）。

sotorasibは高い受動的透過性を有し、in vitroでP糖タンパク（P-gp）の基質であったが、乳癌耐性タンパク（BCRP）の基質ではなかった。sotorasib及びM10、M18及びM24がトランスポーターを介したDDIを引き起こす可能性についてin vitroで評価した。sotorasibは、in vitroにおいてBCRP（推定IC_{50}=120 μM）、多剤毒素排出タンパク1（MATE1：IC_{50}=0.440 μM）、多剤毒素排出タンパク2-K（MATE2-K：IC_{50}=2.39 μM）及びP-gp（IC_{50}=60.2 μM）の阻害剤として特定された。したがって、MATE1/MATE2-K及びP-gpに関するDDIについて臨床試験で検討した（モジュール2.7.2）。臨床試験及びin vitroにおけるsotorasib濃度、並びにsotorasibのPK特性から、sotorasibが他のトランスポーターを介してDDIを誘発するリスクは極めて低いと予想された（表 1）。

表 1　推定されるsotorasibの薬物相互作用のリスク

Enzyme	IC_{50} or K_i (μM)	Basic Equation R_1	Basic eqn $R_{1,gut}$	MSM (AUC_R)	PBPK (AUC_R)	Clinical Study Number
CYP2C8	25.6	1.08	NA	1.14[a]	NA	NP
CYP2D6	18.2	1.11	NA	1.31[b]	1.041[c]	NP
CYP3A	4.82	Inducer/ Inhibitor	NA	NA	NA	20170543
BCRP	120	NA	57	NA	NA	NP
MATE1	0.440	4.1	NA	NA	NA	20190317
MATE2-K	2.39	0.76	NA	NA	NA	20190317
OAT1	64.7	0.03	NA	NA	NA	NP
OAT3	42.8	0.04	NA	NA	NA	NP
OATP1B1	29.3	1.02	NA	NA	NA	NP
OATP1B3	54.2	1.02	NA	NA	NA	NP
OCT1	58.3	0.03	NA	NA	NA	NP
P-gp	60.2	NA	114	NA	NA	20190315

AUC_R = ratio of the area under the plasma concentration versus time curve in the presence and absence of an interacting drug; CYP = cytochrome P450; BCRP = breast cancer resistance protein; IC_{50} = inhibitor concentration at 50% of maximal; K_i = inhibition constant; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein; MSM = mechanistic static model; NA = not applicable; NP = not performed; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporter polypeptide; OCT = organic cation transporter; PBPK = physiologically based pharmacokinetic modling; P-gp = P=glycoprotein; R_1 = ratio of intrinsic clearance values in the presence and absence of an interacting drug; $R_{1,gut}$ = ratio of intrinsic clearance values in the presence and absence of an interacting drug in the gut

[a] Estimated using repaglinide as a CYP2C8 substrate

[b] Estimated using desipramine as a CYP2D6 substrate

[c] Study 153468

Source: Studies 150530, 150535, 150536, 150539, 154075, and 20170543

4. 毒性試験（モジュール2.6.6）

sotorasibの非臨床安全性について、GLP条件下で実施したラット及びイヌを用いた最長3カ月間の探索的な反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験に加え、その他の試験として、in vivo及びin vitroでの作用機序試験、代謝物及び不純物に関する試験、並びにin vitro光毒性試験により評価した。

4.1 単回投与毒性試験

単回投与毒性試験は実施しなかった。しかし、sotorasibの急性毒性はラット及びイヌの反復投与毒性試験で評価した（4.2項）。ラット及びイヌにおいて、sotorasib投与に関連した急性毒性は認められなかった。

4.2 反復投与毒性試験

4.2.1 ラットを用いた反復投与毒性試験

GLP条件下で実施したラットを用いた28日間反復投与毒性試験において、sotorasibは30、100及び200 mg/kgで良好な忍容性を示し、STD_{10}は200 mg/kgを超えていた（150428試験）。ラットにおける主なsotorasib投与に関連した変化は軽微から軽度であり、脾臓重量の増加、白血球の増加、並びに網状赤血球数及び赤血球指数の変化を伴う赤血球系パラメータ（ヘモグロビン、赤血球数及びヘマトクリット）の減少であった。病理組織学的検査では、OSOMの近位尿細管に限定された、尿細管上皮の変性／壊死が認められた。28日間の休薬期間後に尿細管の障害は部分的に回復し、回復及び修復が継続していることが確認された。しかしながら、少数の尿細管は周囲に線維組織の形成が認められた。28日間の休薬期間終了後、ラットにおける脾臓重量の増加はみられず、血液学的パラメータの変化も対照群と同程度であった。

GLP条件下で実施したラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験及び2カ月間回復性試験では、より高用量のsotorasib（60、180及び750 mg/kg）を用いたが、これは臨床曝露量を超える全身曝露量での評価を行うためであった（150432試験）。ラットにおける主なsotorasib投与に関連した変化として、60 mg/kg以上の投与群で軽微から中等度の循環赤血球量の減少、180 mg/kg以上の投与群で軽微から中等度の総ビリルビンの増加及び750 mg/kg投与群でγグルタミルトランスフェラーゼの増加が、60 mg/kg以上の投与群で軽度のコレステロールの増加、180 mg/kg以上の投与群で軽度から顕著なトリグリセリドの減少、750 mg/kg投与群で軽微から中等度のグロブリンの減少がみられた。病理組織学的検査において、腎尿細管の変性／壊死が認められ、28日間反復投与毒性試験でみられた、例えばOSOMにおける近位尿細管での変化と同様の特徴を示し、臨床病理学的、剖検及び腎臓重量の変化を伴っていた。OSOMで主に近位尿細管に認められた腎尿細管変性／壊死は、28日間反復投与試験における腎臓での変化と比較して、発生率及び重症度（軽微から顕著）ともに増加した。これは、試験期間が長期であることに加え、sotorasibの全身曝露量が高いことに起因していた。休薬期間終了時に、sotorasib投与に関連した間質性線維症及び糸球体硬化症を伴う腎臓での変化は部分的に回復したものの、可逆的ではないと考えられた。休薬期間中のその他のパラメータにおいて、

sotorasib投与に関連した変化は認められなかった。ラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験におけるSTD_{10}は180 mg/kgであった。

4.2.2 イヌを用いた反復投与毒性試験

GLP条件下で実施したイヌを用いた28日間反復投与毒性試験において、sotorasibは30、100及び300 mg/kgで良好な忍容性を示し、HNSTDは300 mg/kg以上であった（150429試験）。イヌにおける主なsotorasib投与に関連した変化は、軽微から軽度の網状赤血球の減少を伴う赤血球系パラメータの減少であった。イヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験では、より高い全身曝露量を得るため、より高用量のsotorasib（200及び1000 mg/kg/day；100及び500 mg/kg BID）を投与して評価した（150433試験）。しかし、イヌを用いた両試験におけるsotorasibの曝露量は、ラットを用いた毒性試験及び臨床試験で認められたsotorasibの曝露量よりも低かった。sotorasib投与に関連した変化として、胆嚢内の異物、軽微から軽度の血液学的検査（赤血球量減少）及び血液生化学的検査（総ビリルビン、アルカリホスファターゼ、コレステロール及びトリグリセリドの増加）における変化が認められた。病理組織学的検査では、肝臓（肝重量増加を伴う肝細胞肥大）、下垂体（下垂体重量増加を伴う好塩基球肥大）及び甲状腺（コロイド減少及び甲状腺重量の減少を伴う濾胞上皮肥大）に変化がみられた。これらの病理組織学的変化は重度の毒性ではなく、肝細胞酵素誘導に対する適応性又は二次的反応に起因するものと考えられた（4.7.1.2項）。イヌにおいて腎毒性は認められなかった。HNSTDは1000 mg/kg/dayであった。

4.3 遺伝毒性試験

細菌を用いたAmes試験（150436試験）、並びに哺乳類赤血球を用いたin vivo小核試験及びラットを用いたアルカリコメットアッセイの併用試験（150435試験）を実施したが、sotorasibは遺伝毒性を示さなかった。

4.4 がん原性試験

ICH S9ガイドラインに基づき、がん原性試験は実施しなかった（ICH S9, 2009）。

4.5 生殖発生毒性試験

ICH S9ガイドライン（ICH S9, 2009）において、進行癌患者の治療を目的とした医薬品の製造販売承認申請では、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、及び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は必須ではないとされていることから、ICH S5に従い2種の動物種（ラット及びウサギ）を用いた胚・胎児に関する試験のみを実施した（ICH S5 (R3), 2020）。

4.5.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

ICH S9ガイドラインに基づき、受胎能及び初期胚発生に関する試験は実施しなかった（ICH S9, 2009）。

4.5.2　胚・胎児発生に関する試験

sotorasibは、ラット又はウサギを用いた胚・胎児発生に関する毒性試験において催奇形性を示さなかった。ラットにおいて、検討した最高用量である540 mg/kg（ヒトに960 mgを投与したときのAUCに基づく曝露量と比較して3.9倍）まで、胚・胎児発生への影響は認められなかった。また、ウサギにおいて、投与期間中の母動物で体重増加量及び摂餌量の減少がみられた用量である100 mg/kg（ヒトに960 mgを投与したときのAUCに基づく曝露量と比較して2.2倍）でのみ、胎児体重の減少及び胎児の中手骨骨化数の減少が認められた。骨化遅延は、胎児体重の減少に伴う成長遅延に起因したものと考えられ、母動物での毒性に伴う非特異的な胎児への影響であると判断した（Nitzsche, 2017）。

4.5.3　出生前及び出生後の発生に関する試験

ICH S9ガイドラインに基づき、出生前及び出生後の発生に関する毒性試験は実施しなかった（ICH S9, 2009）。

4.5.4　幼若動物を用いた試験

NSCLCは主に成人でみられる疾患であり、KRAS G12C変異を有する小児腫瘍が非常にまれであること、また、sotorasibの投与対象となるKRAS G12C変異を有する疾患又は病態が小児集団では特定されていないことから、幼弱動物を用いた試験は実施しなかった。

4.6　局所刺激性試験

反復PO投与毒性試験において、sotorasibの局所刺激性を検討したところ、消化管に対する局所刺激性は認められなかった（4.2項）。

4.7　その他の毒性試験

4.7.1　毒性発現の機序に関する試験

4.7.1.1　ラットを用いた探索的な7日間経口投与毒性試験

ラットを用いた反復投与毒性試験の結果、標的器官は腎臓であることが特定された（4.2.1項）。本探索的試験は、腎毒性の発現機序及びトキシコキネティクスについて検討する目的で実施した（153127試験）。本試験は、雄のラットを用い、sotorasib投与に関連した腎尿細管変性／壊死の経時変化を7日間確認するとともに、腎毒性及び腎毒性の血液及び尿バイオマーカー、並びにトキシコキネティクスとの関連を明らかにするためにデザインした。加えて、sotorasib及びその代謝物について、質量分析及び／又はマトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法を用い、血漿、尿、腎臓と肝臓において分析した。さらに、腎メッセンジャーリボ核酸（mRNA）量を、配列決定（トランスクリプトミクス）を用いて評価した。ラットにsotorasibを0、60又は750 mg/kgでPO投与した。

sotorasibの60 mg/kg投与では、腎臓に変化はみられなかった。750 mg/kgの投与ではOSOMにおけるS3領域で近位尿細管の変性／壊死を特徴とする腎毒性が認められ、GLP条件下で実施したラットを用いた反復投与毒性試験の結果と一致していた（4.2.1項）。sotorasib投与に関連した腎臓の病理組織学的変化は、BUN、クレアチニン、KIM-1及びクラステリンの増加と相関していた。尿及び腎臓で検出された代謝物は、M62（リジン抱合体）、M30（システイン／グリシン抱合体）、M10、M20及びM61（システイン／グリシン抱合体の酸化体）、並びにM21（水素化体）であった。M62及びM21を除き、腎臓及び／又は尿中におけるsotorasibの代謝物は、メルカプツール酸経路による変換と一致していた。腎毒性がみられない60 mg/kgを投与した群で腎臓における薬物関連物質（DRM）の割合と比較して、M10は増加し、M62は750 mg/kg投与時に減少した。MALDI分析では、M10（システイン抱合体）及びM20（アセチルシステイン抱合体）が、sotorasibの750 mg/kg投与時における腎臓で最も顕著な代謝物であり、いずれも生成はOSOMに限定され、特に早期の時点（投与2、4時間後）で顕著であった。

本試験結果及びsotorasibの代謝経路から、腎毒性はsotorasibがメルカプツール酸経路により代謝された後に生成する毒性反応代謝物に起因するものと考えられた。

4.7.1.2　In vitroにおけるイヌ培養肝細胞を用いた酵素誘導試験

本探索的試験（153409試験）は、イヌを用いた3カ月間反復投与試験（4.2.2項）で認められた所見のフォローアップ評価、並びに培養イヌ肝細胞におけるsotorasib及びM24のCYP及びUDPグルクロン酸転移酵素（UGT）誘導能について、qRTPCR及びin vitro酵素活性アッセイにより評価した。イヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験では、肝細胞における酵素誘導を示唆する病理組織学的変化が、肝臓（肝重量増加を伴う肝細胞肥大）、下垂体（下垂体重量増加を伴う好塩基球肥大）及び甲状腺（コロイド減少及び甲状腺重量の減少を伴う濾胞上皮肥大）に認められた。本in vitro試験において、対照群と比較してUGT（UGT1A6：2.26倍、UGT2B31：5.65倍）のmRNAの発現と同時に、CYPアイソフォームの増加がみられた。これらの結果から、イヌを用いた3カ月間反復投与試験で認められた肝臓、下垂体及び甲状腺の変化は、肝細胞における酵素誘導に対する適応性変化と考えられた。

4.7.2　代謝物を用いた試験

ヒト血中代謝物であるM24、M10及びM18について、効力を裏付ける薬理試験又は副次的薬理試験、並びにin vitroでのhERGカリウムチャネルへの影響（モジュール2.6.2）及び遺伝毒性（モジュール2.6.6）を評価した。試験の結果、臨床的に問題となる安全性上の懸念は認められなかった。

4.7.3　不純物を用いた試験

sotorasibの原薬中に存在する9種類の不純物は、安全性の確認が必要な閾値を超えていた（ICH Q3A (R2), 2006）。9種類の不純物のすべてについて、ICH Q3Aガイドライン（ICH Q3A (R2), 2006）及びICH Q3Bガイドライン（ICH Q3B (R2), 2006）に従い安全性を確認した（モジュール2.6.6）。これらの不純物の非臨床安全性は、細菌を用いた復帰突然変異試験（153049試験、153050試験、

153051試験、153052試験、153053試験、153054試験、153494試験、154030試験、154031試験、154032試験）、並びにラット（152458試験、153451試験）及びイヌ（150429試験）を用いた一般的な28日間反復投与毒性試験により評価した。

4.7.4　光毒性試験

sotorasibは0.032から100 µg/mLの濃度において、3T3線維芽細胞を用いた探索的なin vitro光毒性試験で陰性であった（124666試験）。

4.7.5　その他の試験

その他毒性試験は実施していない。

5. 考察及び結論

sotorasibは、ファーストインクラスの強力な選択性の高い低分子のKRAS G12C阻害剤であり、KRAS G12Cに共有結合することで*KRAS p.G12C*変異を有する癌細胞に対する選択性を高めている（Canon et al, 2019）。sotorasibが結合することで、下流の癌シグナル伝達を阻害する。sotorasibがKRAS G12Cに不可逆的に共有結合し、その働きを阻害するためには、sotorasibが結合するポケット構造に反応性を有するチオール基が必要である。このチオール基は、KRASのアミノ酸位置12のシステイン（G12C）に由来することから、sotorasibはKRAS G12Cに対し特異性を有する。sotorasibの有するチオール反応部位が、KRAS G12Cのシステイン残基を共有結合性に修飾することで、KRAS G12CをGDPが結合した不活性型に固定する。これにより、KRASとRAF等のエフェクターとの相互作用も阻害され、p-ERKを含む増殖及び生存に関連する下流へのシグナル伝達が阻害される（Canon et al, 2019、Simanshu et al, 2017、Ostrem et al, 2013、Cully and Downward, 2008）。In vitro及びin vivo薬理試験を実施し、sotorasibの薬理作用について検討した。sotorasibは、in vitroにおいて組換えKRAS G12C細胞株を阻害したが、WTのKRAS細胞株にはほぼ作用しなかった。sotorasibは、*KRAS p.G12C*遺伝子変異を有する細胞株においてのみ、シグナル伝達を阻害し生存率を低下させたが、WTあるいは他の様々なKRAS変異細胞株には作用しなかった。sotorasibによりKRAS G12Cを阻害することで、増殖及び生存に関連する下流へのシグナル伝達を種々の段階で阻害することにより、アポトーシスマーカーが増加した。In vivo試験では、sotorasibは、KRAS G12Cを共有結合により修飾し、3 mg/kgの低用量で用量依存的かつ有意にp-ERKを阻害した。腫瘍異種移植モデルを用いた薬効薬理試験では、sotorasibは3 mg/kgで有意な腫瘍増殖抑制作用を示し、100 mg/kgで多くの*KRAS p.G12C*異種移植あるいはPDXモデルにおいてほぼ完全な腫瘍退縮作用を示した。sotorasibは、抗腫瘍炎症及び免疫応答を誘導し、腫瘍異種移植モデルにおいて、80%の動物で恒久的な腫瘍の完全退縮が認められた。併用投与試験において、MAPK経路及びAKTセリン／スレオニンキナーゼ（AKT）経路に対する種々の阻害剤、化学療法剤並びに免疫チェックポイント阻害剤との併用で抗腫瘍活性の有意な増強が認められたが、毒性の増強は認められなかった。これらの結果は、sotorasibがKRAS G12C変異を有する進行癌に対し、有効な抗癌作用を有する可能性を示している。

副次的及び安全性薬理試験（モジュール2.6.2 4項）、並びに毒性試験を含む包括的な安全性評価を実施し、sotorasib、並びにラット、イヌ及びヒトの血中代謝物（M10、M18及びM24）及び特定した不純物（計9種類の不純物）の非臨床安全性プロファイルについて評価した。sotorasibを用いた試験では、WTのKRASと比較して、KRAS G12Cを有する細胞株に対して高い選択性を示し、顕著なオフターゲット作用は認められなかった。*KRASp.G12C*変異は、腫瘍組織でのみ認められており、正常組織には存在していない（AACR GENIE Consortium, 2017、Karnoub and Weinberg, 2008）。薬剤の標的が腫瘍特異的であることと一致して、腫瘍を有さない正常な動物を用いたGLP条件下で実施した主要な非臨床毒性試験（ラット及びイヌ）では、標的に対する薬理作用に関連した明らかなオンターゲット毒性は認められず、ラット及びウサギにおいて胚・胎児発生への直接的な影響も認められなかった。sotorasibが標的に関連した毒性を示さないことは、最近承認された及び／又は開発された、他の新規低分子腫瘍薬と比較して異なる（Barrow and Schmitt, 2017、Keller et al, 2015、Maziasz et al, 2010）。癌特異的な選択的キナーゼ阻害剤等の新規低分子化合物の多くは、当初臨床において最小の副作用で有効性を示すことが期待されたが、これまで実現できていない。これら新規の標的

の多くは癌細胞に特有のものではなく、ほとんどは細胞周期、アポトーシス、細胞増殖及び発生過程において重要な役割を果たしていることから、それらの標的を介した一次的な薬理作用に起因した一定のレベルの標的毒性が予想され、また、一部の正常組織及び細胞、特に急速に増殖する細胞の機能又は恒常性に影響を及ぼす。これら新規かつ低分子の分子標的治療薬では、多くみられる有害事象のほとんど概ね忍容性が認められるものの、広範囲な有害作用が観察される。一般的に毒性発現の標的臓器は消化管、造血系、雌雄生殖器であり、これらの臓器でみられる毒性所見は用量制限毒性になりうる。また、新規の抗悪性腫瘍薬が標的とするシグナル伝達経路や細胞マーカーの多くは発生過程にも関与することから、腫瘍形成過程に関与する経路を阻害する低分子阻害剤のほとんどで、催奇形性を含む胚・胎児発生に対し有害作用が予想される（Barrow and Schmitt, 2017）。
以上、非臨床試験におけるsotorasibの安全性プロファイルは、他剤と比較して極めて優れていると考えられ、KRAS G12Cを特異的に阻害するファーストインクラスの薬剤として、KRAS G12C変異を有する進行NSCLC治療に対する良好なベネフィット／リスクプロファイルを裏付けている。

臨床試験（20170543試験）における用量でのヒト曝露量及び曝露量比を表 2に示す。被験者にsotorasibを180、360、720及び960 mgの用量でQD投与したときに観察された平均曝露量（20170543試験）は、GLP条件下で実施したラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験においてSTD_{10}である180 mg/kg投与時に観察された曝露量（150432試験）より低かったものの、GLP条件下で実施したイヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験において、HNSTDである1000 mg/kg投与時に確認された曝露量（150433試験）より高かった。これらの臨床試験における曝露量では、被験者において用量制限毒性は認められなかった（モジュール2.7.4）。

表 2　KRAS p.G12C変異を有する固形腫瘍を有する進行癌患者における曝露量とSDラット及びイヌを用いたsotorasibの反復PO投与毒性試験における曝露量との比較

	Human Exposure[a] (Day 8)		Exposure Multiple 3-month Rat STD_{10}		3-month Dog HNSTD	
Clinical Dose (mg/day)	AUC_{0-24} (µg·h/mL)	C_{max} (µg/mL)	AUC [b] (µg·h/mL)	C_{max} [b] (µg/mL)	AUC [c] (µg·h/mL)	C_{max} [c] (µg/mL)
180	31.7	6.44	2.0	1.6	0.4	0.7
360	38.9	6.31	1.6	1.6	0.4	0.7
720	42.1	5.45	1.5	1.9	0.3	0.8
960	38.2	5.78	1.7	1.7	0.4	0.8

AUC = area under the concentration-time curve; AUC_{0-24} = AUC from time 0 to 24 hours after dosing; AUC_{last} = AUC from time 0 to last quantifiable concentration (up to 24 hours); BID = twice daily; C_{max} = maximum observed drug concentration during a dosing interval; HNSTD = highest non-severely toxic dose; *KRAS p.G12C* = KRAS gene with a mutation resulting in a G12C amino acid substitution; STD_{10} = severely toxic dose in 10% of animals.

[a] Human exposures (AUC_{0-24} and C_{max}) on day 8 from Study 20170543. Part 1A Cohort 1: 180 mg, N = 6; Cohort 2: 360 mg, N = 24; Cohort 3: 720 mg, N = 11; Part 2A: 960 mg, N = 53.

[b] Exposure multiples for AUC and C_{max} based on mean AUC_{last} (up to 24 hours) and C_{max} of 63.7 µg·h/mL and 10.1 µg/mL, respectively, after day 91 dosing of 180 mg/kg (STD_{10}) in rats (Study 150432).

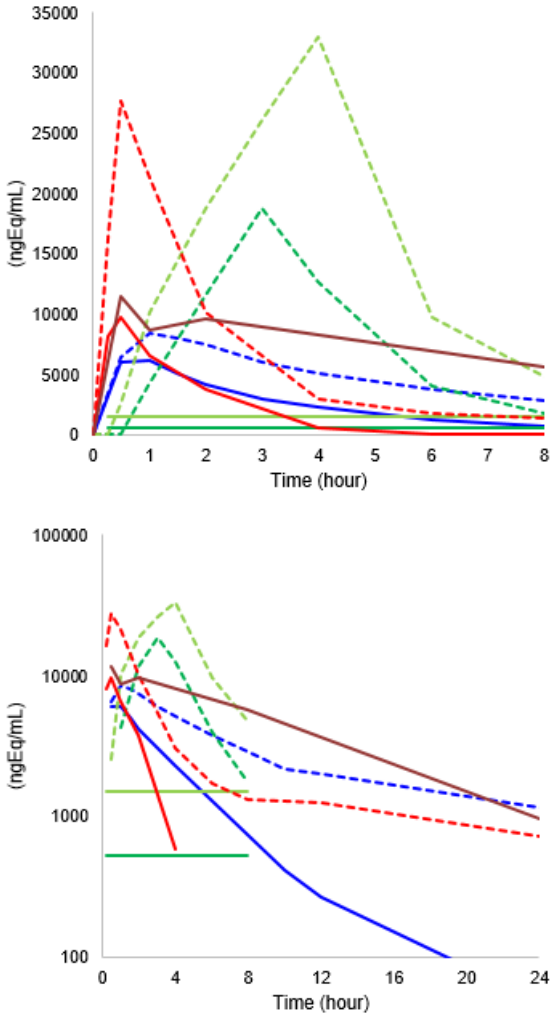
c Exposure multiples based on mean AUC_{last} (up to 24 hours) and C_{max} of 14.1 µg·h/mL and 4.63 µg/mL, respectively, after day 90 dosing at 1000 mg/kg/day (500 mg/kg BID, HNSTD) in male and female dogs (Study 150433).

Source: Studies 20170543, 150432, and 150433.

血漿中におけるsotorasibの未変化体濃度に基づく曝露量比は低い傾向にあり、特にイヌにおける曝露量に対する曝露量比は1を下回っていた（表 2）。曝露量比が低いことは、該当する動物種において代謝速度が速いことが一因と考えられる。ラット（152495試験）、イヌ（153304試験）及びヒ

ト（20190321試験）を用いたマスバランス試験から、[^{14}C]-sotorasib由来放射性物質すべての曝露を反映する総放射能濃度は、sotorasibの未変化体及び代謝物の両方を含め、ヒトの曝露量と比較してラット及びイヌで高いと考えられる（図 2）。ラットを用いたマスバランス試験で用いた用量である60 mg/kgは、3カ月間反復投与毒性試験で用いた最低用量であった。イヌのマスバランス試験では、500 mg/kgを用いた。イヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験では、sotorasibを500 mg/kgまでBID投与した（1000 mg/kg/day）。ラット（ラット腎組織で生成された代謝物に起因すると推定される腎毒性）及びイヌ（肝臓、下垂体、甲状腺の適応性変化）で認められた主な変化は、sotorasibの代謝物に起因するものであった。したがって、血漿中におけるsotorasibの未変化体濃度に基づく曝露量比が低いことは、安全域が低い又は不足していることを示すものではなかった。それに代わり、ラット及びイヌにおけるsotorasib及びその代謝物の総曝露量は、臨床で認められた曝露量と比較して高いことから、非臨床毒性試験におけるsotorasibの毒性は十分に評価されたと判断した。

図 2　ラット、イヌ及びヒトを用いたマスバランス試験におけるsotorasibの平均血漿中曝露量及び総放射活性量の比較



Upper graph represents linear scale and lower graph represents log-linear scale. Time-course of mean plasma concentration of sotorasib and total radioactivity in the rat (red lines, 60 mg/kg [^{14}C]- sotorasib PO), dog (green lines, 500 mg/kg [^{14}C]- sotorasib PO) and human (blue bold lines, 720 mg/human [^{14}C]- sotorasib PO).

Solid lines: sotorasib concentration. Dotted lines: total radioactivity concentration. Dark green line: male dog; light green line: female dog. In the dog mass balance study, no time-course of sotorasib concentration was measured, but mean sotorasib concentration was determined in the pooled plasma samples collected from 0.25 to 8 hours postdose. Solid brown line: sotorasib concentration in the plasma from rat that received a single dose of sotorasib at 750 mg/kg in the GLP 3-month study.

Quantitation limits: rat: 50.4 ng/mL (mass balance for 60 mg/kg) and 1 ng/mL (3-month study), dog: 2140 ng/mL, and human: 10 ng/mL

Source: Studies 152495, 150432, 153304, and 20190321

ラットにおける腎毒性

ラットを用いた反復投与毒性試験において、毒性の標的器官は腎臓であった（4.2.1項）。ラットにおける腎毒性は、sotorasibのメルカプツール酸経路による代謝後に推定される毒性反応性代謝物の生成に起因していた。イヌでは腎毒性が認められなかったこと（4.2.2項）に加え、これまでのヒトを対象とした臨床試験で同様の腎毒性の兆候は認められていないこと（モジュール2.7.4）から、sotorasibに関連した腎毒性はラット特異的であると考えられる。この仮説をさらに裏付け、ラットで認められた腎毒性の機序を検討する目的で、一連の探索的毒性試験を実施した（4.7.1.1項）。

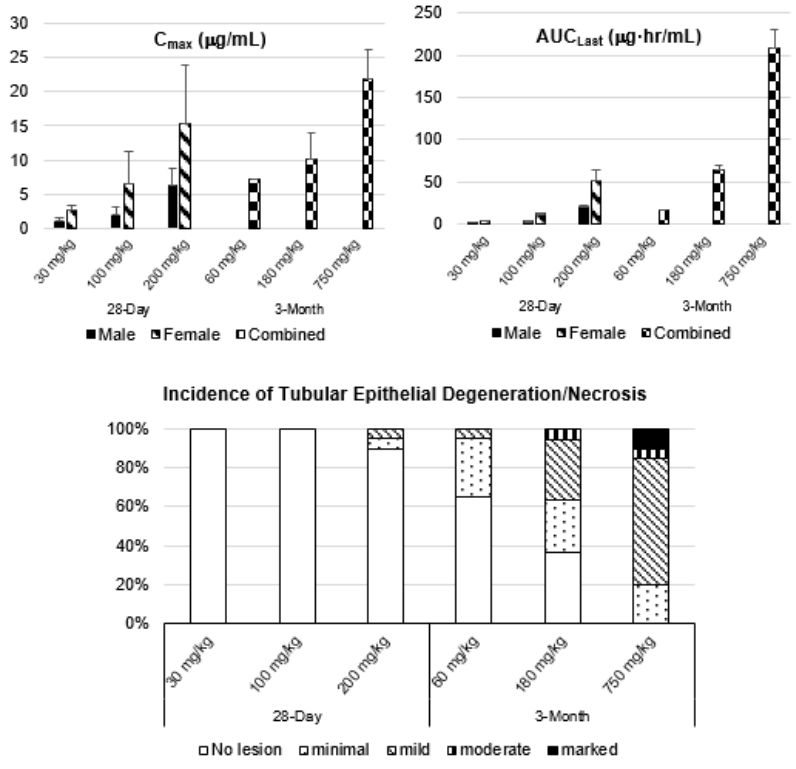
a.　ネフロンの標的部位

ラットの腎毒性の特徴は、OSOMにおける主に近位尿細管に限局した尿細管上皮の変性／壊死であった（4.2.1項）。ネフロンのこの部分はS3領域又は直部とも呼ばれ、代謝酵素に富んでいる（Cooper and Hanigan, 2018）。ヘンレ係蹄の太い上行脚及びOSOMを通過する集合管は、影響を受けなかった。これらのことから、sotorasibに関連した腎毒性の病理組織学的特徴は、ネフロンの非常に特異的な領域が影響を受けることであった。

b.　曝露量及び投与期間依存性毒性

尿細管変性／壊死の発現率及び重症度は、曝露量及び投与期間に依存していた（図 3）。ラットを用いた28日間反復投与毒性試験（150428試験）では、200 mg/kg投与群の20例中2例（検討した最高用量）において腎尿細管の変性／壊死が認められたが、この変化は軽微から軽度であった。ラットを用いた3カ月間反復投与毒性試験（150432試験）では、同じ腎臓の変化がより慢性的に進行し、より多くの尿細管への影響が認められた。この変化は、より高い曝露量及びより試験期間が長いことに起因していた。

図 3　ラットを用いた28日間及び3カ月間反復投与毒性試験におけるsotorasibの曝露量及び尿細管上皮変性／壊死の発現率／重症度の比較



AUC = area under the concentration-time curve from time zero to the time of the last quantifiable concentration; C_{max} = maximum observed drug concentration during a dosing interval. Top graphs: systemic exposures to sotorasib (C_{max} and AUC) after the last dose. Bottom graph: % incidence/severity of renal tubular epithelial degeneration/necrosis.

Source: Studies 150428 and 150432

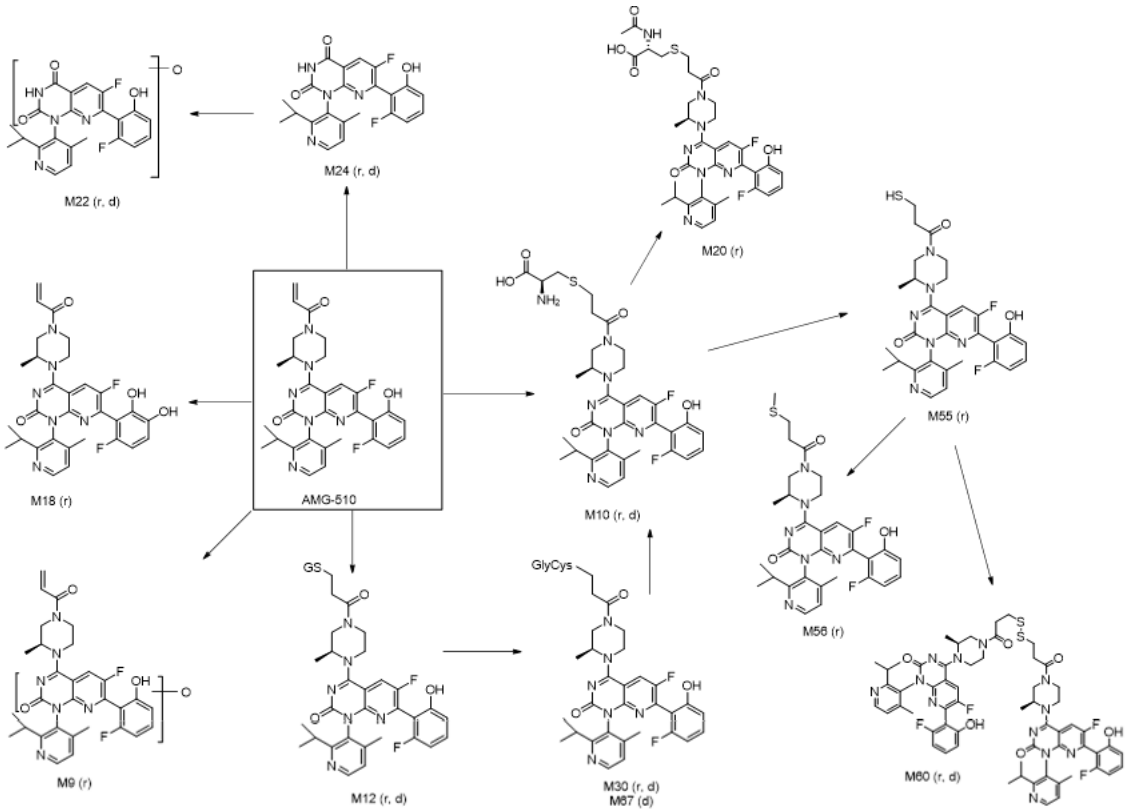
c. sotorasib誘発腎障害の経時変化

ラットを用いた探索的な7日間投与作用機序試験（153127試験）を実施し、sotorasib誘発腎障害の経時変化、腎障害のバイオマーカー、並びに局所及び全身性の代謝物について検討した。ラットを用い、sotorasibを60又は750 mg/kgでPO投与した（3カ月間反復投与毒性試験における低用量及び高用量を使用; 150432試験）。病理組織学的変化を、sotorasibの750 mg/kg単回投与後2、4及び8時間、並びに60及び750 mg/kgの1、3又は7日間反復投与の24時間後に測定した。腎尿細管の変性／壊死は、sotorasibの750 mg/kg投与群でのみ認められた。投与2、4及び8時間後に、OSOMに限局した近位尿細管上皮の限局性（軽微）からびまん性（軽度）の空胞化がみられ、尿細管変性／壊死の重症度はDay 2で顕著に増加し、その後Day 4においてしばしば異栄養性石灰化を伴う広範な壊死としてピークに達した。Day 8では、一部のラットの腎臓において異栄養性石灰化の大きな層が認められたが、他のラットの腎臓では石灰化及び尿細管再生の所見の発現は極めて少なかった。これらの病理組織学的所見は、OSOMにおけるネフロンのS3領域での尿細管壊死と一致しており、初回投与後24時間以内に発現し、その後の投与期間中に感受性の低い尿細管上皮細胞の修復及び適応性変化が認められた。

d. sotorasibの代謝経路

ラット、イヌ及びヒトから得られた、プールした血漿サンプルを用いて血中代謝物を評価した結果（153303試験）、sotorasibは主に酸化的N-脱アルキル化（M24及びその下流代謝物まで）、グルタチオン抱合（M12及びその下流代謝物まで）及び酸化（M18まで）を受けることが確認された（図 4）。BDC未処置及びBDC処置ラットを用い、[^{14}C]-sotorasibを60 mg/kgで単回PO投与したときの代謝及び排泄を評価した結果、アクロレイン部位でのグルタチオン抱合（Michael付加）により、胆汁中の主要代謝物であるが血中の主代謝物ではないグルタチオン抱合体、M12が生成された（152495試験）。次いで、グリシンアミノ酸のアミド加水分解により、胆汁中における主代謝物ではないシステイニルグリシン抱合体であるM30が得られた。M30の逐次加水分解により、血漿中の主要な代謝物であるが胆汁中の主代謝物ではないシステイン抱合体であるM10が得られた。M30は、ヒドロキシシステイニルグリシン抱合体であるM61にも代謝された。M10のN-アセチル化は、主要な胆汁中、マイナーな糞中、微量な尿中及び血漿中で代謝物であるメルカプツール酸、M20を生成した。これは、システインS共役β-リアーゼ及び／又は腸ミクロフローラによって媒介されるシステイン部分の開裂により、糞便の微量代謝物としてジヒドロメルカプト代謝物であるM55が生成されたものと考えられる。M55の二次メチル化により、血漿中及び糞中で主要ではなく、尿中で微量な代謝物であるメチルチオ代謝物であるM56が認められた。

図 4　ラット及びイヌにおけるsotorasibの代謝経路



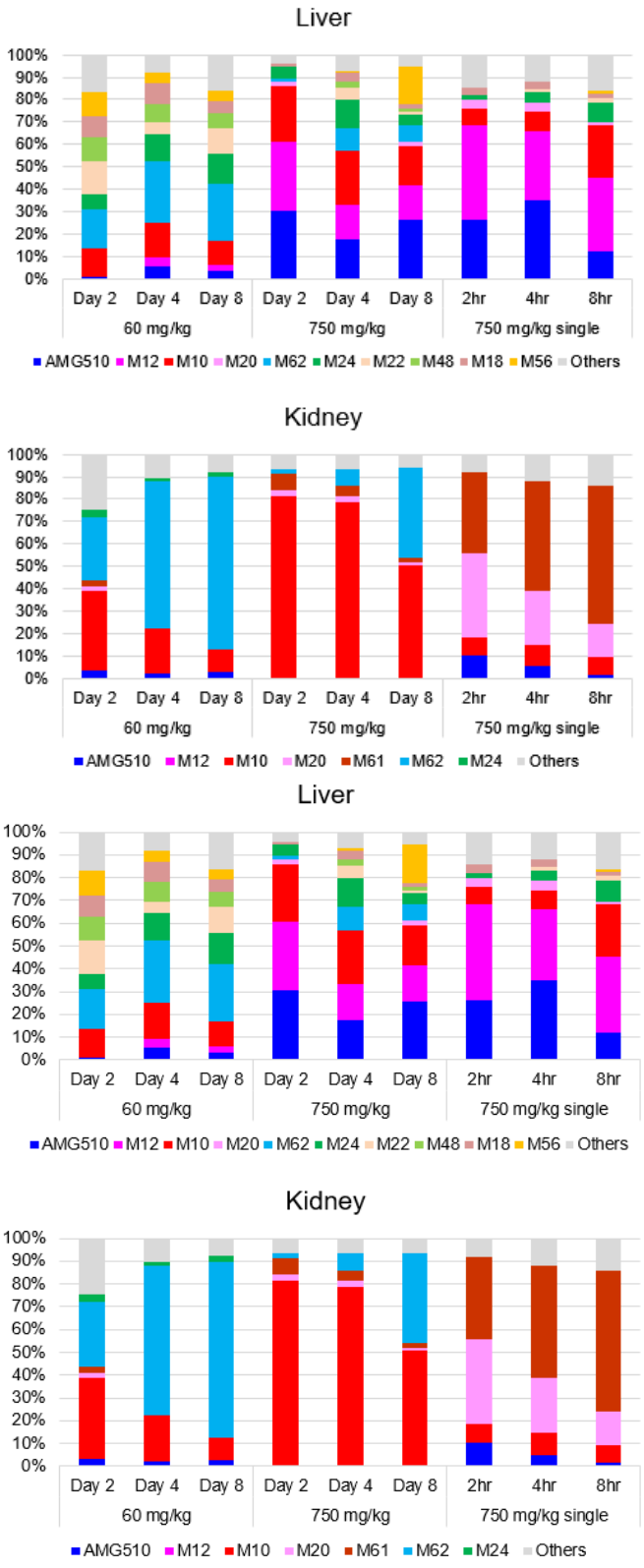
AMG 510 = sotorasib; d = dog; r = rat
Source: Studies 152495, 153303, and 153304

e.　腎臓におけるメルカプツール酸経路を介した代謝物の分析：腎毒性を発現する用量と発現しない用量との比較

代謝物について質量分析を実施した結果、腎障害と腎組織におけるグルタチオン抱合体であるM12（メルカプツール経路の代謝物）の下流代謝物の増加に相関がみられた（図 5）。sotorasibの60と750 mg/kg投与との間では、血漿中における代謝物プロファイルに明らかな差は認められなかったが、尿、肝臓及び腎臓中におけるグルタチオン抱合体であるM12の下流代謝物は、750 mg/kgでは60 mg/kgと比較して過度に増加した。腎臓では、システイン抱合体であるM10及び総メルカプツール酸経路における代謝物（M10、M20及びM61）が、750 mg/kgの投与Day 2にそれぞれ81.3及び91.4%のDRMがみられた（単回投与24時間後）。これとは異なり、投与Day 2において、sotorasibの750 mg/kgの投与で腎臓中に検出可能な未変化はほとんどみられなかったが（1.0%未満のDRM）、60 mg/kg投与群では3.3%存在した。もう1種類の抱合代謝物であるリジン抱合体であるM62は、sotorasibの750 mg/kgの投与でDRMの1.9%のみであったのに対し、60 mg/kgの投与ではDay 2において28.4%であった。尿細管における変性／壊死に対する尿細管再生の所見と一致して、システイン抱合体であるM10及び総メルカプツール酸経路を介した代謝物の量は経時的に減少し、750 mg/kgの投与ではDay 8において、それぞれDRMとして50.6及び54%が確認された。一方、M62は、60及び750 mg/kgの投与により経時的に増加した。本試験における急性期（sotorasibの750 mg/kg単回投与の2～8時間後）では、メルカプツール酸経路による代謝物も主な代謝物として認められた。無毒性量と比較して、腎毒性発現量で腎組織中に過度に増加したメルカプツール酸経路による代謝物が確認

されたことは、メルカプツール酸経路で生成された代謝物が、sotorasib投与に起因した尿細管障害と関連することが示された。

図 5　sotorasibを60 mg/kg又は750 mg/kgでラットに投与したときの質量分析による血漿、尿、肝臓及び腎臓中の薬物関連物質の割合（%DRM）



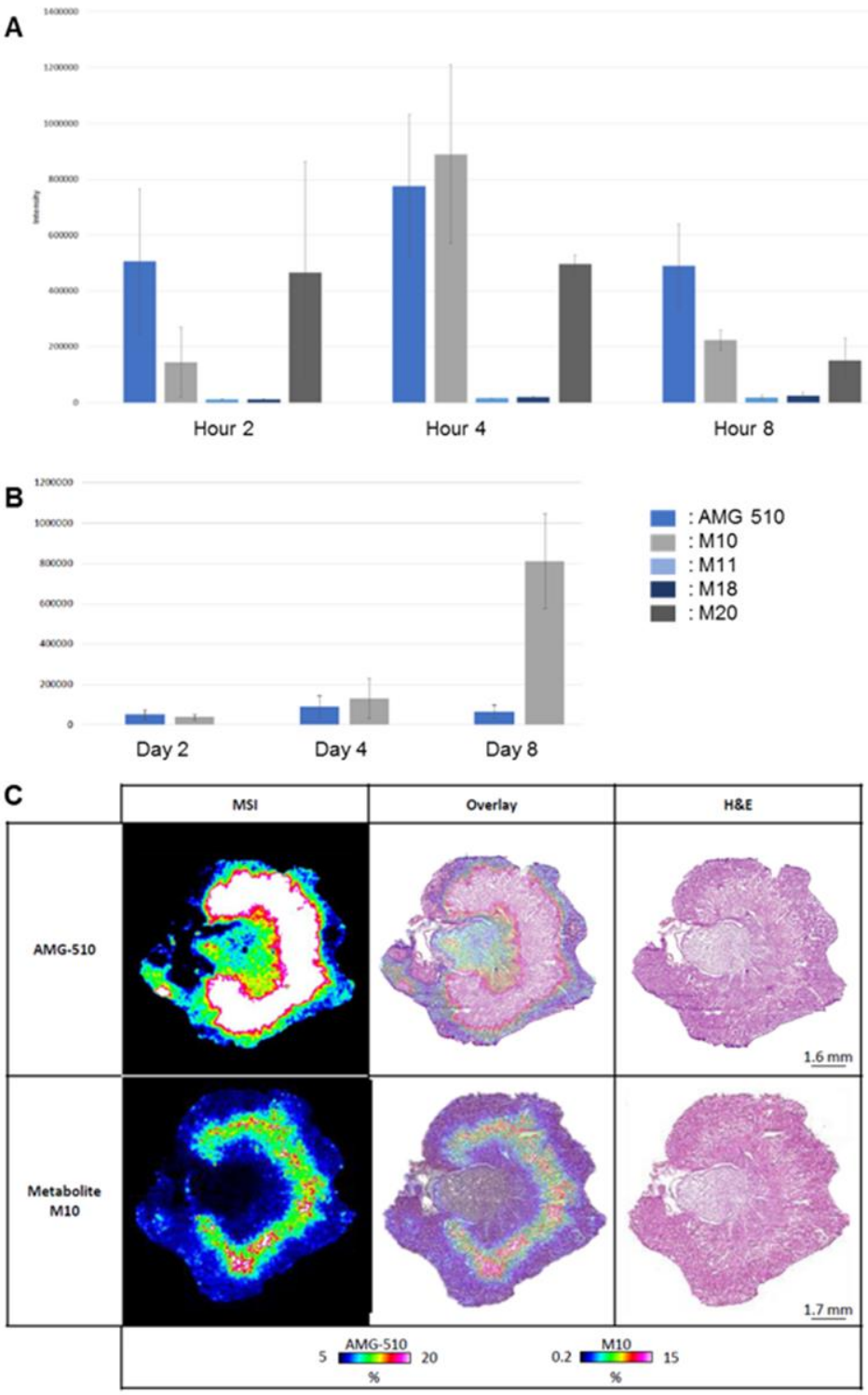
AMG 510 = sotorasib; Percent drug related material (%DRM) was quantitated by mass spectrometry signal response. Mercapturate pathway metabolites include M12: glutathione conjugate, M30: cysteinylglycine conjugate, M10 cysteine conjugate, M20 N-acetylcysteine conjugate (mercapturic acid), M61: hydroxy-cysteinylglycine conjugate.

Source: Study 153127

f. 腎臓のMALDI解析を用いたOSOMにおける腎障害とシステイン抱合体であるM10及びアセチルシステイン抱合体であるM20の共存

探索的な7日間投与による作用機序検討試験において、腎臓のMALDI解析を実施した結果、OSOMにおいて限局性の腎障害とグルタチオン抱合体であるM12の下流代謝物（メルカプツール経路による代謝物）の増加との間に強い相関が認められた（153127試験）。MALDI解析では、主にsotorasibの未変化体と及びグルタチオン抱合体であるM12の下流代謝物（システイン抱合体であるM10及びアセチルシステイン抱合体であるM20）が、750 mg/kg投与でのみ検出された（図 6A、図 6B）。sotorasibは、すべての時点で腎臓全体に検出され、特定の部位に限局しなかった。一方、投与2及び4時間後におけるMALDI解析でのM10及びM20のシグナルは、尿細管上皮の変性／壊死領域であるOSOMに限定されていた（図 6C）。質量分析（図 5）及びMALDI解析の結果、腎毒性を示す用量では腎組織中のメルカプツール酸経路による代謝物が非毒性用量と比べて過度に増加したことから、腎臓のMALDI解析において、メルカプツール酸経路を介した代謝物とOSOMにおける尿細管障害が共存したことは、メルカプツール酸経路を介した代謝物（M10及びM20）がsotorasib投与に起因した尿細管障害に関連することを示している。

図 6　ラットにsotorasibの750 mg/kgを投与したときのsotorasib及びその代謝物の平均シグナル強度並びに腎分布：MALDI解析の結果



AMG 510 = sotorasib; H&E = hematoxylin and eosin; MSI = mass spectrometry imaging.

Average intensity data of AMG 510 (AMG 510) and metabolites in the kidney from rats administered 750 mg/kg at 2, 4 and 8 hours postdose (A), and on days 2, 4 and 8 (24 hours after the last dose) (B). Bars represent standard deviation of the mean. Typical distribution pattern of AMG 510 and cysteine conjugate M10 (animal 5006, 750 mg/kg, sample collected at 4 hours postdose) (C).

Source: Study 153127

g. sotorasib誘発腎毒性とシステインS抱合体β-リアーゼ介在性生体内活性化との関連

7日間投与作用機序試験（153127試験）における、無毒性量と比較して腎毒性量での腎組織中のメルカプツール酸経路による代謝物の不均衡な増加、並びに本項に記載した様々な腎毒性物質に関する公表情報から、sotorasib誘発腎毒性は、メルカプツール酸経路及びシステイン共有β-リアーゼ経路を介した、推定される腎内の硫黄含有代謝物の局所での形成に起因すると考えられた。アクロレインを含む多くの腎毒性物質が存在しており、その作用機序は腎特異的な代謝に依存している（Barnett and Cummings, 2018、Perazella, 2018、Horvath et al, 1992）。腎における代謝生成物の活性化による腎毒性の典型的なパターンの1つは、メルカプツール経路を介した反応性を有するβ-リアーゼが仲介する腎毒性代謝物の生成であり、これはアクロレイン部位を有する低分子の抗癌作用を有する共有結合性阻害剤、イブルチニブ（Baillie, 2020、Rood et al, 2021）を含む各種の生体異物により報告されている（Rood et al, 2021、Cooper and Hanigan, 2018、Testa and Clement, 2015、Cooper et al, 2011、Miller et al, 2010、Zhang and Hanigan, 2003、Townsend and Hanigan, 2002、Tsuchida, 2002）。この過程は、血中及び組織中におけるグルタチオンS抱合体の形成から始まる。体内でのグルタチオンS抱合体の形成は、一般に肝臓で生じるが、近位尿細管のS3領域でもみられる（Lock and Antoine, 2018）。グルタチオンS抱合体は腎臓を通過する際、近位尿細管細胞の管腔表面に発現するγ-グルタミルトランスペプチダーゼによってシステイニルグリシンS抱合体に切断される。システイニルグリシンS抱合体は、近位尿細管上皮細胞の管腔表面にも発現するアミノジペプチダーゼによってさらに代謝される。ラットでは、γ-グルタミルトランスペプチダーゼ及びアミノジペプチダーゼはいずれも近位尿細管刷子縁膜に高濃度で局在している（Cooper and Hanigan, 2018、Lock and Antoine, 2018）。通常、システインS抱合体は対応するNアセチルLシステインS抱合体（メルカプツール酸）によりNアセチル化される。メルカプツール酸は、一般的に親化合物よりも水溶性が高く、解毒段階として尿中に排泄されやすい（Cooper and Hanigan, 2018）。しかし、用量が増加した場合、腎臓中のシステインS抱合体の濃度が高くなるため、メルカプツール酸の解毒段階が飽和する可能性がある。その後、過剰のシステインS抱合体はシステインS抱合体β-リアーゼによる代謝に利用され、反応性の高い硫黄含有チオールを形成する。ラットでは、近位尿細管のS3領域はハロゲン化アルケン由来のシステインS抱合体に対して特に脆弱である（Cooper and Hanigan, 2018、Lock and Antoine, 2018）。

sotorasibの推定代謝経路は、メルカプツール酸及びβ-リアーゼ経路の代謝変換と一致していた（図4）。ラットを用いた7日間反復投与毒性試験（153127試験）において、メルカプツール酸経路による代謝物（M12、M30、M10、M20及びM61）は、sotorasibが腎毒性量を発現する用量において、無毒性量と比較して腎臓並びに肝臓及び尿中で不均衡に増加した。sotorasibが腎毒性を発現する用量で、M12、M10及びM20が肝臓中に多く生成されたことは、これらの代謝物の腎臓への輸送が増加したことに寄与していると考えられ、その結果、M10（81.3% DRM）及び総メルカプツール酸経路を介した代謝物（91.4% DRM）の腎臓への移行が増加した（図 5）。また、MALDI解析の結果、代謝物であるM10及びM20は尿細管における変性／壊死の部位であるOSOMに特異的に分布することが示された（図 6）。腎組織中のシステインS抱合体であるM10の分布が大きいことが、システインS抱合体であるβ-リアーゼによって媒介された、不安定な硫黄含有代謝物（チオール、M55又は推定される更なる開裂硫黄含有代謝物）への生体変換に寄与していると考えられた。この代謝物は共有

結合により細胞高分子と結合し、細胞プロセスの破壊及び細胞死を引き起こす可能性がある。sotorasib誘発性の腎障害と、sotorasib及びその代謝物の腎排泄との相関、並びにsotorasibの腎毒性を示さない用量と腎毒性を示す用量との間の腎代謝物の排泄の差については、表 3に要約する。

表 3　腎障害とsotorasib／代謝物の動態との関連

		Renal disposition of AMG 510 and metabolites	
Phase	Renal injury observed at 750 mg/kg	Non-nephrotoxic dose (60 mg/kg)	Nephrotoxic dose (750 mg/kg)
2, 4, and 8 hours postdose	Tubular epithelial vacuolation, focal (minimal) to diffuse (mild), mostly restricted to the proximal tubules in the OSOM	No data available	MALDI: M10 and M20 colocalized in the OSOM Mass spectrometry: M10, M20 and M61 predominant in the kidney
Day 2	Tubular degeneration/necrosis, marked BUN/creatinine increase, moderate	AMG 510: 3.3%DRM M10: 35.7%DRM M10+M61+M20: 40.5% M62: 28.4% DRM	M10 disproportionally increased AMG 510: Not detected M10: 81.3% DRM M10+M61+M20: 91.4% M62: 1.9% DRM
Day 4	Tubular degeneration/necrosis, marked, with dystrophic mineralization BUN/creatinine increase, marked	AMG 510: 2.1%DRM M10: 20.2%DRM M10+M61+M20: 20.2% M62: 65.5% DRM	M10 disproportionally increased AMG 510: Not detected M10: 78.7% DRM M10+M61+M20: 85.7% M62: 7.9% DRM
Day 8	Tubular degeneration/necrosis, mostly moderate, with regenerating tubular epithelium (BUN/creatinine decreased compared to days 2 and 4)	M10 decreased, M62 increased compared to days 2 and 4 AMG 510: 2.7%DRM M10: 9.8%DRM M10+M61+M20: 9.8% M62: 77.4% DRM	M10 decreased, M62 increased compared to days 2 and 4 AMG 510: Not detected M10: 50.6% DRM M10+M61+M20: 54.0% M62: 39.7% DRM

AMG 510 = sotorasib; BUN = blood urea nitrogen; DRM = drug related material; M10 (cysteine conjugate), M61 (hydroxy-cysteinylglycine conjugate), M20 (mercapturic acid, or N-acetylcysteine conjugate). M10, M61 and M20 are all mercapturate pathway metabolites. M62: lysine conjugate; OSOM = outer stripe of the outer medulla.

Source: Study 153127

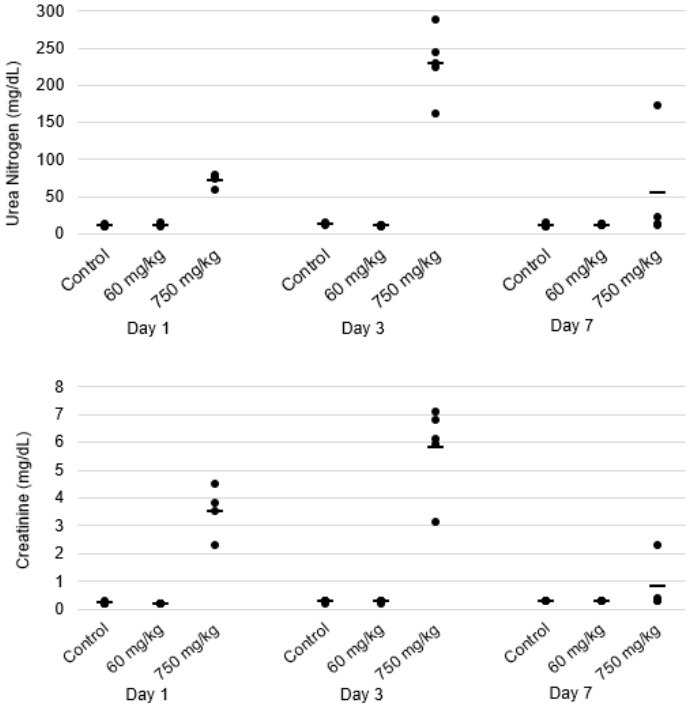
h.　ラット特異的なsotorasib誘発腎毒性

ラットはsotorasib誘発腎毒性に感受性を示すものの、同様の腎毒性はイヌを用いた毒性試験では観察されず、現在までのsotorasibを用いた臨床試験において、急性腎毒性等同様のシグナルは認められていない。イヌでは、最長3カ月間の反復投与期間及び検討した最高用量（500 mg/kg BID又は1000 mg/kg/day）まで腎毒性は認められなかった。探索的な7日間投与作用機序検討試験（153127試験）では、750 mg/kg投与での腎尿細管変性／壊死は、初期にみられるBUN、クレアチニン、KIM-1及びクラステリンなどの血清又は尿中バイオマーカーと相関していた（Day 2及び4、図 7、図 8、図 9）。このことから、毒性学的に有意な腎毒性は、腎傷害を反映するこれらバイオマーカーによりモニター可能と考えられた。sotorasibを用いた臨床試験では、顕微鏡による尿沈渣検査とともに、定期的な血清クレアチニン及び／又は推定クレアチニンクリアランスの測定により腎機能のモニタリングが行われている。これまでの臨床試験において、ラットを用いた毒性試験と同様の腎毒性を示唆する所見は認められていない（モジュール2.7.4）。

ラット腎組織におけるシステインS抱合体であるM10の体内動態は、システインS抱合体であるβ-リアーゼを介した、腎毒性を示す不安定な硫黄含有代謝物の活性化に寄与すると考えられた。ラットを用いたマスバランス試験（152495試験）では、M10（[^{14}C]-sotorasib/gあたり6590 ng）の血漿中でのC_{max}は、sotorasibの60 mg/kg単回PO投与後0.5時間で認められた。絶対的曝露量は測定していないが、ラットに腎毒性を誘発する用量である750 mg/kgを投与したときのM10の曝露量は、ラットを用いたマスバランス試験で60 mg/kg投与時に認められたM10の曝露量を大きく上回ると予測される。ヒトにおけるM10の血漿中C_{max}は投与5.9～24時間後に認められ、投与Day 1で1200 ng/mL、投与Day 8で2610 ng/mLであった（モジュール2.7.2 表3）。したがって、投与直後のM10の濃度が高いほど、ラットの腎毒性に対する感受性が高くなる可能性がある。

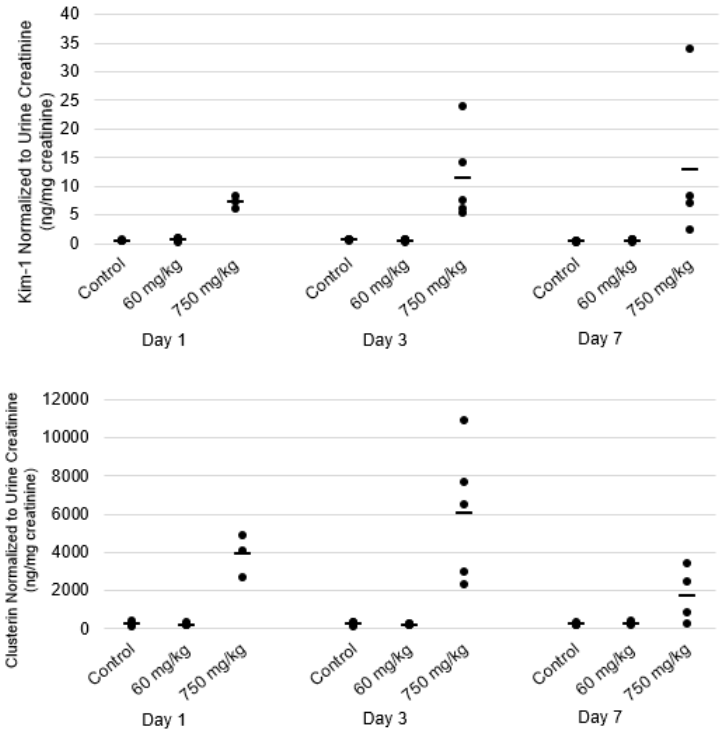
腎毒性の発現過程に関与する、様々な第I相及び第II相代謝酵素がネフロンに沿って発現し、これらの酵素の発現は種に依存している（Barnett&Cummings, 2018、Cooper and Hanigan, 2018）。ラット腎組織は、ラット腎組織におけるシステインS結合体β-リアーゼの特異的活性が高く（Anders, 2004b、Gul Altuntas and Kharasch, 2002、Iyer and Anders, 1996、Mccarthy et al, 1994、Green et al, 1990、Lash et al, 1990）、アロメトリックスケーリングにより（Anders, 2004a）、β-リアーゼ介在性の生物活性化に起因する腎毒性に対してヒトよりも感受性が高いことが報告されている。また、ラットでは、抗レトロウイルス薬であるエファビレンツを投与した場合、β-リアーゼが仲介する腎毒性に対して感受性が高くなることが報告されている（Mutlib et al, 2000）。sotorasibの臨床試験及び非臨床安全性データ、並びにメルカプツール経路に関連する腎毒性の報告から得られた科学的根拠の重要性から、ヒトにおけるsotorasib投与に関連した腎毒性のリスクは低いと考えられた。

図 7　ラットにおけるsotorasib投与に関連した血中尿素窒素及び血清クレアチニンの変化



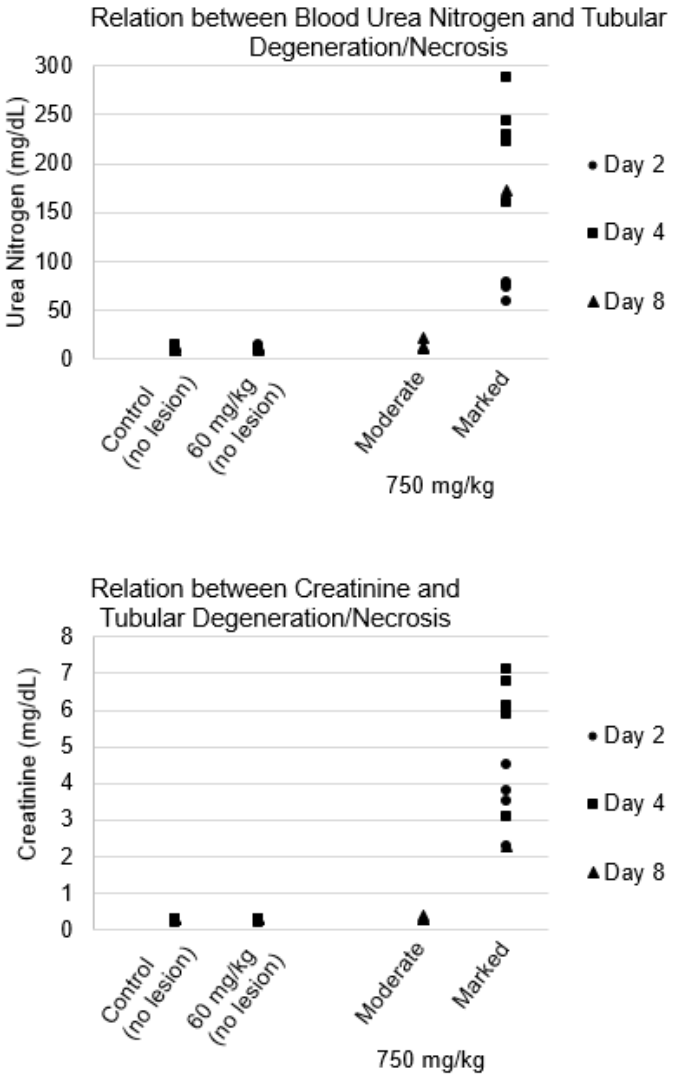
Each dot represents each an individual value and the dash is the group mean.
Source: Study 153127

図 8　ラットにおけるsotorasib投与に関連した尿中バイオマーカーの変化



Kim-1 = kidney injury molecule-1.
Each dot represents each an individual value and the dash is the group mean.
Source: Study 153127

図 9　ラットにおける尿中バイオマーカーの変化と腎尿細管障害との関連



Each dot represents each an individual value and the dash is the group mean.
Source: Study 153127

i.　イヌにおける肝臓、下垂体及び甲状腺の変化

イヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験（150433試験）では、sotorasib投与に関連する変化が認められ、UGTに関連する肝酵素誘導及び二次性の甲状腺機能低下と一致していた（Houle st al, 2014、Zabka et al, 2011）。主な変化として、肝臓重量の増加を伴う小葉中心性肝細胞肥大、甲状腺濾胞上皮肥大、甲状腺重量の減少を伴う甲状腺濾胞のコロイド減少、下垂体重量の増加を伴う下垂体前葉における下垂体好塩基球の肥大であった。高用量投与群（1000 mg/kg/day）の2例において甲状腺萎縮の形態学的特徴が認められたが、これは加齢に伴う自然発生的な変化（Benjamin et al, 1996、Laurberg, 1989）が増悪したことによるものと考えられた。肝臓、下垂体及び甲状腺におけるこれらの病理組織学的変化は、臨床病理学的パラメータの変化（コレステロール、トリグリセリド及びBUNの増加）及び肉眼観察で認められた胆嚢における胆泥を伴っていた（Mesich et al, 2009）。肝細胞肥大は、アラニンアミノトランスフェラーゼ又はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの変化又は退行性の変化を伴わなかった。

肝ミクロソーム酵素は、甲状腺ホルモン恒常性の維持に重要である。チロキシン（T4）及びトリヨードチロニン（T3）の排泄における主要代謝経路の一つは、UGTによるグルクロン酸抱合である（Richardson and Klaassen, 2010）。グルクロン酸抱合の増加は甲状腺ホルモンの排泄を増加し、視床下部下垂体-甲状腺軸に影響する。甲状腺ホルモンの産生は、T3及びT4、視床下部及び下垂体が関与するフィードバック機構により厳密に調節されている。T3及びT4が減少すると、視床下部神経分泌細胞による甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンが増加し、下垂体からの甲状腺刺激ホルモンの産生が増加する。甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンによる下垂体の長期刺激は、下垂体重量の増加と相関する下垂体好塩基球（甲状腺刺激細胞）肥大として形態学的変化として観察される。甲状腺における甲状腺刺激ホルモン刺激の増加は、濾胞上皮の肥大を誘発し、同時に甲状腺ホルモン産生時に甲状腺上皮によって消費されるコロイドの減少を伴う。In vitroでのビーグル犬由来培養肝細胞を用いた酵素誘導試験では、sotorasibによりUGT（UGT1A6及びUGT2B31）及び一部のCYPアイソザイムのmRNA発現量の増加が認められた（153409試験）。[^{14}C]-sotorasibを用いたイヌのマスバランス試験（153304試験）から、一次代謝ではグルタチオン抱合、酸化的N-脱アルキル化及びグルクロン酸抱合の介在が認められた。したがって、イヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験（150433試験）で認められた肝臓、下垂体及び甲状腺の変化は、肝臓でのUGTの誘導による甲状腺ホルモン濃度の低下に対する適応反応と考えられた。一般的に、げっ歯類と比較してイヌは視床下部下垂体-甲状腺軸への影響に対しより抵抗性を持つ（Houle et al, 2014、Mcclain, 1995）。しかしながら、ラットにおけるsotorasib投与に関連した肝臓、下垂体又は甲状腺における病理組織学的変化は、検討した最高用量である750 mg/kg及び3カ月間の反復投与でも認められなかった（4.2.1項）。従って、sotorasibの代謝における種依存的な差（例えば、sotorasib代謝におけるグルクロン酸抱合の依存度の差など）が、甲状腺における種特異的な反応に対する主な原因である可能性が示された。一般的に、げっ歯類及びイヌと比較して、ヒトは視床下部－下垂体－甲状腺系に対する作用に対し抵抗性を有するが、これは主にサイロキシン結合グロブリンによって運搬されるT4の半減期が長く、T4を安定して貯蔵することが可能であることに起因する。さらに、lersivirine等いくつかの薬物を用いた動物における毒性試験で認められた甲状腺の適応性変化は、ヒトの健康リスクを示すものではないと考えられている（Houle et al, 2014、Vernazza et al, 2013、Daminet and Ferguson, 2003、Mcclain, 1995）。臨床において甲状腺機能障害が発現した場合、甲状腺機能検査のほか、血清コレステロール及びトリグリセリド濃度によりモニタリングが可能であることから（Jannin et al, 2019）、sotorasibを用いた臨床試験において甲状腺機能障害に関連する臨床徴候又は症状観察に加え、定期的な血清中T3、遊離T4及び甲状腺刺激ホルモンを測定することで、甲状腺機能のモニタリングを実施している。これまでの臨床試験において、sotorasibが甲状腺機能低下症又は甲状腺機能障害を示唆する所見は確認されていない（モジュール2.7.4）。

結論

sotorasibの非臨床安全性プロファイルを明らかにする目的で、GLP条件下での毒性試験を含む包括的な安全性評価を実施した。主要な反復投与毒性試験では、薬理作用に関連した主要な標的に対する影響は認められなかった。ラットを用いた反復投与毒性試験でみられた腎毒性は、腎臓において毒性反応を有する代謝物の生成に起因するものと考えられた。ラットにおける腎毒性は種特異的で

あり、臨床でのリスクが低いことは、sotorasibの代謝物及び安全性評価データ、並びに公表されている情報により裏付けられている。イヌを用いた3カ月間反復投与毒性試験では、肝細胞酵素誘導に続く適応性の変化が肝臓、下垂体及び甲状腺で認められた。甲状腺に影響がある場合、臨床的にモニタリングが可能であり、これまでの臨床試験において甲状腺への影響を示唆する所見は認められていない。sotorasibは遺伝毒性を示さなかった。sotorasibは催奇形性を示さず、ラット又はウサギを用いた胚・胎児発生に直接的な影響を及ぼさなかった。sotorasibは、in vitroで光毒性を示さなかった。ヒト血中代謝物であるM24、M10及びM18について、効力を裏付ける薬理試験、副次的薬理試験、in vitro hERG試験及び遺伝毒性試験の結果から、臨床的に問題となる安全性上の懸念は認められなかった。非臨床において安全性評価が必要な不純物が9種類存在し、これらの不純物について、ICHガイダンス（ICH Q3A(R2), 2006、ICH Q3B(R2), 2006）に従い細菌を用いたAmes試験及びラット又はイヌを用いた一般的な28日間反復投与毒性試験を実施した。非臨床安全性プログラムの結果は、KRAS G12C変異を有する腫瘍の治療においてsotorasibの臨床使用を支持するものであった。

6. 参考文献

AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discovery*. 2017;7:818-831.

Anders MW. Glutathione-dependent bioactivation of haloalkanes and haloalkenes. *Drug metabolism reviews*. 2004a;36:583-594.

Anders MW. FORMATION AND TOXICITY OF ANESTHETIC DEGRADATION PRODUCTS. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2004b;45:147-176.

Baillie TA. Approaches to Mitigate the Risk of Serious Adverse Reactions in Covalent Drug Design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2020:1-44.

Barbacid M. Ras genes. *Annual review of biochemistry*. 1987;56:779-827.

Barnett LMA, Cummings BS. Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology: A Contemporary Perspective. *Toxicological Sciences*. 2018;164:379-390.

Barrow P, Schmitt G. Regulatory Approaches to Nonclinical Reproductive Toxicity Testing of Anti-Cancer Drugs. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2017;17:1171-1183.

Benjamin SA, Stephens LC, Hamilton BF, Saunders WJ, Lee AC, Saunders GM, et al. Associations between lymphocytic thyroiditis, hypothyroidism, and thyroid neoplasia in beagles. *Veterinary pathology*. 1996;33:486-494.

Canon J, Rex K, Saiki AY, Mohr C, Cooke K, Bagal D, et al. The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature*. 2019;575:217-223.

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW, Scolnick EM, Lowy DR. Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1982;79:4848-4852.

Cooper AJ, Krasnikov BF, Niatsetskaya ZV, Pinto JT, Callery PS, Villar MT, et al. Cysteine S-conjugate beta-lyases: important roles in the metabolism of naturally occurring sulfur and selenium-containing compounds, xenobiotics and anticancer agents. *Amino acids*. 2011;41:7-27.

Cooper AJL, Hanigan MH. Metabolism of Glutathione S-Conjugates: Multiple Pathways. *Comprehensive Toxicology*. 2018:363-406.

Cully M, Downward J. SnapShot: Ras Signaling. *Cell*. 2008;133:1292-1292.e1291.

Daminet S, Ferguson DC. Influence of drugs on thyroid function in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*. 2003;17:463-472.

Green T, Odum J, Nash JA, Foster JR. Perchloroethylene-induced rat kidney tumors: an investigation of the mechanisms involved and their relevance to humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990;103:77-89.

Gul Altuntas T, Kharasch ED. Biotransformation of L-cysteine S-conjugates and N-acetyl-L-cysteine S-conjugates of the sevoflurane degradation product fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether (compound A) in human kidney in vitro: interindividual variability in N-acetylation, N-deacetylation, and beta-lyase-catalyzed metabolism. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2002;30:148-154.

Hall A, Marshall CJ, Spurr NK, Weiss RA. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature*. 1983;303:396-400.

Harvey JJ. An unidentified virus which causes the rapid production of tumours in mice. *Nature*. 1964;204:1104-1105.

Hobbs GA, Der CJ, Rossman KL. RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science*. 2016;129:1287-1292.

Horvath JJ, Witmer CM, Witz G. Nephrotoxicity of the 1:1 acrolein-glutathione adduct in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1992;117:200-207.

Houle CD, Finch GL, Mauthe RJ, Potter MD, Walisser JA, Gardner IB, et al. Effects of lersivirine on canine and rodent thyroid function. *Toxicologic pathology*. 2014;42:897-912.

ICH Harmonized Tripartite Guideline Q3A(R2): Impurities in new drug substances. 2006.

ICH Harmonized Tripartite Guideline Q3B(R2): Impurities in new drug products. 2006.

ICH Harmonized Tripartite Guideline S5(R3): Detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals. 2020.

ICH Harmonized Tripartite Guideline S9: Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals 2009.

Iyer RA, Anders MW. Cysteine conjugate beta-lyase-dependent biotransformation of the cysteine S-conjugates of the sevoflurane degradation product compound A in human, nonhuman primate, and rat kidney cytosol and mitochondria. *Anesthesiology*. 1996;85:1454-1461.

Janes MR, Zhang J, Li LS, et al. Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell*. 2018;172:578-589.

Jannin A, Penel N, Ladsous M, Vantyghem MC, Do Cao C. Tyrosine kinase inhibitors and immune checkpoint inhibitors-induced thyroid disorders. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2019;141:23-35.

Karnoub AE, Weinberg RA. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9:517-531.

Keller D, Brennan R, Leach K. Clinical and Nonclinical Adverse Effects of Kinase Inhibitors. *In: L Urbán, Patel VF, Vaz RJ, eds. Antitargets and Drug Safety. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2015:365-400.

Kirsten WH, Mayer LA. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute*. 1967;39:311-335.

Lash LH, Nelson RM, Van Dyke RA, Anders MW. Purification and characterization of human kidney cytosolic cysteine conjugate beta-lyase activity. *Drug metabolism and disposition*. 1990;18:50-54.

Laurberg P. Paradoxically subnormal serum T4 and T3 in dogs after prolonged excessive TSH stimulation of the thyroid caused by post-cAMP refractoriness of thyroid hormone secretion. *Metabolism*. 1989;38:265-270.

Lock EA and Antoine DJ. 14.03 - Renal Xenobiotic Metabolism. In: CA McQueen, ed. Comprehensive Toxicology (Third Edition). Oxford: Elsevier; 2018:30-55.

Maziasz T, Kadambi VJ, Silverman L, Fedyk E, Alden CL. Predictive toxicology approaches for small molecule oncology drugs. *Toxicologic pathology*. 2010;38:148-164.

Mccarthy RI, Lock EA, Hawksworth GM. Cytosolic C-S lyase activity in human kidney samples-relevance for the nephrotoxicity of halogenated alkenes in man. *Toxicology and industrial health*. 1994;10:103-112.

Mcclain RM. Mechanistic considerations for the relevance of animal data on thyroid neoplasia to human risk assessment. *Mutation research*. 1995;333:131-142.

Mcdonald ER, 3rd, De Weck A, Schlabach MR, Billy E, Mavrakis KJ, Hoffman GR, et al. Project DRIVE: A Compendium of Cancer Dependencies and Synthetic Lethal Relationships Uncovered by Large-Scale, Deep RNAi Screening. *Cell*. 2017;170:577-592.

Mesich ML, Mayhew PD, Paek M, Holt DE, Brown DC. Gall bladder mucoceles and their association with endocrinopathies in dogs: a retrospective case-control study. *Journal of small animal practice*. 2009;50:630-635.

Milburn MV, Tong L, deVos AM, Brünger A, Yamaizumi Z, Nishimura S, et al. Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science*. 1990;247:939-945.

Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins*. 2010;2:2490-2518

Mutlib AE, Gerson RJ, Meunier PC, Haley PJ, Chen H, Gan LS, et al. The species-dependent metabolism of efavirenz produces a nephrotoxic glutathione conjugate in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;169:102-113.

Nitzsche D. Effect of maternal feed restriction on prenatal development in rats and rabbits – A review of published data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017;90:95-103.

Ostrem JM, Peters U, Sos ML, Wells JA, Shokat KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature*. 2013;503:548-551.

Ostrem JM, Shokat KM. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nature reviews Drug discovery*. 2016;15:771-785.

Pai EF, Kabsch W, Krengel U, Holmes KC, John J, Wittinghofer A. Structure of the guanine-nucleotide-binding domain of the Ha-ras oncogene product p21 in the triphosphate conformation. *Nature*. 1989;341:209-214.

Patricelli MP, Janes MR, Li LS, Hansen R, Peters U, Kessler LV, et al. Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer Discov*. 2016;6:316-329.

Perazella MA. Pharmacology behind Common Drug Nephrotoxicities. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*. 2018;13:1897-1908.

Richardson TA, Klaassen CD. Disruption of thyroid hormone homeostasis in Ugt1a-deficient Gunn rats by microsomal enzyme inducers is not due to enhanced thyroxine glucuronidation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010;248:38-44.

Rood JJM, Jamalpoor A, Van Hoppe S, Van Harenet MJ, Wasmann RE, Janssen MJ, et al. Extrahepatic metabolism of ibrutinib. *Investigational New Drugs*. 2021;39:1-14.

Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmüller L, Lautwein A, Schmitz F, et al. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science*. 1997;277:333-338.

Simanshu DK, Nissley DV, McCormick F. RAS proteins and their regulators in human disease. *Cell*. 2017;170:17-33.

Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M. Structure and activation of the human N-ras gene. *Cell*. 1983;34:581-586.

Testa B, Clement B. Chapter 24 - Biotransformation Reactions and their Enzymes. The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition). Academic Press; 2015:561-584.

Townsend DM, Hanigan MH. Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;300:142-148.

Tsuchida S. Glutathione Transferases. Encyclopedia of Cancer (Second Edition). Academic Press; 2002;297-307.

Vernazza P, Wang C, Pozniak A, Weil E, Pulik P, Cooper DA, et al. Efficacy and safety of lersivirine (UK-453,061) versus efavirenz in antiretroviral treatment-naive HIV-1-infected patients: week 48 primary analysis results

from an ongoing, multicenter, randomized, double-blind, phase IIb trial. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2013;62:171-179.

Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. 2001;294:1299-1304.

Zabka TS, Fielden MR, Garrido R, Tao J, Fretland AJ, Fretland JL, et al. Characterization of xenobiotic-induced hepatocellular enzyme induction in rats: anticipated thyroid effects and unique pituitary gland findings. *Toxicologic pathology*. 2011;39:664-677.

Zhang L, Hanigan MH. Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2003;306:988-994.