第 2 部　CTD の概要

一般名：セルメチニブ硫酸塩

版番号：[redacted]

2.6.6　毒性試験の概要文
セルメチニブ硫酸塩

本資料に記載された情報に係る権利はアレクシオンファーマ合同会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
略語及び専門用語一覧表 6
2.6.6.1　まとめ 7
2.6.6.2　単回投与毒性試験 11
2.6.6.2.1　セルメチニブ遊離塩基を用いた単回投与毒性試験 11
2.6.6.2.1.1　Sprague-Dawley ラットを用いた単回経口投与毒性試験（試験 223-001） 11
2.6.6.2.1.2　カニクイザルを用いた単回経口投与毒性試験（試験 1638-213） 11
2.6.6.3　反復投与毒性試験 12
2.6.6.3.1　セルメチニブ遊離塩基を用いたラット反復投与毒性試験 12
2.6.6.3.1.1　雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（試験 RTOX/ARY-1） 12
2.6.6.3.1.2　ラットを用いた 29 日間反復強制経口投与毒性及び 30 日間回復性試験（試験 223-002） 13
2.6.6.3.2　セルメチニブ遊離塩基を用いたカニクイザル反復投与毒性試験 14
2.6.6.3.2.1　カニクイザルを用いた 29 日間反復経口投与毒性及び 4 週間回復性試験（試験 1639-213） 14
2.6.6.3.3　セルメチニブ硫酸塩を用いたマウス反復投与毒性試験 15
2.6.6.3.3.1　マウスを用いた 7 日間反復経口投与 DRF 試験（試験 0354DM） 15
2.6.6.3.3.2　マウスを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性及び回復性試験（試験 0355AM） 16
2.6.6.3.3.3　マウスを用いた 26 週間反復経口投与、13 週間回復性及び雄受胎能評価試験（試験 VKS/0211） 17
2.6.6.3.4　セルメチニブ硫酸塩を用いたカニクイザルでの反復投与毒性試験 19
2.6.6.3.4.1　カニクイザルを用いた MTD、28 日間反復経口投与及び 28 日間回復性試験（試験 VKS/0153） 19
2.6.6.3.4.2　カニクイザルを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（試験 VKS/0210） 20
2.6.6.3.4.3　カニクイザルを用いた 9 カ月間反復強制経口投与毒性試験（試験 512415） 21
2.6.6.4　遺伝毒性試験 21
2.6.6.4.1　セルメチニブ遊離塩基 22
2.6.6.4.1.1　*In vitro* 試験 22
2.6.6.4.1.1.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 AA78NV.503.BTL） 22
2.6.6.4.1.1.2　マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異試験（試験 AA78NV.704.BTL） 22
2.6.6.4.1.2　*In vivo* 試験 22
2.6.6.4.1.2.1　マウスを用いた小核試験（試験 AA78NV.123.BTL） 22
2.6.6.4.1.2.2　マウスを用いた小核試験（試験 0156QM） 23
2.6.6.4.2　セルメチニブ硫酸塩 24
2.6.6.4.2.1　*In vivo* 試験 24
2.6.6.4.2.1.1　マウスを用いた小核試験（試験 0416QM） 24
2.6.6.4.2.2　遺伝毒性検討試験 24

2.6.6.4.2.2.1　マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験及び *in vitro* 小核試験（試験 0480QV）.....24
2.6.6.4.2.2.2　マウス単回投与小核試験のスライド標本を用いたセントロメア標識試験（試験 0120KY）.....25
2.6.6.5　がん原性試験.....25
2.6.6.5.1　セルメチニブ硫酸塩を用いたラットがん原性試験.....25
2.6.6.5.1.1　ラットを用いた MTD/14 日間経口反復投与毒性試験（試験 528072）.....25
2.6.6.5.1.2　ラットを用いた 3 カ月間反復経口投与毒性試験（試験 528088）.....26
2.6.6.5.1.3　ラットを用いたセルメチニブ硫酸塩の 2 年間強制経口投与がん原性試験（試験 501094）.....27
2.6.6.5.2　セルメチニブ硫酸塩を用いた Tg マウスにおけるがん原性試験.....28
2.6.6.5.2.1　CByB6F1 ハイブリッドマウスを用いた MTD/7 日間経口投与用量設定試験（試験 20062136）.....28
2.6.6.5.2.2　CByB6F1 ハイブリッドマウスを用いた 1 カ月間経口投与用量設定毒性試験（試験 20062137）.....29
2.6.6.5.2.3　CByB6F1 rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間がん原性試験（試験 20086561）.....30
2.6.6.6　生殖発生毒性試験.....31
2.6.6.6.1　雄受胎能試験.....32
2.6.6.6.2　雌マウスにおける受胎能・初期胚発生及び回復性評価試験（試験 0496GM）.....32
2.6.6.6.3　胚・胎児発生に関する試験.....33
2.6.6.6.3.1　マウスを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（試験 0430RM）.....33
2.6.6.6.3.2　マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験 0480TM）.....33
2.6.6.6.4　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.....34
2.6.6.6.4.1　マウスにおける出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験（試験 20082138）.....34
2.6.6.6.4.2　マウスを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（試験 20082140）.....35
2.6.6.6.5　幼若動物での毒性試験.....36
2.6.6.7　局所刺激性試験.....36
2.6.6.8　その他の毒性試験.....36
2.6.6.8.1　抗原性試験.....36
2.6.6.8.2　免疫毒性試験.....36
2.6.6.8.3　毒性発現の機序に関する試験.....36
2.6.6.8.4　依存性試験.....37
2.6.6.8.5　代謝物に関する試験.....37
2.6.6.8.5.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 0750BV）.....37
2.6.6.8.5.2　マウスリンフォーマ試験（試験 0751MV）.....37
2.6.6.8.6　不純物に関する試験.....37
2.6.6.8.6.1　不純物E*：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 YV7434）.....37
2.6.6.8.6.2　不純物E*：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 8316541）.....37

2.6.6.8.6.3 不純物E* ：マウスリンフォーマ細胞を用いた *in vitro* 小核試験（試験 8314208） 38
2.6.6.8.6.4 不純物E* ：マウスリンフォーマ試験（試験 8316542） 38
2.6.6.8.6.5 不純物F* ：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 YV7433） 38
2.6.6.8.6.6 不純物I* ：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 YV7145） 39
2.6.6.8.6.7 不純物G* ：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 8466469) 39
2.6.6.8.6.8 不純物H* ：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 AME01418） 39
2.6.6.8.6.9 不純物A*、不純物B*、不純物C*及び不純物D*の安全性 39
2.6.6.8.7 光毒性 42
2.6.6.8.7.1 Balb/c 3T3 線維芽細胞を用いた *in vitro* ニュートラルレッド取り込み光毒性試験（試験 88/459） 42
2.6.6.9 考察 43
2.6.6.9.1 トキシコキネティクス 43
2.6.6.9.2 死亡／忍容性 48
2.6.6.9.3 皮膚 49
2.6.6.9.4 消化管 49
2.6.6.9.5 骨（大腿骨） 50
2.6.6.9.6 組織の鉱質化 51
2.6.6.9.7 泌尿生殖器系 51
2.6.6.9.8 肝臓 52
2.6.6.9.9 リンパ細網系 52
2.6.6.9.10 遺伝毒性及びがん原性 53
2.6.6.9.11 生殖発生毒性 53
2.6.6.9.12 幼若動物での毒性 54
2.6.6.9.13 光毒性 55
2.6.6.9.14 代謝物及び不純物 55
2.6.6.10 結論 57
2.6.6.11 参考文献 57

表目次

表 1 セルメチニブの毒性試験一覧 8
表 2 セルメチニブ硫酸塩中の不純物の SAR 評価の要約 40
表 3 毒性試験で使用されたバッチ中の不純物含量情報 41
表 4 不純物の毒性試験における投与量及び規格情報 41
表 5 患者における各不純物の 1 日最大摂取量 42
表 6 主要反復投与毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比較 44

表 7　　CD-1 マウスの生殖発生毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比較..... 47

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
ALP	Alkaline phosphatase：アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine Aminotransferase：アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	Aspartate Aminotransferase：アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
AUC	Area under the plasma concentration-time curve：血漿中濃度－時間曲線下面積
BID	Twice daily (Bis in Die)：1 日 2 回（投与）
BUN	Blood urea nitrogen：血中尿素窒素
C_{max}	Maximum plasma concentration：最高血漿中濃度
DRF	Dose range finding：用量設定
EMA	European Medicines Agency：欧州医薬品庁
FDA	Food and Drug Administration：米国食品医薬品局
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
GLDH	Glutamate Dehydrogenase：グルタミン酸脱水素酵素
ICH	International Conference on Harmonisation：医薬品規制調和国際会議
LDH	Lactase dehydrogenase：乳酸脱水素酵素
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase：分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼキナーゼ
MTD	Maximum tolerated dose：最大耐量
NCE	Normochromatic erythrocyte：正染色性赤血球
NF1	Neurofibromatosis type 1：神経線維腫症 1 型
NMU	N-nitrosomethylurea：N-ニトロソメチルウレア
PCE	Polychromatic erythrocyte：多染性赤血球
pERK	Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase：リン酸化細胞外シグナル制御キナーゼ
PDCO	Paediatric committee
PMDA	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency：独立行政法人医薬品医療機器総合機構
PN	Plexiform neurofibroma：叢状神経線維腫
PPND	Pre- and post-natal development：出生前及び出生後の発生に関する（試験）
SAR	Structure activity relationship：構造活性相関
Tg	Transgenic：トランスジェニック
tk	Thymidine kinase：チミジンキナーゼ
TK	Toxicokinetics：トキシコキネティクス
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate：ホルボールエステル
UVA	Ultraviolet A：紫外線 A 波

2.6.6.1　まとめ

セルメチニブ（AZD6244、AZ12252244 あるいは ARRY-142886）は、経口投与可能な、ATP と競合しない強力かつ選択的な MEK1/2 阻害剤であり、アストラゼネカが Array BioPharma 社から開発の権利を取得した。セルメチニブは、手術不能かつ症候性の叢状神経線維腫を有する 3 歳以上の NF1 小児患者の治療薬として開発中である。本概要文では一般名であるセルメチニブを使用する。薬理学的に活性を示すセルメチニブの 2 種類の微量代謝物である N-デスメチルセルメチニブ（以下 N-脱メチル体）及びセルメチニブアミド（アミド体）は、それぞれ AZ12442942 及び AZ12791138 とも称する。

非臨床試験では 2 つの形態のセルメチニブを使用した。初期の試験ではセルメチニブの遊離塩基を使用し、その後、セルメチニブの硫酸塩に切り替えた。セルメチニブ遊離塩基は溶解度が限られることから、投与量を増加させたとき、曝露量の増加が用量比を下回り、バイオアベイラビリティが低下することが非臨床試験で確認された。一方、セルメチニブ硫酸塩は、遊離塩基と比べて曝露量の増加が大きかった。硫酸塩を用いた製剤を開発後、これを用いて追加の毒性試験を実施した。

セルメチニブの毒性試験の概要を表 1 に示す。幼若動物を用いた毒性試験（2.6.6.9.12 項参照）は、実施によりセルメチニブの安全性に関して成獣の試験で得られた以上に意義のある情報は得られないと考えられるため実施しなかった。[redacted]は、20[redacted] 年 [redacted] 月に EMA の [redacted]、20[redacted] 年 [redacted] 月に EMA、20[redacted] 年 [redacted] 月に FDA、20[redacted] 年 [redacted] 月に PMDA により了承されている。

すべての重要な試験は GLP を適用して実施した（表 1）。

セルメチニブの毒性評価は、薬理学的に適切なげっ歯類（ラット及びマウス）及び非げっ歯類（カニクイザル）を用いて実施した。初期の安全性試験ではラットを選択した。

第一相代謝物（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）である N-脱メチル体（AZ12442942）は、ヒト血中に微量（総薬物関連物質量の 10%未満）存在する薬理活性代謝物であり、当初の毒性試験動物種であるラット及びサルでは有意な量が生成されないが、CD-1 マウスでは生成される。患者での N-脱メチル体血中濃度が当初不明であり、かつ N-脱メチル体が活性代謝物であることから、セルメチニブ硫酸塩の 1 カ月反復投与毒性試験、26 週間反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験で使用するげっ歯類の動物種としてマウスを選択した。

セルメチニブの主要血中代謝物 M2（血漿中総放射能の 22%）は O-グルクロン酸抱合体である。これは第二相代謝物であり、薬理活性を示さないと予想される。M2 は毒性試験の動物種で検出され、不活性代謝物と予想されることから（薬理試験の概要文 2.6.2 項及び薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）、非臨床試験でさらに評価する必要はないと考えられた。

セルメチニブ遊離塩基及び硫酸塩の主要試験では、Captisol[!]（スルホブチルエーテル β-シクロデキストリン）ベースの懸濁液を使用したが、例外として、げっ歯類を用いた PPND 試験及びがん原性試験（用量設定試験を含む）では、Phosal ベースの媒体を使用した。がん原性試験及び PPND 試験では、Captisol[!] のよく知られた消化管への作用（Stella and He 2008）を回避するため、Phosal ベースの媒体へ切り替えた。

表 1　　セルメチニブの毒性試験一覧

Study type and duration	Route of administration	Species	Study number	GLP compliant
Single dose toxicity (selumetinib free base):				
1 day	Oral	Rat	223-001	Yes
1 day	Oral	Monkey	1638-213	Yes
Repeat dose toxicity (selumetinib free base):				
14 days	Oral	Rat	RTOX/ARY-1	No
29 days	Oral	Rat	223-002	Yes
29 days	Oral	Cynomolgus Monkey	1639-213	Yes
Repeat dose toxicity (selumetinib hyd-sulfate):				
7 days	Oral	Mouse	0354DM	Yes
1-month	Oral	Mouse	0355AM	Yes
26 weeks	Oral	Mouse	VKS/0211	Yes
MTD and 28 day	Oral	Monkey	VKS/0153	Yes
26 weeks	Oral	Monkey	VKS/0210	Yes
9-month	Oral	Monkey	512415	Yes
Genetic toxicology:				
Bacterial reverse mutation assay	*In vitro*	*S. typhimurium* and *E. coli*	AA78NV.503.BTL	Yes
Mouse lymphoma assay	*In vitro*	L5178Y cells	AA78NV.704.BTL	Yes
Bone marrow micronucleus	Oral	Mouse	AA78NV.123.BTL	Yes
Bone marrow micronucleus	Oral	Mouse	0156QM	Yes
Investigatory Genotoxicity Studies				
Mouse lymphoma assay and in vitro micronucleus assay	*In vitro*	L5178Y cells	0480QV	No
Bone marrow micronucleus	Oral	Mouse	0416QM	Yes
Centromeric labelling study	-	Mouse (from 0156QM)	0120KY	No
Carcinogenicity (selumetinib hyd-sulfate):				
MTD and 14 days	Oral	Rat	528072	No
3 months	Oral	Rat	528088	Yes
2 years	Oral	Rat	501094	Yes
MTD and 7 days	Oral	Mouse (CByB6F1 hybrid)	20062136	No
1-month	Oral	Mouse (CByB6F1 hybrid)	20062137	Yes
6 months	Oral	Mouse (CByB6F1 rasH2 transgenic)	20086561	Yes
Reproductive Toxicology (selumetinib hyd-sulfate):				
Male fertility	Oral	Mouse	VKS/0211	Yes

表 1　　セルメチニブの毒性試験一覧

Study type and duration	Route of administration	Species	Study number	GLP compliant
Female fertility and early development	Oral	Mouse	0496GM	Yes
DRF embryofetal development	Oral	Mouse	0430RM	Yes
Embryofetal development	Oral	Mouse	0480TM	Yes
DRF prenatal and postnatal development	Oral	Mouse	20082138	No
Perinatal and postnatal development	Oral	Mouse	20082140	Yes
Metabolites (AZ12442942, the N-desmethyl metabolite of selumetinib):				
Bacterial reverse mutation test	*In vitro*	*S. typhimurium* and *E. coli*	0750BV	Yes
Mouse lymphoma assay	*In vitro*	L5178Y cells	0751MV	Yes
Impurities:				
Bacterial reverse mutation test 不純物E*)	*In vitro*	*S. typhimurium* and *E. coli*	YV7434	Yes
Bacterial reverse mutation test (不純物E*)	*In vitro*	*S. typhimurium*	8316541	Yes
Mouse Lymphoma Cell Micronucleus Assav (　不純物E*)	*In vitro*	L5178Y cells	8314208	No
Mouse lymphoma assay (　不純物E*)	*In vitro*	L5178Y cells	8316542	Yes
Bacterial reverse mutation test (　不純物F*)	*In vitro*	*S. typhimurium* and *E. coli*	YV7433	Yes
Bac erial reverse mutation (不純物1*)	*In vitro*	*S. typhimurium*	YV7145	No
Bac erial reverse muta ion (　不純物G*)	*In vitro*	*S. typhimurium* and *E. coli*	8466469	Yes
Bacterial reverse mutation (　不純物H*　)	*In vitro*	*S. typhimurium* and *E. coli*	AME01418	Yes
Other studies:				
Phototoxicity	*In vitro*	Balb/c 3T3 cells	88/459	Yes

DRF = dose range finding; GLP = Good Laboratory Practice; MTD = maximum tolerated dose

毒性試験から得られた主な所見は以下の通りである。

- カニクイザルにセルメチニブを投与すると可逆的な下痢、脱水及び電解質失調が認められ、持続的な下痢及び脱水による二次的な影響として、一部の例では腎臓の変化（尿細管上皮の腫脹及び軽度の空胞化）を伴っていた。カニクイザルでは 26 週間までの投与で消化管又は腎臓に顕著な病理組織学的変化は認められなかった。
- カニクイザルにセルメチニブを 9 カ月間投与したときの忍容性は良好で、病理組織学的変化を伴わない鼠径リンパ節の腫脹、軽度の体重増加抑制、軽度で一過性の好中球、白血球及び好酸球増加が認められた。
- マウスにセルメチニブを最長 26 週間投与すると、貧血及び網状赤血球増加を伴う消化器毒性及び造血器萎縮が認められた。13 週間の休薬期間終了後、これらの所見は部分的又は完全に回復していた。
- ラットにセルメチニブを最長 2 年間投与したときに、皮膚の変化（皮膚病変、痂皮、潰瘍形成）が認められた。サル及びマウスでは、26 週間までの投与で皮膚への影響は認められなかった。
- ラットにセルメチニブを最長 3 カ月間投与すると、骨に病理組織学的変化（骨端軟骨異形成）が認められた。サル及びマウスではセルメチニブを最長 26 週間投与しても、同様の変化は認められなかった。
- セルメチニブを最長 26 週間投与したげっ歯類で軟組織に鉱質化がみられ、それに伴って血漿無機リン酸塩、アルブミン及び／又はカルシウムに変化が認められた。休薬期間後、軟組織の鉱質化の回復性は認められなかった。カニクイザルでは、最長 26 週間までの投与で組織の鉱質化はみられなかった。
- 雄マウスにセルメチニブを 8～15 週間投与すると、球海綿体筋の海綿体にうっ血が認められ、数例が尿道閉塞及び逆流圧の影響で早期死亡に至った。同様の変化はげっ歯類を用いた他の毒性試験では認められず、セルメチニブを最長 26 週間投与したカニクイザルでも認められなかった。
- セルメチニブは細菌、あるいは哺乳類培養細胞を用いた *in vitro* 試験で遺伝毒性を示さなかったが、マウス骨髄を用いた *in vivo* 試験で異数性の誘発による小核誘発性を示した。
- セルメチニブは、rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間投与がん原性試験及びラットを用いた 2 年間投与がん原性試験で、がん原性を示さなかった。
- セルメチニブは雌雄のマウスの受胎能に影響を及ぼさなかった。交尾行動と受胎能に影響は認められなかったが、生存胎児数はわずかに減少した。3 週間の休薬後には、いずれのパラメータにも影響は認められなかった。
- マウスを用いた生殖発生毒性試験で、セルメチニブの投与により奇形（開眼及び口蓋裂）の発現率増加及び胚生存率の低下が認められた。
- 妊娠マウスに妊娠 6 日目から授乳 20 日目までセルメチニブを投与すると、出生児の体重が対照と比べて減少したほか、出産後 21 日目に瞳孔収斂基準を満たす出生児の数が減少した。また、奇形（開眼及び口蓋裂）の発現率が全用量で増加した。
- ICH S10 ガイドラインの試験最高推奨濃度である 100 ∀g/mL で、セルメチニブは光毒性を示さなかった。

- マウスを用いた主要な反復投与毒性試験、生殖発生毒性試験及び rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間投与がん原性試験で、微量活性代謝物である N-脱メチル体への曝露が確認された。
- 評価が必要となるすべての不純物について、反復投与毒性試験で安全性が確認された。ICH M7(R1)ガイドラインに従い、製造工程で変異原性不純物及び潜在的変異原性不純物を管理している。

以上に示したセルメチニブの毒性プロファイルは、予定している適応症に関して許容可能なものと考えられる。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

急性投与毒性試験（単回投与又は 1 日のみの BID 投与）を、セルメチニブの遊離塩基を用いてラット及びカニクイザルで実施した。

2.6.6.2.1　セルメチニブ遊離塩基を用いた単回投与毒性試験

2.6.6.2.1.1　Sprague-Dawley ラットを用いた単回経口投与毒性試験（試験 223-001）

概要表 2.6.7.5 項

本試験では、Sprague-Dawley ラット（5 例/性/群）にセルメチニブ遊離塩基を 0（媒体）、30、100 又は 300 mg/kg の用量で単回強制経口投与（10 mL/kg）し、14 日間観察後、15 日目に屠殺し剖検を実施した。これとは別に、4 例/性/群を対象にすべての用量で TK 評価用の採血を行った。

すべての用量でセルメチニブへの全身曝露が認められたが、曝露量は用量に比例して増加しなかった。セルメチニブの単回経口投与は 300 mg/kg まで良好な忍容性を示し、死亡及び毒性変化は認められなかった。14 日間の観察期間後、セルメチニブ投与と関連した剖検所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

試験報告書では本試験の無毒性量は 300 mg/kg とされたが、その後のさらなる検討で、この用量は無影響量であること考えられた。

2.6.6.2.1.2　カニクイザルを用いた単回経口投与毒性試験（試験 1638-213）

概要表 2.6.7.5 項

本試験では、カニクイザル（3 例/性/群）にセルメチニブ遊離塩基を 0（媒体）、10、30 又は 100 mg/kg BID（0、20、60 又は 200 mg/kg/日、投与容量 4 mL/kg）、約 12 時間間隔で 1 日 2 回経口投与した。1 日目の初回投与後から様々な時点で、全動物から TK 評価用の血液試料を採取したほか、一部の動物からはバイオマーカー解析（MEK1/2 の直接基質である pERK）用の血液試料も採取した。末梢血単核球中の pERK レベルをフローサイトメトリーにより測定した。

投与液を分析したところ、高用量群では懸濁液の濃度が意図した濃度の約 2 倍であることが示された。しかし、その原因が製剤によるものなのか分析法の誤りによるものなのかは明らかにできなかったため、試験報告書では高用量（100 mg/kg BID）の投与は参考データとされた。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの全身曝露が確認されたが、曝露量は用量に比例して増加しなかった。低用量群の雄 1 例、中用量群の雄 1 例、高用量群の雄 2 例を対

象に、バイオマーカーを *ex-vivo* で解析したところ、セルメチニブの血漿中濃度と TPA 誘導性 pERK の間に逆相関が認められた。末梢血単核球における pERK の阻害は血漿中セルメチニブ濃度が 1 μg/mL の付近で最高となった。

最高 100 mg/kg BID の 1 日 2 回投与は良好な忍容性を示し、死亡動物はなく、摂餌量、体重、心電図、血液学的検査、血液凝固検査、心血管系血液生化学的検査（トロポニン I 及び T）及び尿検査の値に変化は認められなかった。対照群を含むすべての用量群で、水様～液状の便が認められたが、これによる体重への影響は認められず、媒体（Captisol）に起因する可能性が高いと考えられた。対照群を含めた全群で、最終投与から約 12 時間後、血清 ALT、AST 及び LDH が一時的に増加した。高用量群でこれら血清酵素（特に ALT）の増加が特に顕著であったことから、被験物質の影響が示唆された。しかし、これらの変化は 14 日目には正常値に回復し、肝臓及び骨格筋の検査でも対応する病理組織学的変化は認められなかった。

剖検では、主に高用量群で、脾臓において濾胞状パターンの増加並びに関連する病理組織学的所見として軽微なリンパ組織過形成及び濾胞肥大が認められた。これらの所見は被験物質との関連が疑われたが、他のリンパ器官でリンパ組織の活性増加がみられなかったことから、毒性学的な意義はほとんど、若しくはまったくないと考えられた。100 mg/kg BID 投与で意義のある病理組織学的所見が認められなかったことから、臨床病理パラメータに認められた上述の軽微な一時的変化に毒性学的意味はないと考えられた。しかし、本試験で認められた所見に基づき、本試験では 30 mg/kg BID（60 mg/kg/日）が無影響量と考えられた。

2.6.6.3　反復投与毒性試験

セルメチニブ遊離塩基を用いてラット及びカニクイザルで最長 29 日間の反復経口投与毒性試験を実施し、セルメチニブ硫酸塩を用いてマウス及びカニクイザルで、それぞれ最長 26 週間及び 9 カ月間の反復経口投与毒性試験を実施した。また、がん原性試験の用量を選択するため、CByB6F1 マウスを用いた最長 1 カ月間及びラットを用いた最長 3 カ月間の用量設定試験を実施した（2.6.6.5 項参照）。最初にセルメチニブ遊離塩基を用いてラット及びサルで実施した反復投与毒性試験について要約し、次いで硫酸塩を用いてマウス及びサルで実施した試験について要約する。

毒性試験では媒体として Captisol の 30% w/v 水溶液を使用したが、例外として、セルメチニブ遊離塩基を用いたラット 14 日間反復経口投与毒性試験では 1%メチルセルロースを使用した（2.6.6.3.1.1 項参照）。

一部の反復投与試験の報告書では、用量の単位として μmol/kg/日を使用していた。評価の便宜のため、これらはセルメチニブの分子量 457.7 g/mole を用いて質量単位（mg/kg/日）に変換し、整数値に丸めて示した。

2.6.6.3.1　セルメチニブ遊離塩基を用いたラット反復投与毒性試験

2.6.6.3.1.1　雌雄 Sprague-Dawley ラットを用いた 14 日間反復経口投与毒性試験（試験 RTOX/ARY-1）

概要表 2.6.7.6 項

この GLP 非適用試験では、Sprague-Dawley ラット（5 例/性/群）にセルメチニブの遊離塩基を 0（媒体）、30、100 又は 300 mg/kg/日の用量で 14 日間、1 日 1 回強制経口投与した（投与容量 5 mL/kg）。これとは別に、3 例/性/群を対象にすべての用量で TK 評価用の採血を行った。

強制経口投与による外傷が剖検時に雌 2 例（300 mg/kg/日群）に認められたため、これらの動物のデータはさらなる解析から除外した。最高 300 mg/kg/日の投与は良好な忍容性を示し、死亡動物、一般状態の変化、体重への影響はいずれも認められなかった。すべてのセルメチニブ投与群の雄で、好中球のわずかな増加及びリンパ球数のわずかな減少が認められた。100 mg/kg/日以上の雌雄で血漿 ALT 及び／又は AST のわずかな増加が認められたが、これと関連する肝重量の変化及び肝臓の病理組織学的所見はいずれも認められなかった。血漿リンの増加、並びに血漿総タンパク、アルブミン、グロブリン及びグルコースの減少が 30 mg/kg/日以上の雌及び／又は雄で認められた。すべてのセルメチニブ投与群の雌雄で相対脾臓重量のわずかな減少が認められた。300 mg/kg/日の雌 2 例で胸腺皮質の萎縮が認められた。100 mg/kg/日以上の雄及び 300 mg/kg/日の雌で胸腺皮質厚の減少が認められた。

試験報告書では、セルメチニブをラットに経口投与した本試験での無毒性量の記載はなかった。しかし、認められた所見から本試験での無毒性量は 300 mg/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.1.2　ラットを用いた 29 日間反復強制経口投与毒性及び 30 日間回復性試験（試験 223-002）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では、Sprague-Dawley ラット（10 例/性/群）にセルメチニブの遊離塩基を 0（媒体）、10、30 又は 100 mg/kg/日（4 mL/kg）で 29 日間、1 日 1 回強制経口投与した。また、別の 5 例/性/群に 0、10 又は 100 mg/kg/日を 29 日間投与し、30 日間の休薬後、毒性の回復性を評価した。さらに、別の 4 例/性/群を対象に、すべての用量で TK 評価を行った。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの全身曝露が確認され、曝露量は概して用量比を下回る増加を示した。明らかな性差は認められなかったが、100 mg/kg/日では雌が雄よりわずかに曝露量が大きかった。蓄積は認められず、いずれの用量でも曝露量は投与開始時と終了時で同程度であった。

投与期間中、5 例が死亡した。しかし、いずれもセルメチニブに起因するものではなく、4 例は強制経口投与の過誤（食道穿孔）のために死亡し（10 及び 30 mg/kg/日群の雌 2 例がそれぞれ投与 11 日目及び 14 日目、100 mg/kg/日群の雄 2 例が 15 日目）、対照群の雌 1 例が出血性膀胱炎のために死亡した。

ラットへの 100 mg/kg/日までの 29 日間 1 日 1 回経口投与は良好な忍容性を示し、体重及び摂餌量への影響は認められなかったが、セルメチニブを投与したすべての雄及び 30 mg/kg/日以上の雌で軟便が認められた。この所見は休薬期間中には認められず、可逆的であることが確認された。

セルメチニブ投与に起因する血液学的変化は認められなかった。100 mg/kg/日の数例の雌が 14 及び 30 日目に好中球数増加を示したが、これらの動物では病理組織学的検査で胸腔に炎症が認められたことから、強制経口投与により食道が損傷を受けたことが原因と考えられた。投与期間中、10 mg/kg/日以上の雄及び／又は雌において、いくつかの血液生化学的検査値にわずかな変化（血漿リン、尿素窒素及び／又はグロブリンの増加、アルブミン減少）が認められたが、休薬期間終了時に回復性が認められた。

セルメチニブ投与と関連する器官重量の変化は認められなかった。

セルメチニブ投与と関連すると考えられる病理組織学的所見は、胃粘膜鉱質化（細胞壊死／アポトーシスはなく、顕著な炎症も伴わない腺胃粘膜固有層間質への鉱質沈着）の発現率及び重症度（軽微～中等度）の増加のみであった。雄では、早期に死亡した 2 例を含む 100 mg/kg/日のすべての動物で胃粘膜鉱質化が認められ、休薬期間終了時に回復は認められなかった。休薬期間終

了時に 10 mg/kg/日の雄 2 例でも胃粘膜鉱質化が認められたが、投与 30 日目の時点では 10 及び 30 mg/kg/日の動物に胃粘膜鉱質化は認められなかった。同様に、雌では、30 mg/kg/日以上のすべての動物で胃粘膜鉱質化が認められた。30 日間の休薬期間終了時でも、鉱質化した胃粘膜に本質的な変化はみられなかった。早期に死亡したすべての動物（対照群の 1 例を含む）で鉱質化が認められ、休薬期間終了時には対照群の別の 1 例でも認められた。肺及び心臓に病理組織学的所見が認められたが、強制経口投与による損傷に起因する二次的影響と考えられた。

胃粘膜鉱質化が早期死亡動物と休薬期間後の動物を含めて認められたことに基づき、無毒性量は雌で 10 mg/kg/日と考えられたが、雄では確定できなかった。

2.6.6.3.2　セルメチニブ遊離塩基を用いたカニクイザル反復投与毒性試験

2.6.6.3.2.1　カニクイザルを用いた 29 日間反復経口投与毒性及び 4 週間回復性試験（試験 1639-213）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では、カニクイザル（3 例/性/群）にセルメチニブの遊離塩基を 0（媒体）、3、10 又は 30 mg/kg BID（0、6、20 又は 60 mg/kg/日、0.5～2 mL/kg/回）で 29 日間、1 日 2 回、約 12 時間間隔で投与した。また、別の 2 例/性/群に 29 日間投与し、30 日間の休薬後、毒性の回復を評価した。TK 評価用の採血をすべての動物で、また、薬力学的評価用の採血を高用量群の雄 2 例で行った。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの全身曝露が確認されたが、試験を実施した用量範囲にわたって用量制限的な吸収が認められた。曝露量に性差は認められなかった。蓄積も認められず、すべての用量で投与開始時と投与終了時の曝露量は概ね同程度であった。30 mg/kg BID では、末梢血単核球で TPA 誘導性 ERK リン酸化の阻害が認められた。

対照群を含めたすべての群で持続的な水様～液状の便が認められた。既知である Captisol の消化管への作用及びすべての動物で水様～液状便が認められたことを考慮し、Captisol 媒体の投与量を 14 日目より 2 mL/kg/回（600 mg/kg BID）から 0.5 mL/kg/回（150 mg/kg BID）に減量した。この変更により対照群及び低用量群では下痢の発現率が概ね低下したが、10 及び 30 mg/kg BID 群では残りの投与期間中も下痢が持続した。このことから、セルメチニブは Captisol による消化管への影響を悪化させる可能性が示唆された。1 カ月の休薬期間中、水様便の発現率はすべての動物で低下した。

消化器系への影響が認められたが、体重減少は 30 mg/kg BID の 2 例に認められたのみであった。二次的な変化として、10 及び 30 mg/kg BID 群で、脱水（皮膚の張りの低下及び体重減少）、血清アルブミン減少、血清グロブリン増加、BUN 及びクレアチニン増加、並びに血清電解質減少が認められた。

セルメチニブを投与した 4 例が、予定剖検日前に早期屠殺されるか死亡した。30 mg/kg BID の雄 1 例の瀕死状態は持続的な重度の水様便及び脱水と関連し、この動物は予定剖検日（31 日目）の 2 日前である 29 日目に早期屠殺した。この動物に認められた腎臓の病理組織学的所見（軽度の腎尿細管拡張及び軽度の腎尿細管上皮腫脹）及び関連する血液生化学的検査値の変化（BUN、クレアチニン及びリンの増加）は、持続的な下痢による脱水を示唆していた。10 mg/kg BID の雄 2 例の瀕死状態（それぞれ 13 日目及び 27 日目）並びに 3 mg/kg BID の雄 1 例の死亡（20 日目）は、投与手順中に外傷が持続したことが原因とみられた。病理組織学的検査では、食道、心膜、

肺、心臓、縦隔リンパ節及び関連する結合組織の炎症を特徴とする胸腔の炎症性変化が確認された。これらの変化は食道の穿孔又は破裂によると考えられた。

29 日目に早期屠殺した 30 mg/kg BID の雄 1 例に認められた腎臓所見に加え、31 日目の予定剖検において、30 mg/kg BID の雌 1 例でも腎臓に組織学的変化（軽度／中等度の尿細管上皮腫脹及び／又は軽度の空胞化）が認められた。これら 2 例に認められた腎尿細管の変化は、一般症状の観察で認められた脱水及び血液生化学的検査で認められた電解質の変化を反映していると考えられた。媒体として使用した Captisol は尿細管に空胞化をもたらす可能性があることから、これが 2 例の尿細管所見に寄与した可能性がある。同様の腎所見は、休薬期間終了時に検査した動物には認められなかった。10 mg/kg BID の雄 1 例の食道に線維症を伴う著明な慢性活動性炎症が認められたが、これは強制経口投与時に受けた損傷に起因すると考えられた。

媒体群の動物では死亡や重度の脱水が認められなかったことから、媒体として Captisol を使用したセルメチニブの 1 日 2 回反復投与の本試験条件下における忍容性は、いずれの用量でも、個々の動物で良好ではないと判断された。これは、すべてのセルメチニブ投与群で胃腸障害による持続的な水様～液状便に加え、その二次的変化（脱水、血液生化学的検査値異常、腎尿細管の病理組織学的変化）が認められたこと及び 30 mg/kg BID 群の 1 例が瀕死状態となったことに基づいている。したがって、本試験で無毒性量は決定できなかった。休薬期間後の動物で所見が認められなかったことから、セルメチニブによる消化管への影響は可逆的であることが確認された。

2.6.6.3.3　セルメチニブ硫酸塩を用いたマウス反復投与毒性試験

2.6.6.3.3.1　マウスを用いた 7 日間反復経口投与 DRF 試験（試験 0354DM）

概要表 2.6.7.6 項

本試験では、CD-1 マウス（4 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を 0（媒体）、50、151、242 又は 342 mg/kg BID（0、100、302、483 又は 685 mg/kg/日、5～8.5 mL/kg/回）で 7 日間、約 12 時間間隔で 1 日 2 回強制経口投与した。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの全身曝露が確認された。曝露量は概ね用量に比例して増加した。セルメチニブの曝露量に性差は認められなかったが、代謝物 N-脱メチル体の濃度は雄の方が雌より高かった。N-脱メチル体の血漿中濃度はセルメチニブ濃度の約 1%～3%であった。

242 及び 342 mg/kg BID の投与は忍容性がなく、投与したすべての動物が死亡するか、2～5 日目に一般状態の悪化（活動性低下、半眼、蒼白、軟便／液状便／暗色便、腹部膨満、呼吸深度増加、呼吸数減少など）のために早期屠殺された。摂餌量減少及び／又は体重増加量増加（対照群と比べて 5～8%の増加）も認められた。151 mg/kg BID 群の雄 1 例にも同様の変化がみられたため、7 日目に早期屠殺した。これらの動物の死因は、消化管（胃及び大腸）のびらん性及び炎症性の変化と考えられた。これらの所見に伴って、肝臓で散発的な壊死及び炎症、腸間膜リンパ節での炎症が認められた。

生存した動物では、50 及び 151 mg/kg BID の投与の忍容性は良好であった。151 mg/kg BID 以上では、著明な貧血及び赤血球指数（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）減少、それに伴う網状赤血球数、赤血球分布幅、好中球数及び大型非染色細胞数の増加が認められた。血小板数減少が 242 及び 342 mg/kg BID で認められ、これらの動物は早期屠殺した。また、すべての用量でトリグリセリド減少及び無機リン酸塩増加がみられ、151 mg/kg BID 以上ではコレステロー

ル、総タンパク、アルブミン、総カルシウム、グルコース及び／又は ALP の減少を引き起こした。

病理組織学的検査で、151 mg/kg BID の膵臓の変化（腺房細胞の好塩基球増加）及び脾臓の変化（髄外造血）が認められた。50 mg/kg BID の 1 例で腎臓に変化（多巣性尿細管内タンパク性液体、皮髄うっ血及び多巣性近位尿細管壊死）が認められたが、これより高用量で同様の変化は認められず、投与との因果関係は不明であった。

本試験では、セルメチニブを 151 mg/kg BID 以上で死亡、著明な貧血及び毒性を示す病理組織学的変化が認められた。50 mg/kg BID（100 mg/kg/日）の 7 日間投与では投与に起因した所見は認められず、この用量が無毒性量と考えられた。

2.6.6.3.3.2　マウスを用いた 1 カ月間反復経口投与毒性及び回復性試験（試験 0355AM）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では、セルメチニブ硫酸塩を CD-1 マウス（10 例/性/群）に 0（媒体）、11、34 又は 103/69 mg/kg BID（0、23、69 又は 206/137 mg/kg/日、4～6 mL/kg/回）で 1 カ月間、1 日 2 回、約 12 時間間隔で反復強制経口投与した。これとは別に 8 例/性/群に 0 又は 103/69 mg/kg BID を 1 カ月間投与し、4 週間休薬後、回復性を評価した。最高用量の 103 mg/kg BID は忍容性がなく、この群への投与は 8 日目に休止された。さらに、すべての用量で別の 9 例/性/群を用い TK 評価用の採血を行った。

すべての用量でセルメチニブ及び N-脱メチル体への曝露が確認された。セルメチニブの曝露量はわずかに用量比を上回った。セルメチニブの曝露量に性差は認められず、28 日間の投与で蓄積は認められなかった。N-脱メチル体の全身曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}12}$）は、すべての用量群でセルメチニブの約 2～12%であった。N-脱メチル体濃度は雄の方が雌より高く、試験を実施した用量範囲で用量比を下回って増加した。

103 mg/kg BID では、投与 10 日目に雌 1 例が死亡したほか、雄 3 例が一般状態悪化（極度の活動性低下、半眼、立毛、蒼白、泌尿・肛門生殖器領域周囲の着色、四肢冷感、軟便、呼吸深度増加など）及び／又は体重・摂餌量減少のため、投与 6～8 日目に早期屠殺された。これらの動物が死亡した結果、高用量群への投与は 8 日目から中断され、12 日目から 69 mg/kg BID に減量して再開された。34 mg/kg BID の雄 1 例も同様の変化のため、12 日目に早期屠殺した。これら死亡した動物のうち雄の死因は、消化管のびらん性・炎症性所見と関連し、セルメチニブ投与と関連があると考えられた。死亡した 103 mg/kg BID 群の雌 1 例は死亡前にいかなる変化もみられず、死亡が発見された後、重度の自己融解がみられたことから、死因は明らかにできなかった。

103 mg/kg BID が投与された生存動物では、投与開始から 1 週間以内に一般状態変化（蒼白、立毛、円背位、腹部膨満、活動性低下、半眼［眼漏及び眼乾燥を伴う］、泌尿・肛門生殖器領域周囲の着色、脱毛、痂皮形成）が認められた。12 日目に 69 mg/kg BID に減量した後では、14 日目から一般状態変化（腹部膨満、数例の雄の下腹部表面に腫瘤及び／又はパッチ状の脱毛）がみられ、一部の動物では休薬期間中に腫瘤及び脱毛もみられた。34 mg/kg BID でも、少数の生存動物に腹部膨満及び偶発的な包皮腺膿瘍が認められた。11 mg/kg BID の投与は忍容性良好で、死亡はなく、一般状態変化も立毛及び蒼白が散見されたのみであった。11、34 又は 103/69 mg/kg BID の生存動物において、体重又は食餌・水分摂取量への有害な影響は認められなかった。眼科学的検査では、セルメチニブを投与した全群で一部の動物に所見（角膜全体にわたる卵形の混濁、角膜表面の荒れ）が認められた。生存中に認められたほとんどの変化は、一部の毒性変化（腹部表

面の腫脹、脱毛）及び眼科学的変化（角膜混濁）を除き、休薬期間終了時に正常な状態に回復していた。

103/69 mg/kg BID では総白血球数及び好中球数の増加も認められ、雄では赤血球分布幅の増加を伴っていた。103/69 mg/kg BID の雄及び／又は雌では、血漿 ALP、総／補正カルシウム及び無機リンの増加並びにトリグリセリド、総タンパク、アルブミン及び／又はアルブミン／グロブリン比の低下も認められたが、休薬により回復が認められた。血漿 ALP 及びトリグリセリドの変化は 11 及び 34 mg/kg BID でも認められた。

103/69 mg/kg BID の 1 例以上で病理組織学的所見として、消化管におけるびらん性・炎症性病変並びにそれに伴う肝臓及び腸間膜リンパ節における炎症性変化が認められた。骨髄における顆粒球増加、骨髄における萎縮及び／又は骨髄線維症並びに脾臓における髄外造血増加も認められた。また、眼（角膜）、腎臓、肝臓、心臓、骨格筋、胃を含む様々な組織で、鉱質化が認められた。34 mg/kg BID でも同様の病理組織学的所見が認められたが、高用量群と比べて発現率及び重症度が低かった。11 mg/kg BID の個々の動物にも、胃腺上皮細胞変性、腸間膜リンパ節反応性リンパ組織過形成及びいくつかの組織における鉱質化が認められた。

103/69 mg/kg BID を投与した休薬期間後の動物では、主試験と同様の病理組織学的所見がいくつかの組織（腸、腺胃、骨髄、腸間膜リンパ節、脾臓及び肝臓、加えて角膜、心筋、腎皮質、肝臓、骨格筋及び胃筋層における組織鉱質化）に認められたが、主試験の動物と比べて発現率及び／又は重症度が低かった。

すべての用量群で一般状態変化、眼科学的検査所見、血液生化学的変化及び病理組織学的変化が認められたため、本試験で無影響量/無毒性量は確定できなかった。

2.6.6.3.3.3　マウスを用いた 26 週間反復経口投与、13 週間回復性及び雄受胎能評価試験（試験 VKS/0211）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では、CD-1 マウス（15 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を 0（媒体）、1、5 又は 20 mg/kg BID（0、2、10 又は 40 mg/kg/日、6 mL/kg/回）で 26 週間、1 日 2 回、約 12 時間間隔で強制経口投与した。これとは別に、10 例/性/群に 0 又は 20 mg/kg BID の用量で 26 週間投与し、13 週間休薬後、回復性を評価した。さらに、別の 18 例/性/群を対象に、すべての用量で TK 評価用の採血を行った。また、約 10 週間投与後に雄を非投与の雌と交尾させ、雄の受胎能を評価した。

セルメチニブを投与したすべての動物で、セルメチニブ及び N-脱メチル体への全身曝露が確認された。セルメチニブの曝露量は投与した用量範囲で用量に比例して増加し、26 週間の投与で蓄積は認められなかった。セルメチニブの曝露量は雌で雄より高かったが、N-脱メチル体の曝露量は雄の方が雌より高かった。N-脱メチル体の曝露量は、いずれの用量でもセルメチニブの約 3～28%であった。

20 mg/kg BID を投与した雄で忍容性がなく、8～16 週目に 14 例（主試験、回復評価及び TK 評価の動物の合計）が死亡し、この群の生存動物への投与は 16 週目以降中止した。死亡前、上記の雄には活動性低下／無反応、立毛、円背位、呼吸異常、蒼白化などが認められた。死亡したほとんどの雄の死因は下部尿路の変化によるものであり、具体的には、球海綿体筋の海綿体の腫脹、うっ血及び／又は出血、尿道の出血性・炎症性変化、陰茎尿道の閉塞、膀胱の著明な膨満などが認められた。剖検で 2 例に膀胱破裂が認められた。尿道閉塞による逆流圧のため、二次的変化が尿管（膨張）、精嚢（浮腫）、前立腺（浮腫）及び腎臓（膨張、骨盤拡大、破裂）で認めら

れた。20 mg/kg BID では、11～25 週目にさらに雄 1 例及び雌 6 例が死亡した。これらの死因は大腸、特に結腸及び盲腸のびらん性・炎症性変化で、穿孔及び／又は腹膜の変化も散見された。肝臓、脾臓、骨髄及びリンパ節にも変化が認められたが、これらは腸の炎症による二次的変化と考えられた。早期死亡したその他の雄のうち、3 例の結腸及び十二指腸にも炎症性変化が認められた。死亡した雄のうち 2 例の肝臓には、多巣性の鉱質化が認められた。

16 週目以降の投与が中止された 20 mg/kg BID の雄については、屠殺前に健康状態の悪化を示す変化はみられなかった。しかし、病理組織学検査では、これらの動物のほとんどで下部尿路に変化（球海綿体筋の海綿体のうっ血、包皮腺の炎症／壊死、及び 1 例における著明な尿道管腔拡大）が認められたが、尿道閉塞や膀胱膨満を示す所見は認められなかった。また、これらの雄の 1 例以上で、以下の変化が認められた；消化管（結腸、盲腸、直腸及び十二指腸の炎症性変化、関連してときに上皮過形成及び／又は粘膜潰瘍形成並びに固有筋層の変性）、下垂体（うっ血）、骨髄（顆粒球生成増加）、脾臓（顆粒球存在量増加）及び腸間膜リンパ節（形質細胞増加レベルの増加）。

26 週間の投与終了時に生存していた 20 mg/kg BID の雌では、体重増加量減少（対照群での体重増加量の 56%）、一般状態の変化（頻呼吸）及び毒性を示す病理組織学的変化が認められ、関連して血液学的検査及び血液生化学的検査で変化が認められた。病理組織学的検査では消化管にびらん性・炎症性の変化が認められ、リンパ細網系に二次的な反応性変化が認められた。

20 mg/kg BID を 15～26 週間投与した動物にみられた炎症性変化及び造血系の変化を反映して、赤血球指数（赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン）減少並びに総白血球数、好中球数、好酸球数、単球数、網状赤血球数及び血小板数の増加（骨髄の活動性増加に伴う二次的影響）が認められた。20 mg/kg BID を 15/26 週間投与した雌雄では、血液生化学的検査値の変化として、血漿アルブミン及びアルブミン：グロブリン（A/G）比の低下、血漿グルコース減少（雌）、血漿リン、ナトリウム及びカルシウムの増加（雄）並びに血漿尿素の変化（雄：増加、雌：減少）が認められた。

13 週間の休薬期間後、ほとんどの値が正常に回復するか部分的に回復したが、セルメチニブの 15 又は 26 週間の投与と関連すると考えられる所見も認められた。しかし、これらの所見は 26 週間の投与期間終了時と比べると重症度が低く、部分的回復を示していた。軽微な変化が個々の動物の肝臓（多巣性鉱質化）、結腸（炎症）、盲腸（炎症）及び脾臓（脾臓重量増加、対応する組織学的所見なし）にみられた。いくつかの血液生化学的検査値は完全には回復せず、特に、血漿尿素及びリンはセルメチニブを投与した雄で高値に留まり、アルブミン及びコレステロール値は雌で低く、A/G 比は雌雄ともに低かった。

マウスへの 5 mg/kg BID の 6 カ月間反復経口投与は忍容性良好で、投与と関連する死亡や毒性変化は認められなかった。体重増加量のわずかな減少（雌のみ、対照群の体重増加量の 81%）、軽度の血液学的変化（好中球数及び単球数の増加）及び血液生化学的検査値の変化（血漿リン増加、雄のみ）が認められた。過形成を伴う軽微～軽度の炎症が少数の動物の結腸、盲腸及び直腸に認められ、軽微な多巣性鉱質化が 1 例の肝臓に認められた。1 mg/kg BID を 26 週間投与した動物では、投与との関連が考えられる所見は、雄 1 例と雌 2 例の結腸に認められた上皮過形成を伴う軽微な炎症のみであった。

雄受胎能の評価では、雄に最高 20 mg/kg BID を 10 週間投与しても交尾行動と受胎能に影響はないことが示された。

最低用量の 1 mg/kg BID でも大腸に投与と関連する変化が認められたため、本試験で無毒性量は確定できなかった。

2.6.6.3.4　セルメチニブ硫酸塩を用いたカニクイザルでの反復投与毒性試験

2.6.6.3.4.1　カニクイザルを用いた MTD、28 日間反復経口投与及び 28 日間回復性試験（試験 VKS/0153）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では最初に MTD を評価し、引き続いて 1 カ月間の反復投与を行った。MTD 評価期では、セルメチニブ硫酸塩を雄 2 例と雌 2 例のカニクイザルに 12 時間間隔で 1 日 2 回、強制経口投与した（0.5 mL/kg/回）。投与用量は 0.92 mg/kg BID（1～7 日目）、3 mg/kg BID（9～14 日目）、7.5 mg/kg BID（15～21 日目）及び 15 mg/kg BID（22～35 日目）であり、1 日当たりの用量はそれぞれ、2、6、15 及び 30 mg/kg/日であった。

28 日間反復投与期では、各群 2 例/性からなる 4 群のカニクイザルを用意した。このうち 3 群（群 2～4）にセルメチニブ硫酸塩を 0、5 又は 10 mg/kg BID の用量（0、10 又は 20 mg/kg/日）で投与した。次に回復評価群（群 5）に投与を開始したが、最初に投与を開始した 3 群の一般状態の評価に基づいて用量を選択するため、3 群の投与開始から 14 日間遅れて投与を開始した。群 5 への投与は 10 mg/kg BID で開始したが、群 4 への 14 日間の 10 mg/kg BID 投与後に認められた一般状態の変化から、群 4 は残りの期間の投与に耐えられないことが明らかになった。群 4 への投与は 1 日休止し、その後、16 日目から 7.5 mg/kg BID（15 mg/kg/日）に減量して最終日まで投与した。それに伴い回復評価群（群 5）の用量は 2 日目から 5 mg/kg BID に減量した。28 日間の休薬期間後に回復性評価を可能にするため、及び本試験で使用した用量と一致させるため、回復評価群（群 5）の用量は 7.5 mg/kg BID より低い用量を選択した。

5、10/7.5 又は 10/5 mg/kg BID で 28 日間投与した時点で、これらの用量はさらに長期の投与に適さないことが明らかであったため、別の群（群 6）を追加し、この群に 1.5 mg/kg BID（3 mg/kg/日）を 28 日間投与した。28 日間休薬後の回復性については 10/5 mg/kg BID 群を対象に評価した。病理組織学的検査は、MTD 評価対象並びに 10/7.5 mg/kg BID を 1 カ月間投与した動物及びその同時対照群のみで実施した。

MTD 評価期では、セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの全身曝露が確認された。低用量側の用量範囲では用量の増量に伴いセルメチニブの血漿中濃度は概ね増加したが、7.5～15 mg/kg BID の用量では血漿中濃度の明白な増加は認められなかった。

MTD 評価期では、7.5 mg/kg BID の 6 日間又は 7 日間投与までは概ね忍容性良好であった。15 mg/kg BID では、一般状態不良のために雄 1 例を 31 日目（15 mg/kg BID の投与 10 日目）に屠殺した。この動物に認められた一般状態の所見は、腹部不快感（触診で疼痛応答）、持続的な軟便／液状便／赤色便、肛門からの赤色分泌物、軽度の脱水及び体重減少（以前の最高体重から 5%減少）であった。反応性急性失血と貧血に関連すると考えられる臨床病理所見として、ヘモグロビン、赤血球数及びヘマトクリットの減少、網状赤血球数増加、並びにアルブミン及び A/G 比の低下が認められた。しかし、病理組織学的検査では、この動物に意義のある所見は認められなかった。雌 1 例で軽微な肛門からの赤色分泌物／排泄物がときおり認められ、主な二次的変化として、赤血球パラメータ（ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球数）の減少、網状赤血球数、トリグリセリド及びクレアチニンの増加、そして同時に血漿アルブミン及び A/G 比の低下が認められた。他の数例でも、軽微な軟便／液状便及び軽度の腹部不快感（触診で疼痛応答）が認められた。他の雌 1 例の剖検で胃にうっ血領域が認められ、病理組織学的検査でこれを反映した所見（出血、粘膜の炎症、壁側細胞変性、粘膜下浮腫）が認められた。

28 日間反復投与期では、セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの全身曝露が確認された。曝露量は試験を実施した用量範囲で概ね用量に比例して増加し、性差は認められなかった。蓄積は 1.5 mg/kg BID 及び 5 mg/kg BID では認められなかったが、7.5 mg/kg BID では若干認められた。N-脱メチル体濃度は 1 日目にセルメチニブ濃度の約 0.05～0.2%、16 及び 28 日目では検出限界未満であった。

セルメチニブ 1.5、5、10/5 又は 10/7.5 mg/kg BID の 28 日間投与で死亡は発生せず、体重及び摂餌量への影響も認められなかった。5 mg/kg BID 以上の用量では軟便が主な一般状態変化として認められ、これは投与期間が長くなるにつれて液状便に変化し、高用量群では脱水を示す変化（眼の軽微なくぼみ）も伴っていた。高用量群では、16 日目に 10 mg/kg BID から 7.5 mg/kg BID に減量された後も、一部の動物で持続的な軟便／液状便、立毛、毛づくろいされない外観などが認められ、雄 1 例で 3 日間（23～25 日目）の休薬措置がとられる重症度であった。また、一部の動物で軽度の脱水がみられ、肛門からの赤色分泌物がときおり認められた。短期の休薬とその後の用量減量後、概して雌のみに間欠的で軽微な軟便及び／又は液状便が認められた。下痢の重症度にかかわらず、体重と摂餌量に影響はなかった。1.5 mg/kg BID では、散発的で軽微な軟便／液状便が認められたのみであった。5 mg/kg BID 以上では、赤血球パラメータの減少、網状赤血球数及び好中球数の増加並びに血漿総タンパク、アルブミン及び／又は A/G 比の低下も認められた。しかし、10/7.5 mg/kg BID の 28 日間反復投与に起因する病理組織学的変化は認められなかった。10/5 mg/kg BID では、28 日間の休薬後、投与期間中に認められた消化管所見（液状便）及び臨床病理所見の回復性が認められた。高用量群（10/7.5 mg/kg BID）で 28 日間の投与後に病理組織学的所見が認められなかったこと、及び回復評価群（10/5 mg/kg BID を投与した群 5）で 28 日間の休薬後に剖検所見が認められなかったことから、回復評価群では病理組織学的検査を実施しなかった。

1.5 mg/kg BID の投与で意義のある変化が認められなかったことから、この用量が 1 カ月間反復経口投与時の無毒性量と考えられた。

2.6.6.3.4.2　カニクイザルを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（試験 VKS/0210）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では、カニクイザル（4 例/性/群）に 0（媒体）、0.5、1.5 又は 4 mg/kg BID（0、1、3 又は 8 mg/kg/日、0.5 mL/kg/回）で 26 週間、1 日 2 回、約 12 時間間隔で強制経口投与した。

セルメチニブを投与したすべての動物で全身曝露が確認され、曝露量に性差は認められなかった。曝露量は 0.5～4 mg/kg BID の範囲で用量に比例して増加したが、すべての用量で曝露量の蓄積が認められた。

カニクイザルへのセルメチニブの 0.5、1.5 又は 4 mg/kg BID の 26 週間投与により、軟便／液状便が発現した。これは主に 4 mg/kg BID の特に雌で認められ、ときに脱水を示す変化及び／又は体重減少を伴っていた。そのため、試験期間中に一部の動物にはときおり補水が行われた。高用量（4 mg/kg BID）の雌 1 例は体重減少（10%）のため、18～19 週目の 7 日間、投与が休止されたが、十分な回復がみられたため、19 週目の 2 日目に投与が再開された。1.5 mg/kg BID の特に雌でも軟便／液状便が低頻度にみられた。また、1.5 mg/kg BID の雌 1 例では 18 週目に潜血を伴う暗色便及び軽微な脱水が認められ、そのため 18～19 週目の短期間（3.5 日間）、回復するまで投与が休止された。

4 mg/kg BID では、雌雄ともに、血漿アルブミン及び A/G 比の低下並びに β 及び γ グロブリンの平均値高値が認められた。片性または両性で、血漿 AST 増加並びにコレステロール及びカル

シウムの減少も認められた。4 mg/kg BID の雄 1 例は 4～26 週目に血漿リン増加を示した。1.5 mg/kg BID では、軽微な血漿リン増加が雄に認められ、A/G 比低下が雌雄に認められた。

セルメチニブの最高 4 mg/kg BID での 26 週間投与で、投与に起因する病理組織学的変化は認められなかった。試験報告書では、26 週間の経口投与における無毒性量は 1.5 mg/kg BID と判断された。その後、試験データをさらに検討したところ、雄の無毒性量は 1.5 mg/kg BID と考えられたが、雌では 18 週目に 1 例に液状便及び脱水が認められたことから、無毒性量は確定できないと判断された。無影響量は 0.5 mg/kg BID と考えられる。

2.6.6.3.4.3　カニクイザルを用いた 9 カ月間反復強制経口投与毒性試験（試験 512415）

概要表 2.6.7.7 項

本試験では、4 群のカニクイザル（4 例/性/群）に 0（媒体：Captisol の 30%水溶液）、0.5、1.5 又は 2.5 mg/kg BID（0、1、3 又は 5 mg/kg/日）の用量で 1 日 2 回（約 12 時間±30 分間隔）9 カ月間反復強制経口投与した。

本試験の評価項目は、死亡、一般状態、体重、眼科学的検査。心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、尿化学的検査、生物分析、TK、器官重量、剖検及び病理組織学的検査であった。

すべての投与液サンプルは許容基準内であった。

セルメチニブを投与した全例で全身曝露が確認され、曝露量に性差は認められなかった。曝露量は 0.5～2.5 mg/kg BID の範囲で用量に比例して増加した。1 日 2 回 9 カ月間にわたる投与後においても、蓄積性は認められなかった。

2.5 mg/kg BID の雄 2 例及び雌 3 例、並びに 1.5 mg/kg BID の雌 1 例で、試験 274 日目（39 週目）のみに病理組織学的変化を伴わない鼠径リンパ節の腫脹がみられた。さらに、1.5 mg/kg BID 以上で、試験 5 週目までに散発的な軟便／液状便がみられた。

2.5 mg/kg BID において、試験期間を通して軽度の体重増加抑制が認められた。

試験 13 週目に、1.5 mg/kg BID 以上の雄及び 2.5 mg/kg BID の雌で一時的な好中球数及び白血球数の増加が認められた。すべての測定時点において、1.5 mg/kg BID の雌 1 例及び 2.5 mg/kg BID の大部分の雌で軽度で進行性の好酸球数増加がみられた。試験 26～39 週目において、2.5 mg/kg BID で AST 活性の増加が認められた。

その他の検査項目には、セルメチニブ投与に関連すると考えられる変化はみられなかった。セルメチニブをカニクイザルに 2.5 mg/kg BID（5 mg/kg/日）までの用量で 1 日 2 回（12 時間間隔）9 カ月間反復経口投与したときの忍容性は良好であり、1.5 mg/kg BID 以上で試験 274 日目（39 週目）のみに鼠径リンパ節の腫脹が、2.5 mg/kg BID では試験期間を通して軽度の体重増加抑制がみられた。臨床病理検査においては、1.5 mg/kg BID 以上で軽微で一時的な白血球系の増加、及び 2.5 mg/kg BID で AST 活性の上昇が認められた。以上より本試験の無毒性量は、2.5 mg/kg BID（5 mg/kg/日）と判断された。

2.6.6.4　遺伝毒性試験

セルメチニブの遺伝毒性を *in vitro* で評価するため、細菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）及び哺乳類細胞を用いた遺伝子突然変異試験（マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた *tk* 遺伝子座アッセイ）により、いずれも代謝活性化系（S9）存在下及び非存在下で検討した。これ

らの *in vitro* 試験では、セルメチニブ遊離塩基を使用した。また、マウス骨髄小核試験により、セルメチニブの遺伝毒性を *in vivo* でも評価した。この小核試験では、セルメチニブ遊離塩基と硫酸塩の両方を使用した。これらの遺伝毒性試験の媒体は、セルメチニブ遊離塩基を用いた試験では 20%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを使用し、セルメチニブ硫酸塩を用いた試験では 30% Captisol を使用した。このほか、一連の探索的遺伝毒性試験（セントロメア標識試験を含む）を実施し、遺伝毒性の機序を *in vivo* で検討した。

また、セルメチニブの N-脱メチル代謝物（N-脱メチル体）の遺伝毒性を、細菌を用いた Ames 試験及びマウスリンパ腫細胞を用いた TK アッセイにより *in vitro* で検討した（2.6.6.8.5 項参照）。

2.6.6.4.1　セルメチニブ遊離塩基

2.6.6.4.1.1　*In vitro* 試験

2.6.6.4.1.1.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 AA78NV.503.BTL）

概要表 2.6.7.8 項

セルメチニブ遊離塩基は、本試験条件下で 5000 µg/プレートまでの濃度において、代謝活性化系（ラット S9）の有無に拘わらず、ネズミチフス菌（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株）及び大腸菌（WP2 *uvrA* 株）に対して突然変異誘発性を示さなかった。

2.6.6.4.1.1.2　マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた遺伝子突然変異試験（試験 AA78NV.704.BTL）

概要表 2.6.7.8 項

マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた *tk* 遺伝子座アッセイにおいて、セルメチニブ遊離塩基は、代謝活性化系（ラット S9）の有無にかかわらず、析出及び／又は毒性による限界濃度まで突然変異誘発性を示さなかった（試験最高濃度：150 µg/mL）。

2.6.6.4.1.2　*In vivo* 試験

セルメチニブ遊離塩基の *in vivo* 遺伝毒性を、マウス骨髄で小核を有する未成熟赤血球（PCE）の割合を計数することにより、本試験の限界用量（2000 mg/kg）まで評価した。

2.6.6.4.1.2.1　マウスを用いた小核試験（試験 AA78NV.123.BTL）

概要表 2.6.7.9 項

本試験では、最初に忍容性を評価する用量設定試験を実施し、その後小核試験を実施した。用量設定試験では、ICR マウス（雄 2 例/群）にセルメチニブ遊離塩基を 1、10、100 又は 1000 mg/kg（容量 20 mL/kg）で単回強制経口投与した。また、別の ICR マウスの 1 群（雌雄各 5 例）に 2000 mg/kg を単回投与した。投与後、3 日間毒性変化の発生を観察した。死亡した動物はなく、2000 mg/kg 群の雄に立毛が認められたのみであった。

小核試験では、ICR マウス（雌雄各 5 例/群）にセルメチニブ遊離塩基を 0（媒体）、500、1000 又は 2000 mg/kg の用量で単回経口投与した。また、陽性対照としてシクロホスファミド 50 mg/kg を雌雄各 5 例に単回経口投与した。マウスは投与 24 時間後又は 48 時間後（2000 mg/kg 群のみ）に屠殺し、大腿骨髄サンプルを採取した。骨髄細胞（PCE 及び NCE）を顕微鏡下で観察し、小核の有無を評価した。各動物につき 2000 個の PCE を観察した。2000 個の PCE 中の小核

を有するNCE数を計数し、また総赤血球に対するPCEの割合を赤血球1000個当たりの数として算出した。

2000 mg/kgでは、投与から24時間後に小核を有するPCEの数が顕著に増加した。同様の増加は投与48時間後にはみられず、2000 mg/kgより低用量のセルメチニブ投与群でもみられなかった。媒体投与群及び陽性対照群のデータは背景データと一致し、試験の妥当性が確認された。

以上のように、セルメチニブはマウス小核試験において陽性であった。

2.6.6.4.1.2.2　マウスを用いた小核試験（試験0156QM）

概要表2.6.7.9項

本試験の目的は、セルメチニブのマウスへの単回経口投与により、骨髄中で小核を有するPCEの発現率が増加するかどうかを検討し、小核誘発の無影響量を確認することであった。本試験で作製したスライド標本は、0120KY試験でも異数性誘発性を評価するために使用した（2.6.6.4.2.2.2項参照）。本試験は2段階で構成されており、第1期ではCD-1マウス（雄7例/群）にセルメチニブ遊離塩基を0、500、1000又は2000 mg/kgの用量（20 mL/kg）で単回経口投与した。また、陰性対照として媒体を、陽性対照としてシクロホスファミド（65 mg/kg）を別の雄の群に単回経口投与した。さらに、セルメチニブの各用量につき別の雄3例にも投与を行い、セルメチニブ及びN-脱メチル体のTKを評価した。主試験の動物は投与から24時間後又は48時間後に屠殺し、大腿骨髄標本を作製した。PCEを2000個計数し、小核を有するPCEの割合を算出した。骨髄毒性の指標として、細胞1000個を対象にPCEのNCEに対する比を算出した。24時間時点で小核を有するPCEの割合を評価すると、大きな群内変動が認められたため、さらに4000個のPCEを計数し、最初の2000個の計数結果と合算した。第1期では、セルメチニブはすべての用量で、骨髄中における小核を有するPCEの割合を有意に増加させた。この増加は投与24時間後に認められ、投与48時間後では認められなかった。骨髄毒性を示す所見は認められなかった。

第2期の目的は、第1期の投与24時間時点で得られた所見を確認するとともに、無影響量を決定することであった。雄7例/群にセルメチニブを0、50、160又は500 mg/kg（投与容量20 mL/kg）を単回経口投与した。各用量につき別の3例にも投与し、投与から1、4及び24時間後の時点でTK評価用の採血を行った。動物は投与24時間後に屠殺し、大腿骨髄標本を作製した。PCEを2000個計数し、骨髄毒性の指標として、細胞1000個を対象にPCEのNCEに対する比を算出した。この第2期では、試験を実施したいずれの用量でも小核を有するPCEの割合は増加しなかった。

本試験で、セルメチニブの最高血中濃度は18～32 μg/mLの範囲であった。500 mg/kg以上では最高曝露量の明確な増加が認められず、吸収の制限が示唆された。N-脱メチル体の血漿中濃度はセルメチニブ濃度の10%未満で、曝露量はセルメチニブの用量が増加しても増加しなかった。

セルメチニブは1000又は2000 mg/kgの用量で投与24時間後に小核を有するPCEの割合を有意に増加させた。投与48時間後には、同様の増加は認められなかった。500 mg/kgでは結果が不明確で、第1期では投与24時間後に小核増加が認められたが、第2期では認められなかった。

セルメチニブ遊離塩基を用いて実施した結果、小核誘発に関する無影響量は160 mg/kgと考えられた。

2.6.6.4.2　セルメチニブ硫酸塩

小核誘発に関する無影響量を決定するため、セルメチニブ硫酸塩を用いてマウス骨髄中の小核を有する PCE の割合を計数し、セルメチニブ硫酸塩の *in vivo* 遺伝毒性を評価した。

2.6.6.4.2.1　*In vivo* 試験

2.6.6.4.2.1.1　マウスを用いた小核試験（試験 0416QM）

概要表 2.6.7.9 項

本試験では、セルメチニブ硫酸塩がマウスの骨髄に小核を有する PCE を誘発するか否かを検討した。CD-1 マウス（雄 7 例/群）にセルメチニブ硫酸塩を 0、24、121 又は 242 mg/kg/日（投与容量 10 mL/kg）で 2 回、24 時間間隔で経口投与した。また、陽性対照としてシクロホスファミド（65 mg/kg）を別の 3 例に単回経口投与した。動物は 2 回目投与から 24 時間後に屠殺し、大腿骨髄試料を採取した。各動物につき未成熟赤血球を 2000 個中の小核を有する PCE 数を計数した。骨髄毒性の指標として、細胞 1000 個を対象に PCE の NCE に対する比を算出した。

121 mg/kg/日及び 242 mg/kg/日では、骨髄中の小核を有する PCE の割合が有意に増加した。24 mg/kg/日の投与では小核の増加はみられず、この用量が無影響量と考えられた。骨髄毒性を示す所見は認められなかった。

2.6.6.4.2.2　遺伝毒性検討試験

セルメチニブを投与したマウスの骨髄で認められた小核誘発が、染色体切断（構造的染色体異常誘発性）によるものか、あるいは染色体損失（異数性誘発性）によるものかを検討する試験を実施した。

2.6.6.4.2.2.1　マウスリンフォーマ細胞を用いた遺伝子突然変異試験及び *in vitro* 小核試験（試験 0480QV）

概要表 2.6.7.8 項

この GLP 非適用の *in vitro* 試験では、セルメチニブ遊離塩基の遺伝子突然変異誘発能を、マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた *tk* 遺伝子座アッセイにより評価し、同じ細胞株を用いて小核誘発能についても評価した。最初の試験では、細胞を S9 存在下で被験薬に曝露させ 3 時間培養、あるいは S9 の非存在下で 3 時間及び 24 時間培養した。さらに、S9 非存在下で 16 時間培養する *in vitro* 小核試験を 2 回実施した。

最初の試験では、細胞を最高 160 µg/mL までの濃度で 3 時間及び 24 時間、S9 存在下及び非存在下のいずれで曝露させても、突然変異の発現率と小核を有する細胞の割合に有意な増加は認められなかった。128 µg/mL 以上の濃度で析出が概して認められた。S9 非存在下で 16 時間培養する *in vitro* 小核試験では、最高濃度（275 µg/mL）で小核数のわずかな増加（対照の 3 倍）が認められた。しかし、この濃度では細胞毒性が認められた（生存率 4%）。また、2 回目の試験ではこの増加は再現されなかった。したがって、1 回目の試験で観察された増加は生物学的意義がないと考えられた。

小核試験で 16 時間培養後に作製したスライド標本の一部をセントロメア標識試験でも使用した。小核数の軽度増加が認められた 1 回目の試験では、セントロメア陽性の小核が増加し、小核形成の機序として異数性の誘発が考えられた。対照と比較した分裂異常の増加も認められたが、これは分裂中の細胞における毒性反応である可能性が高いと考えられた。2 回目の試験では小核

は誘発されなかったが、0.1 mmol/L で分裂異常が認められた。これらの観察結果はセルメチニブの作用機序と一致するものと考えられた。

以上のように、マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた *tk* 遺伝子座アッセイでセルメチニブに突然変異誘発性は認められなかった。セルメチニブで処理後、小核数の軽度増加が認められたが、これは陽性結果の再現性基準を満たさなかった。

2.6.6.4.2.2.2 マウス単回投与小核試験のスライド標本を用いたセントロメア標識試験（試験 0120KY）

この GLP 非適用試験では、マウス小核試験（試験 0156QM、2.6.6.4.1.2.2 項参照）で作製した非染色スライドをマウス汎セントロメア DNA プローブを用いて蛍光標識し、セントロメアシグナルの有無を評価した。小核内にセントロメアシグナルが存在すれば、小核内に染色体全体が存在することを意味し、その小核は異数性誘発により生じたと考えられる。小核内にセントロメアシグナルが存在しなければ、染色体切断により染色体の断片化が生じていることを意味する。

セルメチニブ 500 mg/kg を投与したマウスで認められた小核は、すべてセントロメア陽性であった。1000 mg/kg 及び 2000 mg/kg では、認められた小核のそれぞれ 59%及び 61%がセントロメア陽性であった。これは、形成された小核のほとんどが染色体損失の結果であることを示唆し、異数性誘発が原因と考えられた。

以上のように、セルメチニブ投与マウスの骨髄細胞に誘発された小核のほとんどでセントロメアシグナルが検出されたことから、セルメチニブは異数性誘発性の作用を有すると判断された。最高用量でセントロメア陽性小核の割合が減少したが、このことは異数性誘発物質が細胞毒性を示す用量で他の染色体異常も誘発するという報告と一致している。

2.6.6.5 がん原性試験

がん原性試験での用量を決定するため、用量設定試験として、Han Wistar ラットを用いた最長 3 カ月間、及び CByB6F1 ハイブリッドマウスを用いた最長 1 カ月間の反復投与毒性試験を実施した。媒体にはがん原性試験で使用するものと同じ媒体を使用した。がん原性試験では、Han Wistar ラット及び CByB6F1/Tg rasH2 ヘミ接合体マウスを用い、セルメチニブ硫酸塩を投与した。10%エタノール、30% PEG 400 及び 60% Phosal 50 PG（50%（w/w）ホスファチジルコリン、3%（w/w）ベニバナ種子油及び 40%（w/w）プロピレングリコール）を含有する媒体を用いて調製した。

2.6.6.5.1 セルメチニブ硫酸塩を用いたラットがん原性試験

2.6.6.5.1.1 ラットを用いた MTD/14 日間経口反復投与毒性試験（試験 528072）

概要表 2.6.7.10 項

Wistar ラットを用いた 2 年間のがん原性試験の用量設定試験として実施したこの GLP 非適用試験は、MTD 評価期とその後の用量設定期から構成されていた。MTD 評価期では、ラット（3 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を最長 4 日間、1 日 1 回強制経口投与した（投与容量 10 mL/kg）。雄には 100 mg/kg/日若しくは 50 mg/kg/日の用量で 3 日間又は 15 mg/kg/日で 4 日間投与し、雌には 100、150 又は 200 mg/kg/日で 4 日間投与した。用量設定期では、セルメチニブ硫酸塩を雄には 0、7.5、15 又は 25 mg/kg/日（3 例/群）、雌には 0、25、50 又は 100 mg/kg/日（3 例/群）で 14 日間 1 日 1 回反復投与した。セルメチニブと N-脱メチル体の TK 評価のため、主試験とは別のラッ

トにもセルメチニブを投与した。剖検時に組織を採取したが、病理組織学的検査は実施しなかった。

MTD 評価期と用量設定期のいずれにおいても、投与したすべての動物でセルメチニブ及び N-脱メチル体への曝露が確認された。セルメチニブの曝露量は概ね用量比を下回って増加した。セルメチニブの全身曝露量は N-脱メチル体の曝露量より大きかった。N-脱メチル体の曝露量増加は、概して雌雄それぞれの用量範囲で、雄では概ね用量に比例して増加し、雌では用量比を下回って増加した。反復投与による曝露量の蓄積は認められず、N-脱メチル体の曝露量は 14 日目には一貫して低値を示した。

MTD 評価期では、100 又は 50 mg/kg/日を最長 4 日間 1 日 1 回投与した雄ラットで、一般状態変化として歩行異常、暗色眼、円背位、立毛、不規則呼吸、冷触感、半眼、抑制行動、活動性低下、努力呼吸／浅呼吸、一過性の鋤起こし様動作、流涎などが認められたため、すべての動物を 3 日目又は 4 日目に屠殺した。剖検では、胸腔及び気管に体液貯留（100 mg/kg/日のみ）、心臓に蒼白病巣がそれぞれ認められた。15 mg/kg/日の 4 日間投与の忍容性は良好であったが、剖検で気管に体液貯留が認められた。雌では、100、150 及び 200 mg/kg/日の投与は忍容性があったが、すべての用量で体重減少（最高 8%）、白血球数増加（主に好中球数及び単球数の増加に起因）、血漿 AST 増加及び血漿カリウム減少が認められた。150 及び 200 mg/kg/日の雌では、胸腔に体液貯留、心臓に蒼白病巣がそれぞれ認められた。

14 日間投与した用量設定期では、すべての用量群の雌で皮膚病変（背側と腹側での痂皮）が認められた。また、50 及び 100 mg/kg/日の雌では体重増加量減少（対照と比較して最大で 96%減）も認められた。白血球数の変化が 25 mg/kg/日の雄（好中球数及び単球数の増加）並びに 25、50 及び 100 mg/kg/日の雌（好中球数及び単球数の増加、リンパ球数及び網状赤血球数の減少）で認められた。血液生化学的検査値の変化として、15 及び 25 mg/kg/日の雄で AST 増加が認められた。雌では、すべての用量で GLDH 増加及びリン酸増加が認められた。50 及び 100 mg/kg/日の雌では、血漿グロブリン増加及び随伴するアルブミン減少並びにカリウム低下が認められた。剖検では、7.5 mg/kg/日以上の雄及び 50 mg/kg/日以上の雌の肺及び／又は気管に変色／体液貯留が認められた。腸間膜リンパ節の変色がすべての用量の雄及び 100 mg/kg/日の雌 1 例に認められた。

すべての用量で雌に皮膚病変が認められたこと、及びすべての用量で雄の肺及び／又は気管に剖検所見が認められたことから、本試験での無毒性量は確定できなかった。

2.6.6.5.1.2　ラットを用いた 3 カ月間反復経口投与毒性試験（試験 528088）

概要表 2.6.7.10 項

本試験は 2 年間のがん原性試験で使用する用量選択をサポートするために実施した。本試験では 6 群の Wistar ラット（10 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を最長 92 日間、1 日 1 回経口投与した（投与容量 10 mL/kg）。試験開始時の用量は、雄では 0、5、10 又は 20 mg/kg/日、雌では 0、12.5、25 又は 50 mg/kg/日であった。しかし、20 mg/kg/日の雄並びに 25 及び 50 mg/kg/日の雌で認められた一般状態の変化に基づき、これらの動物は 3 カ月間の投与を完了できないと考えられたため、30 日目に早期屠殺した。新たに 2 群の Wistar ラット（10 例/性/群）を組み入れ、雄には 1 及び 2.5 mg/kg/日、雌には 2.5 及び 5 mg/kg/日を 92 日間投与した。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの曝露が確認された。セルメチニブの全身曝露量は、雄では試験を実施した用量範囲で概ね用量に比例して増加し、雌では 2.5～5 mg/kg/日の用量範囲では概ね用量に比例して増加し、それより高用量では用量比を下回って増

加した。試験期間中、蓄積は認められなかったが、28 日目及び 13 週目のセルメチニブの曝露量は雌の方が高かった。

26 日目に 50 mg/kg/日の雌 2 例を早期屠殺した。屠殺前、これらの動物には、一般状態の変化として、背側・腹側に複数の皮膚病変及び／又は痂皮、過剰な毛づくろい／引っ掻き行動、立毛／粗毛、鋤起こし様動作などが認められた。病理組織学的検査では、2 例ともに、皮膚潰瘍形成、大腿骨の骨端軟骨異形成、大腿骨髄での細胞充実性低下、及び様々な組織で鉱質化が認められた。20 mg/kg/日の雄並びに 25 及び 50 mg/kg/日の残りの雌でも一般状態の変化が認められ、その重症度に基づき、これらの動物は 30 日目に早期屠殺した。屠殺前、これらの動物に認められた一般状態変化は 26 日目に早期屠殺した 2 例の雌と類似していた。臨床病理検査値の変化として、血小板数増加、赤血球量（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット）減少及び随伴する網状赤血球数増加が 25 及び 50 mg/kg/日の雌で認められた。また、ALT 増加並びにリン酸塩高値、アルブミン低値及びグロブリン増加が認められた。30 日目に屠殺した動物で認められた病理組織学的変化は、26 日目に屠殺した 2 例の雌のものと類似していた（皮膚潰瘍形成、大腿骨の骨端軟骨異形成、大腿骨髄での細胞充実性減少、胃・腎臓・大動脈・心臓・腸間膜リンパ節・肺・舌などの複数の組織での鉱質化）。

セルメチニブを 3 カ月間投与した動物では、最も多かった一般状態変化は、すべての用量の雌及び 5 mg/kg/日以上の雄で認められた皮膚病変及び／又は痂皮であった。これらの皮膚病変／痂皮の発現率及び重症度は高用量ほど高かった。すべての用量群で、立毛／粗毛、薄い毛皮、啼鳴増加、不規則呼吸、鋤起こし様動作及び流涎が散発的に認められた。雌では 12.5 mg/kg/日以上で血小板数増加が認められた。10 mg/kg/日以上の雄及び 12.5 mg/kg/日以上の雌で軽微な AST 増加が認められた。2.5 mg/kg/日以上の雌でリン酸塩高値が認められた。2.5 mg/kg/日以上の雌でアルブミン低値及び／又はグロブリン増加が認められた。剖検では、皮膚の所見（痂皮）に加え、腋窩リンパ節及び／又は下顎リンパ節の拡大が 10 mg/kg/日以上の雄及び 12.5 mg/kg/日以上の雌で認められた。雌では副腎及び腎臓の重量増加が 12.5 mg/kg/日で認められ、雄では 2.5 mg/kg/日以上で脾臓重量の増加が認められた。

病理組織学的検査では、皮膚潰瘍形成が 5 mg/kg/日の少数の雄（軽微～軽度）、2.5 mg/kg/日の少数の雌（軽微～軽度）及び 5 mg/kg/日以上のほとんどの雌（軽微～中等度）に認められた。また、26/30 日目に屠殺した高用量の動物より少ない組織で鉱質化が認められた。具体的には、以下の組織で鉱質化が認められた：腺胃（5 mg/kg/日以上の雄及び 12.5 mg/kg/日以上の雌で軽微）、腎臓（1 mg/kg/日以上の雄及び 2.5 mg/kg/日以上の雌で軽微）及び肝臓（1 mg/kg/日の雄 1 例で軽微）。10 mg/kg/日群の雄では、大腿骨で軽微な骨端軟骨異形成が認められた。12.5 mg/kg/日群の一部の雌では、大腿骨髄において軽度の造血増加が認められた。

2.5 mg/kg/日群の雄で認められた腎臓の鉱質化は毒性変化ではないと考えられたため、本試験における雄での無毒性量は 2.5 mg/kg/日と考えられた。しかし、雌ではすべての用量で皮膚潰瘍形成が認められたため、無毒性量は確定できなかった。

2.6.6.5.1.3　ラットを用いたセルメチニブ硫酸塩の 2 年間強制経口投与がん原性試験（試験 501094）

概要表 2.6.7.10 項

3 群の Han Wistar CRL：WI（Han）系ラット（50 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を 2 年間、1 日 1 回経口投与した。雄には 0.25、0.8 又は 2.5 mg/kg/日、雌には 0.1、0.3 又は 1 mg/kg/日を投与した。また、2 つの対照群（50 例/性/群）の一方に Milli-Q 水、他方に媒体（10%エタノール、

30% PEG 400、60% Phosal 50（50%（w/w）ホスファチジルコリン、3%（w/w）ベニバナ種子油及び 40%（w/w）プロピレングリコール））を投与した。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブへの曝露が確認された。対照群の試料からは、セルメチニブとその代謝物 N-脱メチル体は検出されなかった。雄にセルメチニブを 0.25～2.5 mg/kg/日の用量範囲で 52 週間反復投与したとき、平均 C_{max} は用量比を上回って増加し、$AUC_{(0\text{-}t)}$は用量に比例して増加した。雌に 0.1～1 mg/kg/日の用量範囲で投与したとき、平均 C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}t)}$ は用量比を上回って増加した。

雌雄とも、媒体対照群を含めたすべての投与群間で死亡率に統計的有意差（Kaplan-Meier 法）は認められず、触知可能な腫瘤の発現率はセルメチニブ投与により増加しなかった。セルメチニブ投与と関連がある一般状態の変化は、すべての用量の雌雄で痂皮及び毛皮の着色（黄色）が用量依存的に認められたのみであった。

2.5 mg/kg/日群の雄では、網状赤血球の絶対数及び割合が、対照群を含めた他群より低かった。いずれの用量のセルメチニブ投与群でも、腫瘍性所見や前腫瘍性所見は認められなかった。セルメチニブ投与と関連する病理組織学的所見は皮膚のびらん／潰瘍の散発的な発生が認められたのみで、これらは 0.8 mg/kg/日以上の雄で対照群を含めた他群より発現率及び重症度が高く、1 mg/kg/日の雌で対照群を含めた他群より重症度が高かった。2.5 mg/kg/日の雄では、対照群を含めた他群と比べ、腸間膜リンパ節での赤血球貪食／赤血球増加の発現率も高かった。

その他のすべてのパラメータに関して、セルメチニブ投与と関連する毒性学的意義のある変化は認められなかった。

以上のように、Han Wistar ラットに対しセルメチニブはがん原性を示さなかった。

2.6.6.5.2　セルメチニブ硫酸塩を用いた Tg マウスにおけるがん原性試験

2.6.6.5.2.1　CByB6F1 ハイブリッドマウスを用いた MTD/7 日間経口投与用量設定試験（試験 20062136）

概要表 2.6.7.10 項

この GLP 非適用試験は、rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間のがん原性試験のための用量設定試験として実施した。本試験では最初に MTD 評価を実施し、引き続いて用量設定試験を実施した。MTD 評価期では、CByB6F1 ハイブリッドマウス（Tg.rasH2 非 Tg 同腹児）（2 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を 25、50、100、200 又は 350 mg/kg BID（50、100、200、400 又は 700 mg/kg/日、投与容量 10 mL/kg/回）で試験 1 日目に 2 回強制経口投与し、5 日間観察した。用量設定期では、CByB6F1 ハイブリッドマウス（3 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を 0、25、75 又は 150 mg/kg BID（0、50、150 又は 300 mg/kg/日）で 7 日間、1 日 2 回投与した。用量設定期の 1 日目及び 7 日目に TK 評価を行う目的で、主試験とは別の CByB6F1 ハイブリッドマウスにも投与した。用量設定期の動物からは剖検時に組織を採取したが、病理組織学的検査は実施しなかった。

MTD 評価期では、350 mg/kg BID まで忍容性良好で、死亡した動物はなく、一般状態、体重及び体重増加量のいずれにも影響は認められなかった。

セルメチニブ硫酸塩を投与したすべての動物で、セルメチニブ及びその代謝物 N-脱メチル体への曝露が確認された。セルメチニブの全身曝露量は試験を実施した用量範囲で概ね用量に比例して増加し、雌で雄より高かった。反復投与による蓄積は認められなかった。N-脱メチル体の曝露

量は概ね用量比を下回って増加した。N-脱メチル体の曝露量は雄の方が雌より高く、代謝プロファイルに性差が認められた。

用量設定期では、セルメチニブ 150 mg/kg BID の反復経口投与は忍容性がなく、主試験のすべての雌雄が 4～5 日の反復投与後に死亡するか、切迫屠殺された（7 日目の曝露量評価に割り当てられた同用量のすべての TK 評価対象動物も 3～5 日目に死亡するか、屠殺された）。セルメチニブ投与と関連がある死亡関連の一般状態変化として、活動性低下、低体温を示す変化（冷触感）、浅呼吸／努力呼吸、脱水の疑い、被毛湿潤などが認められた。これら早期死亡した 150 mg/kg BID の動物には、体重増加量のわずかな減少又は平均体重の減少が認められた。75 mg/kg BID を投与した TK 評価対象の雄 1 例も、一度も採血が行われることなく 7 日目に屠殺した。この動物には、一般状態変化として、脱水の疑い、浅呼吸及び粘液便が認められた。これらの動物の死亡又は瀕死状態を説明する剖検所見は認められなかったが、死亡又は瀕死状態に至った多くの動物の消化管（胃、小腸及び／又は 大腸）に異常内容物（例えば、赤色／褐色内容物、暗色粘液、又は乳白色内容物）が認められた。

8 日目の予定剖検日まで生存した動物では、一般状態の所見、体重変化、剖検所見及び器官重量の変化は認められなかった。

以上のように、セルメチニブの 7 日間 1 日 2 回投与は、雄では 25 mg/kg BID（50 mg/kg/日）、雌では 75 mg/kg BID（150 mg/kg/日）まで忍容性があり、これらの用量では特記すべき一般状態の変化は認められず、体重への影響、肉眼所見、器官重量への影響も認められなかった。

2.6.6.5.2.2　CByB6F1 ハイブリッドマウスを用いた 1 カ月間経口投与用量設定毒性試験（試験 20062137）

概要表 2.6.7.10 項

本試験は、rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間のがん原性試験のための用量設定試験として実施した。本試験では、CByB6F1 ハイブリッドマウス（10 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を雄には 25、37.5 又は 50 mg/kg BID（50、75 又は 100　mg/kg/日）、雌には 50、75 又は 100 mg/kg BID（100、150 又は 200 mg/kg/日）で強制経口投与（容量 10 mL/kg/回）した。これとは別に、1 日目及び 28 日目にセルメチニブ及び代謝物 N-脱メチル体の曝露量を測定する TK 評価用の動物にも投与した。

セルメチニブを投与したすべての TK 評価対象動物で、セルメチニブ及び N-脱メチル体への曝露が確認された。セルメチニブの全身曝露量は試験を実施した用量範囲で概ね用量に比例して増加した。曝露量に蓄積は認められず、性差を示す一貫した所見も認められなかった。N-脱メチル体の全身曝露量は概ね用量比を下回って増加し、28 日目では 1 日目より低かった。また、N-脱メチル体の全身曝露量は概して雄の方が高かった。

セルメチニブ投与と関連する死亡が 7 日目又は 9 日目に 100 mg/kg BID の雌 3 例、並びに 6 日目及び 14 日目に TK 評価のために同用量を投与した雌 2 例で認められた。死亡前、一般状態の変化として、活動性低下、冷触感、脱水、半眼、横臥位、円背位及び／又は呼吸異常（浅呼吸／努力呼吸）が認められた。病理組織学的検査で消化管に変化（前胃のびらん／潰瘍及び／又は空腸腺窩の単細胞壊死）が認められ、これらは死亡した動物の病的状態に関与したが、死亡に至るほど重度ではなかった可能性が高いと考えられた。これらの動物では、胸腺に著明なリンパ萎縮、脾臓に散発的な髄外造血増加、腸間膜リンパ節に形質細胞増加も認められた。胸腺の所見はストレスに続発する変化、リンパ節の所見は消化管におけるセルメチニブ関連の変化に続発する変化と考えられた。

28 日目の予定剖検日まで生存した動物における一般状態の所見は、100 mg/kg BID の雌 3 例において、活動性低下、脱水、半眼及び／又は円背位が一過性に認められたのみであった。すべてのセルメチニブ投与群の雌で体重が対照群より低く（50、75 及び 100 mg/kg BID で、それぞれ−7.9%、−9.5%及び−10%）、関連して摂餌量減少も認められた。

セルメチニブ投与と関連する血液学的変化として、雄では、25 mg/kg BID 以上で好中球及び単球増加、37.5 mg/kg BID 以上で網状赤血球数増加、50 mg/kg BID で赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットの減少が認められた。雌では、50 mg/kg BID 以上で赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、リンパ球数及び好酸球数の減少並びに血小板増加が認められた。また、100 mg/kg BID の雌では赤血球分布幅の増加も認められた。セルメチニブ関連の血液生化学的変化は、雄では、37.5 mg/kg BID 以上で AST、リン及びカリウムの増加、50 mg/kg BID でアルブミン減少が認められた。雌では、50 mg/kg BID 以上で AST、ALT、リン及びカリウムの増加並びに総タンパク、アルブミン及び A/G 比の低下、100 mg/kg BID でグロブリン増加が認められた。これらの変化と関連する病理組織学的変化は認められなかった。

セルメチニブ投与と関連する病理組織学的変化として、びらん／潰瘍形成が前胃粘膜（37.5 mg/kg BID 以上の雄で軽微～軽度、50 mg/kg BID 以上の雌で軽微～中等度）並びに盲腸・結腸（37.5 mg/kg BID 以上の雄で認められたほか、50 及び 75 mg/kg BID の雌で軽微～中等度）で認められた。びらん／潰瘍形成が認められた部位では炎症及び過形成も認められた。これらの所見に用量反応は認められなかった。75 及び 100 mg/kg BID の雌では、発情後期への移行が認められ、関連して子宮重量減少（体重と比較した相対重量が対照との比較で、それぞれ−29%及び−34%）も認められた。セルメチニブ投与の雌で認められた体重の減少が発情後期への移行に寄与した可能性がある。

腸間膜・下顎リンパ節における形質細胞増加の発現率及び／又は重症度の増加並びに胸腺重量減少（絶対重量及び相対重量、対応する病理組織学的所見なし）がほとんどのセルメチニブ投与群で認められた。腸間膜・下顎リンパ節の所見は消化管で認められた所見に続発する変化と考えられた。胸腺重量減少と関連する病理組織学的所見は認められなかった。

本試験の無毒性量は、認められた病理組織学的変化に基づき、雄では 25 mg/kg BID（50 mg/kg/日）と考えられた。雌では最低用量の 50 mg/kg BID でも体重変化及び病理組織学的変化が認められたことから、無毒性量は確認できなかった。

2.6.6.5.2.3　CByB6F1 rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間がん原性試験（試験 20086561）

概要表 2.6.7.10 項

本試験では、3 群の CByB6F1/Tg rasH2 ヘミ接合体（rasH2 Tg）マウス（25 例/性/群）にセルメチニブ硫酸塩を 3、8 又は 25/15 mg/kg BID（6、16 又は 50/30 mg/kg/日、投与容量 10 mL/kg/回）で 1 日 2 回、12 時間間隔で強制経口投与した。別途設けた対照群には水又は媒体を投与した。陽性対照群（15 例/性）に NMU 7.5 mg/mL を 1 日目にのみ腹腔内投与した。また、1 日目及び 26 週目の TK 評価のため、各セルメチニブ投与群に 18 例/性（非トランスジェニック同腹児）、各対照群に 12 例/性（非トランスジェニック同腹児）を割り当てた。25 mg/kg BID を投与した動物に 16 週目から死亡、一般状態変化及び体重減少が認められたことから、この用量は 19 週目（130 日目）から 15 mg/kg BID（30 mg/kg/日）に減量した。

セルメチニブを投与したすべての動物でセルメチニブ及び N-脱メチル体への曝露が確認された。1 日目の曝露量は投与した用量範囲で雌雄とも用量に比例して増加し、26 週目では雄で用量比をわずかに上回って増加し、雌では用量に比例して増加した。3 及び 8 mg/kg BID 群では、26

週目の曝露量は雄では概ね 1 日目より低かったが、雌では同程度であった。セルメチニブの曝露量は雌で雄より高い傾向があった。N-脱メチル体の曝露量は 1 日目には用量に比例して増加したが、26 週目には用量比をわずかに下回って増加する傾向が認められた。

25 mg/kg BID の雄 3 例及び 8 mg/kg BID の雌 1 例は、活動性低下、円背位、振戦、冷触感等の一般状態変化が認められたことから、89 日目又は 90 日目に早期屠殺した。TK 評価のために 25 mg/kg BID を投与した動物のうち、69、82 及び 110 日目にそれぞれ雄 1 例ずつ（計雄 3 例）並びに 114 日目に雌 1 例が死亡した。25 mg/kg BID TK 群の雄 1 例及び雌 2 例は、一般状態変化及び体重減少のため、114 日目（17 週目）に 1 日休薬した。また、25 mg/kg BID TK 群の残りの動物も、16 週目に明らかな体重減少が認められたことから 116 日目から休薬させた。そのため、高用量群は残りの期間、15 mg/kg BID に減量され、この減量後の用量では試験終了まで忍容性が認められた。8 mg/kg BID（16 mg/kg/日）の TK 群でも、25/15 mg/kg BID 群と同様の一般状態変化のため、雄 4 例が死亡した（それぞれ 70、78、140 及び 145 日目）。これら早期死亡した動物の死因は明らかにできなかった。

NMU を投与した陽性対照群を除き、主試験での死亡率は概して低かった（陰性対照群で 1/100 例［1.0%］、セルメチニブ投与群で 4/150 例［2.7%］）。主試験の雌雄間で生存率に統計的有意差は認められなかった。8 mg/kg BID 以上の TK 評価群で死亡率が高かった原因は不明である。

生存動物では、セルメチニブ投与と関連する一般状態の変化は認められなかった。セルメチニブ投与と関連する体重変化は、主試験の 25/15 mg/kg BID で平均体重増加量のわずかな減少が認められたのみであった。TK 評価用の 25/15 mg/kg BID では、対照群と比べた平均体重増加量の減少が 85 日目（13 週目）から認められ、106 日目から 113 日目までの期間にも明らかな平均体重増加量減少が認められた。114 日目又は 116 日目から 130 日目まで休薬させると、その後、（113～120 日目から 134 日目まで）平均体重増加量が明らかに増加し、130 日目の投与再開前に少なくとも部分的な回復が認められた。

セルメチニブ投与と関連する剖検所見及び腫瘍性の病理組織学的所見は、いずれの用量でも認められなかった。セルメチニブ投与と関連する非腫瘍性の病理組織学的所見が以下の器官で認められた：盲腸（8 mg/kg BID 以上で腺窩の過形成）、結腸（3 mg/kg BID 以上の雄及び 25/15 mg/kg BID の雌で腺窩の過形成、25/15 mg/kg BID で憩室）及び脾臓（3 mg/kg BID 以上の雌で色素沈着したマクロファージ増加）。結腸の憩室は、繊維状の好塩基球性物質で充填された拡張した腺窩の存在を特徴としていた。これらは扁平な細胞で覆われ、好塩基球性の繊維状物質で満たされ、リンパ球と形質細胞で囲まれた、薄壁構造に進行するようであった。これらは結腸壁全体から漿膜・腸間膜までみられ、常に腺窩の過形成と関連していた。

NMU を投与した陽性対照群ではこのモデルで予想された通り（Nambiar et al 2012、Long et al 2010）、主に悪性リンパ腫の発現により、雌雄ともに死亡率が高かった（雄：13/15 例［87%］、雌：12/15 例［80%］）。陽性対照群の病理組織学的検査では、予想されたとおりの腫瘍性所見（リンパ腫、乳頭腫及び扁平上皮癌の発現率増加）及び非腫瘍性所見（NMU 関連の網膜萎縮）が認められた。

以上のように、セルメチニブは rasH2 Tg マウスにおいてがん原性を示さなかった。

2.6.6.6　生殖発生毒性試験

雌の受胎能及び胚・胎児発生を評価するマウス生殖発生毒性試験を、セルメチニブ硫酸塩を用いて実施した。これらの試験では 30% w/v Captisol 水溶液（スルホブチルエーテル β-シクロデキストリン）を使用した。雄の受胎能はマウス 26 週間経口投与毒性試験（2.6.6.3.3.3 項参照）で評

価した。出生前及び出生後の発生に関する試験は Phosal ベースの媒体（10%エタノール、30% PEG 400、60% Phosal 50 PG（50%（w/w）ホスファチジルコリン、3%（w/w）ベニバナ種子油及び 40%（w/w）プロピレングリコール））を用いて実施した。

2.6.6.6.1　雄受胎能試験

雄受胎能はマウスを用いた 26 週間反復経口投与試験（試験 VKS/0211、2.6.6.3.3.3 項参照）で評価した。

セルメチニブ硫酸塩を 0、1、5 又は 20 mg/kg BID で 10 週間、1 日 2 回投与した雄マウスを未投与の雌と同居させ、雄の交尾行動及び受胎能を評価した。

セルメチニブ投与は雄の交尾行動及び受胎能に影響を及ぼさなかった。すべての雌が交配期間の最初の週に交配し、その大部分で妊娠 14 日目まで生存胚数又は胚損失に対する影響は認められず、妊娠が維持された。受胎率に投与の影響はなかった。セルメチニブを 5 mg/kg BID まで投与しても、精子の運動性及び精子数に影響は認められなかった。20 mg/kg BID の雄は早期に屠殺したため、これらの雄での精子の評価は行わなかった。

雄の交尾行動及び受胎能への影響に関する無影響量は、20 mg/kg BID（40 mg/kg/日）であった。

2.6.6.6.2　雌マウスにおける受胎能・初期胚発生及び回復性評価試験（試験 0496GM）

概要表 2.6.7.12 項

本試験では、セルメチニブ硫酸塩が雌マウスの受胎能及び生殖発生（性腺機能、交尾行動、妊娠率、着床、初期胚の生存・発生など）に及ぼす影響を評価した。雌 CD-1 マウス（22 例/群）に 0（媒体）、2.5、12.5 又は 37.5 mg/kg BID（0、5、25 又は 75 mg/kg/日、投与容量 2 mL/kg）で交配前 14 日間、交配中及び交配後の妊娠 6 日目まで 1 日 2 回、約 12 時間間隔で経口投与した。生殖能に対する毒性の回復性を評価するため、対照群と高用量群では別の雌（12 例/群）にも投与した。これらのマウスには、それぞれ 0（媒体）及び 37.5 mg/kg BID を 21 日間、1 日 2 回、約 12 時間間隔で経口投与し、21 日間の休薬後に交配させた。交尾行動が認められた日を妊娠 0 日目と定義した。妊娠 12 日目又は 14 日目に母動物を剖検し、卵巣と子宮を含めた胸腔・腹腔の内容物を検査した。

雌マウスに 12.5 又は 37.5 mg/kg BID を交配前から交尾後 6 日まで 14 日間 1 日 2 回投与したところ、軽微な母体への毒性（斑状の脱毛、一過性の体重変化）が認められた。また 37.5 mg/kg BID まで投与しても、交尾までの期間、交尾行動及び受胎率には影響は認められなかった。交尾した雌マウスの受胎率は、主試験と回復評価のいずれの 37.5 mg/kg BID 群でも 100%であった。12.5 mg/kg BID 以上では、生存胚数の統計的有意な軽度減少が認められたが、用量依存的ではなかった。主試験のセルメチニブ投与群で、着床後死亡胚数に対照群との統計的有意差は認められなかった。21 日間の休薬期間後には、着床後死亡胚数及び胚生存率への影響は認められなかった。

母体毒性と生殖能への影響のいずれについても、無毒性量は 2.5 mg/kg BID（5 mg/kg/日）と判断された。

2.6.6.6.3　胚・胎児発生に関する試験

2.6.6.6.3.1　マウスを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（試験 0430RM）

概要表 2.6.7.11 項

本試験の目的は、胚の器官形成期にセルメチニブを経口投与し、マウスを用いた胚・胎児発生試験の本試験で用いる用量を決定することであった。交配させた CD-1 マウス（10 例/群）にセルメチニブ硫酸塩を 0（媒体）、2.5、12.5、37.5 又は 75 mg/kg BID（5、25、75 又は 150 mg/kg/日、容量 2 mL/kg/回）で妊娠 6 日から 16 日まで投与した。交尾行動が認められた日を妊娠 0 日と定義した。妊娠 18 日目に母動物の剖検を行い、卵巣、子宮内容物を検査し、胎児の外表異常を評価した。これとは別に、TK 評価のため、交配した雌マウス（6 例/群）に妊娠 6 日目から 16 日目まで主試験と同じ用量で投与し、妊娠 6 日目及び 16 日目に採血した。

セルメチニブを投与した全例でセルメチニブへの全身曝露が確認された。曝露量は試験を実施した用量範囲で概ね用量に比例して増加した。N-脱メチル体の C_{max} 及び AUC は、いずれの用量でもセルメチニブの約 1～5%であった。

75 mg/kg BID まで忍容性良好で、この用量まで母体毒性は認められなかった。37.5 mg/kg BID では、投与期間中から投与後の期間まで、体重増加量の小さな減少がときおり認められた。妊娠子宮重量の減少も認められた。血漿中総カルシウム、無機リン酸塩、総タンパク、アルブミン及び／又は尿素の増加が 12.5 mg/kg BID 以上で認められた。

75 mg/kg BID の投与は胚致死をもたらし、9 例の妊娠した母動物から得られた生存胎児は 1 例のみであった。胚の致死は、概して早期胚死亡の増加として認められた。しかし、12.5 及び 37.5 mg/kg BID では後期子宮内胚死亡の増加を伴う着床後死亡胚の増加が認められ、用量増加により胚のセルメチニブ感受性が増加するようであった。12.5 及び 37.5 mg/kg BID では平均胎児体重の減少が認められ、37.5 mg/kg BID では平均同腹児体重の減少も認められた。12.5 mg/kg BID 以上では胎児に開眼が認められ、37.5 及び 75 mg/kg BID ではすべての胎児で開眼が認められた。これらの所見は明らかな母体毒性がみられない用量でも認められ、セルメチニブの作用機序に起因する可能性が考えられた。12.5 mg/kg BID の胎児 2 例に、腹壁の不完全閉鎖と関連する奇形（腹壁破裂及び臍帯ヘルニア）が認められた。さらに、5 例の胎児（12.5 mg/kg BID 群 1 例、37.5 mg/kg BID 群 4 例）に口蓋裂が認められた。

マウスにおいて胚の器官形成期にセルメチニブを 1 日 2 回経口投与したとき、胚又は胎児の生存及び発生に関する無影響量は、2.5 mg/kg BID（5 mg/kg/日）であった。

2.6.6.6.3.2　マウスを用いた胚・胎児発生に関する試験（試験 0480TM）

概要表 2.6.7.13 項

本試験では、交配した雌 CD-1 マウス（22 例/群）の器官形成期を含む妊娠 6 日目から 16 日目まで、0、2.5 又は 37.5 mg/kg BID（0、5 又は 75 mg/kg/日、投与容量 2 mL/kg/回）を 1 日 2 回、12 時間間隔で投与した。交尾行動が確認された日を妊娠 0 日目と定義した。妊娠 18 日目に母動物を剖検し、胸腔内器官、腹腔内器官、卵巣及び子宮内容物を検査した。また胎児の体重測定、性別確認並びに外表、内臓及び骨格異常を検査した。

37.5 mg/kg BID までの投与の忍容性は良好であった。37.5 mg/kg BID では母動物の体重増加量及び摂餌量が妊娠 11/12 日目から 18 日目まで減少し、この用量では妊娠子宮重量も減少した。37.5 mg/kg BID では、着床後死亡胚（主に早期子宮内死亡であるが、後期子宮内死亡もあり）の

増加を伴う生存胎児数の減少が認められた。この用量では胎児体重と同腹児体重も減少した。37.5 mg/kg BID の全生存胎児で開眼が認められた。本試験では、投与初日の 1 回目投与時に 2.5 mg/kg BID の雌 9 例に誤って 37.5 mg/kg が投与され、これら 9 例中 3 例の同腹内にも開眼を有する胎児が認められた。胎児に開眼が認められたこれら 3 例の母動物はいずれも妊娠 16 日目に誤って高用量が投与されたが、この投与時期はマウスの閉瞼期（交尾後 15.5 日～16.5 日）に相当する。正しい用量が投与された 12 例、及び誤った用量が投与された時点が閉瞼期外であった 5 例の胎児には、開眼（開瞼）は認められなかった。37.5 mg/kg BID では口蓋裂も認められた。口蓋裂は 2.5 mg/kg BID でも認められたが、対照群と同程度の発現率であった。37.5 mg/kg BID では軽微な奇形として、水晶体硬度の変化及び網膜の軽度褶曲も認められた。

胎児の骨格に、セルメチニブ投与と関連する重篤な異常は認められなかった。2.5 及び／又は 37.5 mg/kg BID で骨格の軽度な異常及び／又は変異（頭蓋骨、頸椎、指、胸骨分節）の発現率増加が認められたが、これらの所見のほとんどは高用量群でのみ認められた。これらの所見は一過性で、胎児骨格の正常な発達に有害な影響を与えるものではないと考えられた。

2.5 mg/kg BID では、誤って 37.5 mg/kg BID が投与された母動物の一部の胎児に開眼が認められた。これは発生上の影響を受けやすい時期の投薬過誤が直接の原因と考えられるため、母体毒性及び胎児の異常・変異に関する無毒性量は 2.5 mg/kg BID（5 mg/kg/日）と考えられた。

2.6.6.6.4　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

2.6.6.6.4.1　マウスにおける出生前及び出生後の発生に関する用量設定試験（試験 20082138）

概要表 2.6.7.11 項

この GLP 非適用試験では、交配させた CD-1 マウス（F0、8 例/群）を 8 つの群に割り付けた。セルメチニブ硫酸塩を 0（媒体）、5、25、40 又は 75 mg/kg BID（0、10、50、80 又は 150 mg/kg/日、投与容量 10 mL/kg/回）で、妊娠 6 日目から授乳 15 日目まで 1 日 2 回、12 時間間隔で投与した。また、妊娠 16 日目から授乳 15 日目まで 75 mg/kg BID（150 mg/kg/日、10 mL/kg/回）を投与する別の群も評価した。さらに、これらの用量・投与法で同腹仔への影響を検討後、別の低用量を追加で評価することとし、12.5 mg/kg BID（25 mg/kg/日）又は同時対照として媒体を、妊娠 6 日から授乳 15 日まで 1 日 2 回、12 時間間隔で投与した（投与容量 5 mL/kg/回）。生存した F0 母動物及びその同腹仔は授乳 15 日目に屠殺した。授乳 14 日目に各母動物から母乳試料を採取し、授乳 15 日目に各母動物とその同腹仔から血液試料を採取した。

セルメチニブを投与したすべての母動物及びその出生児で、セルメチニブ及び／又はその代謝物である N-脱メチル体への曝露が確認された。セルメチニブを投与した動物の母乳試料中にセルメチニブ及び N-脱メチル体が検出され、12.5 mg/kg BID の授乳中の母動物で平均血漿／母乳比は 0.74 であった。対照群の母動物 2 例と対照群の出生児 3 例でセルメチニブ及び／又は N-脱メチル体がそれぞれの定量下限を僅かに上回る濃度で検出された。N-脱メチル体は対照群の母動物 1 例の母乳試料中にも検出されたが、セルメチニブを最低用量で投与した群の母乳試料中濃度と比べ、100 分の 1 未満の濃度であった。これらの濃度から、対照群の母動物にセルメチニブは直接投与されておらず、試験結果への影響もないと結論付けられた。

授乳 14 日目又は 15 日目に対照群の雌 2 例が死亡した。死因は明らかではなかったが、これらの雌の死亡は血液試料又は母乳試料の採取中にみられた。75 mg/kg BID の雌 1 例をセルメチニブ投与と関連する子宮内死亡が原因と考えられる二次的な毒性変化（立毛、冷触感、円背位、全身性振戦、子宮脱）のため、妊娠 22 日に早期屠殺した。

妊娠中にセルメチニブ投与と関連する一般状態変化は 40 及び 75 mg/kg BID（妊娠 6 日から投与開始）にのみ認められた。認められた所見は立毛、円背位、振戦などであった。40 mg/kg BID では、これらの所見は 1 例又は 2 例にのみ、妊娠 21～23 日目に 1 回以上認められた。75 mg/kg BID では 5 又は 6 例に、妊娠 18～23 日目に 1 回以上認められた。これらの所見が認められた母動物は、いずれも出産しなかった。5 mg/kg BID 以上の母動物では、妊娠期間中及び／又は授乳期間中、平均体重増加量減少及び／又は平均体重減少が認められた。

出産した母動物は 40 mg/kg BID では 4 例のみで、妊娠 6 日目から投与を開始した 75 mg/kg BID では 0 例であった。妊娠 16 日目から投与を開始した 75 mg/kg BID の母動物 8 例はすべて出産した。妊娠 6 日目から投与を開始した 25 及び 40 mg/kg BID 並びに妊娠 16 日から投与開始した 75 mg/kg BID では、平均出産率が対照群と比べて低かった（それぞれ、85.7%、57.1%、87.5%、対照群は 100%）。妊娠 16 日目から投与開始した 75 mg/kg BID の母動物では、8 例中 5 例で死産が認められ、1 例では全同腹児が死産であった。出産した母動物のうち、妊娠 6 日目から投与開始した 25 及び 40 mg/kg BID のそれぞれ 2 例及び 4 例、並びに妊娠 16 日目から投与開始した 75 mg/kg BID の 7 例では、授乳 1～4 日目にすべての出生児が死亡した。

25 mg/kg BID 以上では、授乳 1～4 日目に出生児の生存率低下が認められた。12.5、25 及び 40 mg/kg BID では出生児体重減少が認められた。分娩後の期間に F1 世代の出生児に認められたセルメチニブ投与と関連する一般状態変化は概ねこの生存率低下と関連し、12.5 mg/kg BID 以上で、冷触感、胃におけるミルクバンド欠如、無営巣行動及び／又は無授乳が認められた。また、12.5 及び 25 mg/kg BID で片眼又は両眼に水晶体混濁、12.5 mg/kg BID 以上で開眼、25 mg/kg BID で口蓋裂、75 mg/kg BID で後肢内転が認められた。2.5 mg/kg BID では、出生児の生存率、体重及び一般状態に、セルメチニブ投与と関連する影響は認められなかった。

本試験の結果に基づき、マウスの出生前及び出生後の発生に関する本試験で用いるセルメチニブの用量として、0.5、2 及び 7.5 mg/kg BID（1、4 及び 15 mg/kg/日）を選択した。

2.6.6.6.4.2　マウスを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験（試験 20082140）

概要表 2.6.7.14 項

本試験では、交配した雌 CD1 マウス（F0）（25 例/群）にセルメチニブ硫酸塩を妊娠 6 日目から授乳 20 日目（出産したマウスの場合）又は妊娠 22 日目（出産しなかったマウスの場合）まで、0（媒体）、0.5、2 又は 7.5 mg/kg BID（0、1、4 又は 15 mg/kg/日、投与容量 5 mL/kg/回）で、1 日 2 回、12 時間間隔で投与した。生後 4 日目に F1 同腹児の数を 1 腹当たり 8 例に減らした。生後 21 日目に F1 出生児を離乳させ、F0 世代の雌は安楽死させた。生後 90 日目又はそれ以降に、各用量群内の非同腹の雄 1 例と雌 1 例を交配させた。生存した F1 世代の雄は交配期間（生後 113 日～123 日目）後に安楽死させ、F1 世代の雌は妊娠 13 日目に安楽死させた。各用量群につき母動物 5 例及びその同腹児を対象に、授乳 4 日目に曝露量評価用の採血を実施した。

セルメチニブを投与したすべての母動物の血漿で、セルメチニブと代謝物 N-脱メチル体は定量可能であった。また、セルメチニブを 2 mg/kg BID 以上で投与した母動物から得られたすべての出生児でも、2 mg/kg BID を投与した母動物から出生した 2 例を除き、セルメチニブと代謝物 N-脱メチル体が検出された（2 例におけるセルメチニブ濃度は定量限界未満であった）。0.5 mg/kg BID の母動物から得られた出生児では、その約半数の血漿中で N-脱メチル体が検出された。

0.5 mg/kg BID の F0 世代の雌 1 例を一般状態変化（円背位、体重減少）のため、授乳 9 日目に安楽死させた。死因は明らかでなかったが、低用量で認められたことから、セルメチニブ投与と

の関連はないと判断された。また、2 mg/kg BID の F0 世代の雌 1 例を、強制経口投与時の過誤のため、授乳 12 日に安楽死させた。

7.5 mg/kg BID の新生児では離乳前、生後 7 日から体重減少（対照群の最高 92%）が認められた。これらの F1 世代の動物では離乳後も体重は低値であったが、体重増加量に影響はなかった。剖検時に、精巣上体の絶対重量減少並びに精巣の絶対及び相対重量の減少が 7.5 mg/kg BID で認められたが、これらは体重減少による二次的変化と考えられた。

F1 世代の出生児でセルメチニブ投与と関連する奇形増加が認められた。すべての用量で時期尚早の開眼が認められ（0.5、2 及び 7.5 mg/kg BID のそれぞれ 1、2 及び 6 腹から、それぞれ 2、4 及び 13 例）、2 及び 7.5 mg/kg BID で低頻度ではあるが口蓋裂が認められた（各群 1 腹からそれぞれ 1 例あるいは 2 例）。同様の所見（開眼）は反射・身体発達の評価初日（生後 13 日目）にも認められた。7.5 mg/kg BID では、生後 21 日目に瞳孔収斂基準を満たした出生児数の減少が認められた。

以上のように、本試験で母動物の生殖機能への影響は認められず、生殖機能に関する無毒性量は 7.5 mg/kg BID（15 mg/kg/日）と考えられた。一方、最低用量である 0.5 mg/kg BID（1 mg/kg/日）でも低頻度ではあるが開眼が認められたことから、発生に関する無毒性量は確定できなかった。

2.6.6.6.5 幼若動物での毒性試験

セルメチニブの幼若毒性試験は実施しなかった。実施済みの毒性試験から得られた所見（すなわち、消化管、骨及び皮膚の所見、並びに血漿カルシウム-リンの変化等）は小児患者への投与時の安全性に関して意義を持つと考えられるが、これらの変化は小児患者でのモニタリング、及び管理は可能である。[redacted]は、20[redacted] 年 [redacted] 月に EMA の [redacted]、20[redacted] 年 [redacted] 月に EMA、20[redacted] 年 [redacted] 月に FDA、20[redacted] 年 [redacted] 月に PMDA により了承されている。

2.6.6.7 局所刺激性試験

セルメチニブの臨床における投与経路は経口投与であるため、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 抗原性試験

反復投与毒性試験及び臨床試験において、セルメチニブが免疫学的作用を及ぼすことを示唆する所見は得られなかったため、抗原性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.2 免疫毒性試験

反復投与毒性試験及び臨床試験からセルメチニブが免疫学的作用を及ぼすことを示唆する所見は得られなかったため、免疫毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.3 毒性発現の機序に関する試験

非臨床試験から得られた主要な所見はセルメチニブの薬理作用に関連すると考えられたため、作用機序試験は実施しなかった。

2.6.6.8.4　依存性試験

安全性薬理試験、反復投与毒性試験、及び臨床試験のいずれでも、中枢・末梢神経系への有害作用を示す明確な所見は得られなかったため、セルメチニブを用いた依存性試験は実施しなかった。

2.6.6.8.5　代謝物に関する試験

セルメチニブの N-脱メチル化代謝物である N-脱メチル体（AZ12442942）の遺伝毒性について、細菌を用いた復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ細胞を用いた *tk* 遺伝子突然変異試験により *in vitro* で検討した。

2.6.6.8.5.1　細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 0750BV）

概要表 2.6.7.17.1 項

N-脱メチル体は 5000 µg/プレートまでの濃度で、ラット肝臓由来の代謝活性化系の有無（±ラット S9）に拘わらず、ネズミチフス菌株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）並びに大腸菌株（WP2 *uvrA*）に対し、突然変異を誘発しなかった。

2.6.6.8.5.2　マウスリンフォーマ試験（試験 0751MV）

概要表 2.6.7.17.1 項

L5178Y マウスリンフォーマ細胞を用いた *tk* 遺伝子アッセイにおいて、N-脱メチル体は、代謝活性化系の有無（±ラット S9）に拘わらず、毒性及び／又は培養液中の溶解度によって決定した最高濃度まで（実施最高濃度：167 µg/mL）、突然変異を誘発しなかった。

2.6.6.8.6　不純物に関する試験

2.6.6.8.6.1　不純物E*：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 YV7434）

概要表 2.6.7.17.2 項

不純物E*は工程中間体であり、セルメチニブ硫酸塩製剤の加水分解産物でもある。セルメチニブ側鎖硫酸塩の突然変異誘発を 100～5000 µg の濃度範囲でネズミチフス菌株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）及び大腸菌株（WP2 (pKM101)及び WP2 *uvrA*）を用いた復帰突然変異試験により、代謝活性化系（ラット S9）の存在下及び非存在下で検討した。セルメチニブ側鎖硫酸塩は、ネズミチフス菌 TA1535 株を用いた S9 存在下の試験で陽性結果（復帰変異体コロニー数の増加）を示した。

2.6.6.8.6.2　不純物E*：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 8316541）

概要表 2.6.7.17.2 項

不純物E*）はネズミチフス菌株 TA1535 を用いた復帰突然変異試験で陽性を示した。この機序について検討するため、3 種のヒスチジン要求性ネズミチフス菌株（TA1535、TA1535NR 及び YG7127）を用い、ラット S9 の存在下及び非存在下でセルメチニブ側鎖の突然変異誘発性について評価した。YG7127 株は TA1535 株からニトロ還元酵素遺伝子が欠損した株である（Yamada et al 1997）。

YG7127 株を用いた試験では、　不純物E*　は代謝活性化系の有無（±ラット S9）に拘わらず、限界濃度である 5000 μg/プレートまで突然変異誘発性を示さなかった。YG7127 株で結果が陰性であったことから、TA1535 株で得られた陽性結果は細菌特異的なニトロ還元酵素に起因する可能性が考えられた。したがって、TA1535 株における復帰変異体数増加は哺乳類細胞では意義がない可能性が示された。

一方、　不純物E*　は TA1535 株を用いた試験（濃度 1600 μg/プレート、S9 非存在下）及び TA1535NR 株を用いた試験（濃度 1600 及び 5000 μg/プレート、S9 非存在下、又は濃度 1600 μg/プレート、S9 存在下）で突然変異を誘発した（媒体対照の 3 倍以上）。これらの復帰変異体増加は、毒性を示す濃度まで濃度依存性があることを示しており、　不純物E*　が当該株に対して変異原性を有し、その機序にニトロ還元酵素が関与していることを示唆している。

2.6.6.8.6.3　不純物E*　：マウスリンフォーマ細胞を用いた *in vitro* 小核試験（試験 8314208）

概要表 2.6.7.17.2 項

L5178Y マウスリンフォーマ細胞を用いた *in vitro* 小核試験（GLP 非適用）による検討で、　不純物E*　は 155 μg/mL までの濃度で、代謝活性化系の有無（±ラット S9）に拘わらず、小核誘発性を示さなかった。

2.6.6.8.6.4　不純物E*　：マウスリンフォーマ試験（試験 8316542）

概要表 2.6.7.17.2 項

L5178Y マウスリフォーマ細胞を用いた *tk* 遺伝子アッセイで　不純物E*　の変異原性を評価した。代謝活性化系（ラット S9）の非存在下で 24 時間処理により、　不純物E*　は *tk* 遺伝子座に変異を誘発したが、変異が認められたのは 2 mM を超える細胞毒性の発現する濃度においてのみであった。そのため、この試験結果の生物学的意義は疑わしいと考えられた。同じ試験系を用いて 375 μg/mL（2.43 mM）に相当する最高濃度で 3 時間処理したときは、S9 存在下及び非存在下のいずれにおいても、　不純物E*　は L5178Y 細胞の *tk* 遺伝子座に変異を誘発しなかった。

2.6.6.8.6.5　不純物F*　：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 YV7433）

概要表 2.6.7.17.2 項

不純物F*　は、セルメチニブ硫酸塩の製造工程で使用する出発物質である。
不純物F*　の突然変異誘発性を 100～5000 μg/プレートの用量範囲でネズミチフス菌株（TA1535、TA1537、TA98 及び TA100）及び大腸菌株（WP2 (pKM101)及び WP2 *uvrA* (pKM101)）を用いた復帰突然変異試験により、代謝活性化系（ラット S9）の存在下及び非存在下で検討した。

プレインキュベーション法を用いて S9 存在下で実施した 2 回の独立した試験において、被験物質はネズミチフス菌 TA98 株の復帰変異体コロニー数をいずれも有意に再現性をもって増加させた。

不純物F*　、本試験の条件下でネズミチフス菌 TA98 株を用いて S9 存在下で検討したとき、陽性であった。

2.6.6.8.6.6　不純物I*　：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 YV7145）

概要表 2.6.7.17.2 項

不純物I*　は　不純物F*　中に潜在的に存在する不純物である。　不純物I*　がネズミチフス菌（TA100 及び TA98 株）に遺伝子変異を誘発する可能性を S9 の存在下及び非存在下で GLP 非適用試験により検討した。　不純物I*　は S9 存在下、非存在下のいずれでも、100～5000 μg/プレートの用量範囲で突然変異を誘発しなかった。

2.6.6.8.6.7　不純物G*　：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 8466469

概要表 2.6.7.17.2 項

不純物G*　は、出発物質である　不純物G*　を製造する際の前駆体である。　不純物G*　の突然変異誘発性を、ヒスチジン要求性のネズミチフス菌 4 菌株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）並びにトリプトファン要求性の大腸菌株（WP2 *uvrA*/pKM101）で検討した。試験濃度は最高 5000 μg/plate とし、ラット肝 S9 の代謝活性化系存在下及び非存在下で実施した。本試験の条件下で　不純物G*　は突然変異誘発性を示さなかった。

2.6.6.8.6.8　不純物H*　：細菌を用いた復帰突然変異試験（試験 AME01418）

概要表 2.6.7.17.2 項

不純物H*　は、セルメチニブ硫酸塩中の理論的なニトロソアミン不純物である。　不純物H*　の突然変異誘発性を、ネズミチフス菌 LT2 株（TA98、TA100、TA1535 及び TA1537）並びに大腸菌株（WP2 *uvrA*/pKM101）で検討した。試験濃度は最高 5000 μg/plate とし、Aroclor 1254 誘導のラット肝 S9 あるいは Aroclor 1254 誘導のハムスターの肝 S9 代謝活性化系存在下、又は非存在下でプレインキュベーション法を用いて実施した。本試験の条件下で　不純物H*　は突然変異誘発性を示さなかった。

2.6.6.8.6.9　不純物A*　、　不純物B*　、　不純物C*　及び　不純物D*　の安全性

セルメチニブ硫酸塩原薬中に含まれるこれら 4 つの不純物の変異原性の評価は、ICH M7(R1)ガイドラインに従い、商用データベースである DEREK（6.0.1）及び Leadscope modeller（3.5.2）を使用して SAR 評価を行った。すべての SAR 予測は、専門家により評価された。これらの不純物の SAR 評価結果と ICH M7 ガイドラインでの分類の要約を表 2 に示す。

表 2　　セルメチニブ硫酸塩中の不純物の SAR 評価の要約

Identity	Structure	SAR result DEREK	SAR Result LEADS COPE	Ames status	Impurity classification	Comments
不純物E*	[redacted]	Negative	Positive	Negative	5	Material has tested negative in both the bacterial Ames and MLA (mouse lymphoma assay) tests.
不純物A*		Negative	Negative	Not tested	5	Considered to be non-mutagenic based on structural similarity to parent
不純物B*		Negative	Positive	Not tested	4	Considered to be non-mutagenic based on structural similarity to parent
不純物C*		Negative	Positive	Not tested	4	Considered to be nonmutagenic based on structural similarity to parent
不純物D*		Negative	Positive	Not tested	4	Considered to be nonmutagenic based on structural similarity to parent

さらに、　不純物A*　、　不純物B*　、　不純物C*　及び　不純物D*　は、セルメチニブ硫酸塩を使用して実施された GLP 毒性試験（マウス 1 カ月間反復投与毒性試験(試験 0355AM、バッチ [redacted] を使用)、カニクイザル 26 週間反復経口投与毒性試験(試験 VKS/0210、バッチ [redacted] を使用)）において、ICH Q3A(R2)ガイドラインに従い安全性が評価されている。これらの試験で使用されたバッチ中の不純物含量を表 3 に示した。

原薬中のこれらの不純物の規格に関する詳細な根拠は、3.2.S.4.5 に記載されている。毒性試験における各不純物の投与量、及び原薬における規格の詳細を表 4 に示した。

表 3　　毒性試験で使用されたバッチ中の不純物含量情報

Impurity	Batch [redacted] (% impurity)	Batch [redacted] (% impurity)
不純物B*	0.21	0.52
不純物A*	0.25	0.31
不純物D*	0.03	0.33
不純物C*	0.06	0.03

表 4　　不純物の毒性試験における投与量及び規格情報

Impurity	% Impurity (batch)	Dose level used to qualify impurity LOAEL (mg/kg/day)	Level of impurity qualified (mg/kg/day)	Maximum supported specification at maximum clinical dose of 100 mg* (%)	Clinical Specification (%)
不純物B*	0.21% ([redacted])	22	0.0462	2.31	NMT [redacted]% w/w
不純物A*	0.25% ([redacted])	22	0.055	2.75	NMT [redacted]% w/w
不純物C*	0.06% ([redacted])	22	0.0132	0.66	NMT [redacted]% w/w
不純物D*	0.33% ([redacted])	8	0.0264	1.32	NMT [redacted]% w/w

*　Using a human body weight of 50 kg
NMT　Not more than
LOAEL　Lowest observable adverse effect level

不純物の規格設定における毒性評価に無毒性量ではなく最小毒性用量を使用することは、カニクイザル 26 週間試験の 8 mg/kg/日（最小毒性用量）及びマウス 1 カ月試験の 22 mg/kg/日（最小毒性用量）で認められた毒性変化が、セルメチニブの薬理作用に起因し不純物には関連しないと考えられる軟便／液状便、消化管の炎症性変化）のような消化器系所見、並びに軟組織の鉱質化のみであったことから、妥当であると考える。

不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C* 及び 不純物D* の *in vitro* あるいは *in vivo* における遺伝毒性試験は実施していない。ICH M7 ガイドラインの注 1 及び Q&A（step 3）は、長期投与において不純物の 1 日摂取量が 1 mg を超える場合には、ICH Q3A/Q3B ガイドラインで提案されている遺伝毒性の評価を推奨している。不純物の 1 日量が 1 mg 未満の場合には、更なる遺伝毒性試験実施の必要はないとされている。したがって安全性の観点から、ICH M7 ガイドラインでは、1 日摂取量が 1 mg 未満の不純物については、生涯投与によるリスクは無視できると考えられている。

申請規格において患者が曝露される 4 つの不純物 不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C* 及び 不純物D* の最大摂取量は、それぞれ 1 mg/日未満である（表 5）。したがって、ICH M7 ガイドラインの推奨事項に沿ってこれら摂取量 1 mg/日未満の不純物は SAR により評価し、染色体異常試験を含む遺伝毒性試験は実施していない。

表 5 患者における各不純物の 1 日最大摂取量

Impurity	Commercial Specification (%)	Maximum amount of impurity a patient could be exposed to (mg)*
不純物B*	NMT [redacted]% w/w	0.6
不純物D*	NMT [redacted]% w/w	0.7
不純物A*	NMT [redacted]% w/w	0.6
不純物C*	NMT [redacted]% w/w	0.2

* Based on a maximum 100 mg dose of selumetinib
Note that the maximum impurity exposure is shown for the highest clinical dose. As dosing of paediatric patients with selumetinib is on a mg/m^2 basis, smaller patients will receive a lower selumetinib dose and, therefore, will be exposed to a lower amount of impurities.

以上より、 不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C* 及び 不純物D* の一般毒性及び遺伝毒性は適切に評価されており、これらの不純物の規格値は適切に設定されていると考える。

2.6.6.8.7 光毒性

セルメチニブは光毒性を示す可能性のある紫外線領域（290～700 nm）の光を吸収した。モル吸光係数（MEC）は波長 290 nm で 11786 L mol^{-1}cm^{-1} であり、これは ICH S10 ガイドラインで定義されている光反応性の閾値を超えていた。

2.6.6.8.7.1 Balb/c 3T3 線維芽細胞を用いた *in vitro* ニュートラルレッド取り込み光毒性試験（試験 88/459）

概要表 2.6.7.17.3 項

本試験では、Balb/c 3T3 線維芽細胞に 0.316、1.0、3.16、10.0、31.6、100.0、316.0 及び 1000 ∀g/mL のセルメチニブ硫酸塩に曝露させた。最高濃度の 1000 ∀g/mL は、本試験実施当時の

ガイドライン（OECD 2004 432 evaluation criteria）で推奨されていた最高濃度である。陽性対照としてクロルプロマジン（0.1～1000 ∀g/mL）を使用した。

細胞は同じ時間、5 J/cm^2 の UVA を照射するか、暗所に放置した。ニュートラルレッド取り込み試験により細胞傷害作用を評価した。UVA を照射しなかった細胞では、ニュートラルレッド取り込み減少を指標とした細胞傷害作用は、セルメチニブ濃度にかかわらず、2 回の独立した試験のいずれにおいても認められなかった。UVA を照射した細胞では、セルメチニブ濃度が 316 及び 1000 ∀g/mL のとき、ニュートラルレッド取り込み減少を指標とした細胞傷害作用が 2 回の試験のいずれでも認められた。

このように、セルメチニブは試験実施当時に OECD ガイドライン（OECD 2004 432 evaluation criteria）で推奨されていた最高濃度までの濃度（1000 ∀g/mL）で検討したとき、光毒性は陽性であったが、現行の ICH S10 ガイドラインでは推奨最高濃度として 100 ∀g/mL が求められており、その基準に従うと陽性ではないと考えられる。

2.6.6.9　　考察

セルメチニブの非臨床安全性プロファイルを、マウス及びサルを用いたそれぞれ最長 26 週間及び 9 カ月間の反復投与試験、rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間及びラットを用いた 2 年間のがん原性試験、並びにマウスを用いた生殖発生毒性試験により検討した。小児患者への投与で意味を持つと考えられる毒性の標的臓器が非臨床試験で明らかになり、それらは臨床的にモニタリング可能かつ管理可能であることが明確になったため、幼若動物を用いたセルメチニブの毒性試験は実施しなかった。

反復投与試験で明らかになった毒性の主要標的臓器は皮膚、骨及び消化管であった。軟組織の鉱質化がげっ歯類の胃粘膜、角膜、腎臓、肝臓、心筋、骨格筋及び胃で認められた。軟組織の鉱質化を除くすべての所見は投薬の中止又は回復期間後に可逆性を示した。

主に反復投与毒性試験で認められた所見及びそれらのヒトでの安全性との関係について、以下で考察する。

2.6.6.9.1　　トキシコキネティクス

主要反復投与毒性試験及び生殖発生毒性試験での定常状態でのセルメチニブの血漿蛋白結合率（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）で補正した非結合形曝露量及び総曝露量と、小児 NF1 患者に臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）を投与したときの曝露量の比較をそれぞれ表 6 及び表 7 に示す。本考察では最も慎重な曝露比を示すため、最小毒性量（LOAEL）又は無毒性量（NOAEL）を投与したときのセルメチニブの非結合型曝露量（げっ歯類）又は総曝露量（サル）を、小児患者に 25 mg/m^2 BID を投与したときの曝露量と比較した。非臨床安全性に関する考察では、非結合形曝露量と総曝露量の区別を示さず、最も小さい曝露量比の値を示した。なお、日本人小児の曝露量（$AUC_{0\text{-}12h}$）は外国人と比較し 1.26 倍高かったため（臨床薬理試験 2.7.2.3.4.1.2 項参照）、日本人における曝露比は以降に示した値の約 0.8 倍となる。

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

Tg rasH2 マウスを用いた 6 カ月がん原性試験で最高用量（15 mg/kg BID）を投与時の平均セルメチニブ曝露は、臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）を投与したときの臨床曝露量の約 16 倍（雄）又は約 24 倍（雌）であった。2 年間のラットがん原性試験でセルメチニブ硫酸塩を 1 日 1 回経口投与したときの曝露量は、臨床最高用量を投与したときの曝露量と比較して、雌（1 mg/kg/日）で 2.9 倍、雄（2.5 mg/kg/日）で 3.7 倍であった。

表 6　　主要反復投与毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比較

Summary of key toxicology findings	Dose (mg/kg)	Total $AUC_{(0\text{-}12)}$ (ng.h/mL)	Multiples to total clinical AUC [a]	Unbound [b] $AUC_{(0\text{-}12)}$ (ng.h/mL)	Margin to unbound clinical AUC [a]
Toxicology studies with Selumetinib free base					
29 day oral toxicity in Sprague-Dawley rats (223-002)					
NOAEL	10 (F) QD	24500	12.2	73.5	2.3
LOAEL: Soft feces; soft tissue mineralisation	10 (M) QD	27500	13.7	82.5	2.6
	30 (F) QD	65000	32.4	195.0	6.1
29 day oral toxicity in monkeys (1639-213)					
LOAEL: GI disturbance	3 (M/F) BID	2600	1.3	59.8	1.9
High dose: GI disturbance and dehydration in all animals; unscheduled termination of 1 animal with serum chemistry and renal tubular microscopic changes	30 (M/F) BID	4300	2.1	100.0	3.1
Repeat dose studies with selumetinib hyd-sulfate					
1-month oral toxicology study in CD-1 mouse (0355AM)					
LOAEL: Ulcerative and inflammatory changes in GI; soft tissue mineralisation	11 (M/F) BID	56950	28.3	627	19.5
High dose: Dose reduced from 103 to 69 mg/kg BID due to severe clinical signs and death in several animals caused by erosive and inflammatory changes in GI; soft tissue mineralisation GI findings and mineralisation were present at the reduced dose	69 (M/F) BID	418100	208	4599	143.1
26 week toxicology study in CD-1 mouse (VKS/0211)					
LOAEL: Microscopic changes in GI	1 (M/F) BID	4505	2.2	49.5	1.5

表 6　　主要反復投与毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比較

Summary of key toxicology findings	Dose (mg/kg)	Total $AUC_{(0\text{-}12)}$ (ng.h/mL)	Multiples to total clinical AUC [a]	Unbound [b] $AUC_{(0\text{-}12)}$ (ng.h/mL)	Margin to unbound clinical AUC [a]
High dose: Premature death or early termination due to microscopic changes in the urinary tract or GI in Weeks 8 to 16. Histopathology findings in the surviving animals at the end study included erosive and inflammatory changes in the GI tract	20 (M/F) BID	81950	40.8	901.5	28.0
28 day oral toxicity study in cynomolgus monkeys (VKS/0153)					
NOAEL	1.5 (M/F) BID	3110	1.5	71.5	2.2
LOAEL: GI disturbances consisting of loose feces	5 (M/F) BID	4185	2.1	96.5	3.0
High dose: No mortalities but dose was reduced from 10 to 7.5 mg/kg on SD 16 due to liquid/watery feces; dehydration and clinical signs	10 (M/F) BID [c]	17100	8.5	392.7	12.2
	7.5 (M/F) BID	11250	5.6	258.4	8.0
26 week oral toxicity study in cynomolgus monkeys (VKS/0210)					
NOEL	0.5 (M/F) BID	907	0.5	20.9	0.6
NOAEL	1.5 (M) BID	2660	1.3	61.2	1.9
LOAEL: GI findings in 1 female	1.5 (F) BID	2450	1.2	56.3	1.8
LOAEL (high dose): GI disturbances consisting of liquid feces and dehydration	4 (M) BID	9790	4.9	225.3	7.0
9-month oral (gavage) toxicity study in monkeys (512415)					
NOAEL	2.5 (M/F) BID	2870	1.4	66.01	2.1
1-month oral toxicity study in CByB6F1 hybrid mouse (20062137)					
NOAEL	25 (M) BID	71900	35.8	791	24.6
LOAEL: Erosion and ulceration in GI	37.5 (M) BID	136400	67.9	1500.4	46.7
	50 (F) BID	401400	199.8	4415.4	137.4
6-month carcinogenicity study in CByB6F1 rasH2 transgenic mouse (20086561)					
LOEL: Non-neoplastic microscopic findings of crypt hyperplasia in colon or cecum	3 (M) BID	5700	2.8	62.7	2.0
	8 (F) BID	38400	19.1	422.4	13.1

表 6　　主要反復投与毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比較

Summary of key toxicology findings	Dose (mg/kg)	Total $AUC_{(0\text{-}12)}$ (ng.h/mL)	Multiples to total clinical AUC [a]	Unbound [b] $AUC_{(0\text{-}12)}$ (ng.h/mL)	Margin to unbound clinical AUC [a]
High dose: Dosed reduced from 25 to 15 mg/kg BID due to severe clinical signs and early deaths All animals survived following dose reduction; no evidence of carcinogenicity effects observed	15 (M) BID	46700	23.2	513.7	16.0
	15 (F) BID	70900	35.3	780	24.3
3-month toxicology study in Han Wistar rats (528088)					
LOAEL: Skin lesions/scabs	2.5 (F) QD	43000	21.4	129.0	4.0
NOAEL	2.5 (M) QD	31400	15.6	94.2	2.9
LOAEL: Skin lesions; mineralisation in males	5 (M) QD	65450	32.6	196.3	6.1
Highest dose: Skin lesions with microscopic ulcerations; physis dysplasia in males; mineralisation in females	10 (M) QD	124950	62.2	374.7	11.7
	12.5 (F) QD	122900	61.2	368.7	11.5
2-year carcinogenicity study in Han Wistar rats (501094)					
NOAEL: Skin lesion and scabs	0.25(M) QD	3456	1.7	10.4	0.3
NOAEL: Skin lesions and scabs	0.3 (F) QD	6590	3.3	19.8	0.6
LOAEL: Skin lesion and scabs with ↑ histopathology findings	0.8 (M) QD	11100	5.5	33.3	1.0
	1 (F) QD	30900	15.4	92.7	2.9
High dose: Increase skin lesions (microscopic) and scabs	2.5 (M) QD	40050	20.0	120.2	3.7

BID = twice daily; F = female; M = Male; M/F = male and female exposure values combined; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observed effect level; LOAEL = lowest observed adverse effect level; LOEL = lowest observed effect level; QD = once daily; SD = study day

$AUC_{0\text{-}12}$ for rat obtained by dividing $AUC_{0\text{-}24}$ by 2 (BID dosing in monkey, mouse and human)

[a] Multiple to clinical exposures were determined by dividing the nonclinical unbound or total $AUC_{(0\text{-}12)}$ by the mean clinical unbound AUC of 32.14 ng.h/mL or mean clinical total AUC of 2009 ng.h/mL.

[b] Unbound $AUC_{(0\text{-}12)}$ is determined by adjusting the total $AUC_{(0\text{-}12)}$ for plasma protein binding (see Module 2.6.4.4).

[c] As 10 mg/kg BID was not tolerated and dose levels were reduced to 7.5, exposure on Day 1 was only measured.

マウス胚・胎児発生に関する試験では、セルメチニブ硫酸塩の無毒性量は 2.5 mg/kg BID であり（表 7）、この用量での平均曝露量は、患者に臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）を投与したとき

の曝露量の約 3.5 倍であった。マウスを用いた出生前及び出生後の発生に関する試験では、無毒性量は確定できなかったが、最低用量（0.5 mg/kg BID）での平均濃度（C_{max}）は、患者に 25 mg/m^2 BID を投与したときの平均曝露量の約 0.4 倍であった（表 7）。

表 7　　CD-1 マウスの生殖発生毒性試験における曝露量と臨床曝露量の比較

Summary of toxicology findings	Dose (mg/kg) BID	Total C_{max} (ng/mL)	Total AUC $_{(0-12)}$ (ng.h/mL)	Margin to total clinical exposure [a]	Unbound C_{max} (ng/mL) [b]	Unbound AUC $_{(0-12)}$ (ng.h/mL) [b]	Margin to unbound clinical exposure [a]
Male and Female Fertility in Mice (VKS/0211 and 0496GM)							
NOEL: male fertility [c]	20 (M)	-	65000	32.4	-	715.0	22.2
NOEL: female fertility [d]	2.5 (F)	-	10300	5.1	-	113.8	3.5
Embryofetal Development (EFD)Study in Mice (0430RM)							
NOAEL: EFD	2.5 (F)	-	10300	5.1	-	113.8	3.5
LOAEL: Minimal maternal toxicity; ∃ in number of live embryos and fetal malformations	12.5 (F)	-	65450	32.6	-	719.9	22.4
Perinatal and Postnatal Development study in Mice [e] (PPND) (20082140)							
LOAEL: Findings in pups included reduced body weight and malformations	0.5 (F)	450	ND	0.6	5.0	ND	0.4

EFD = embryofetal development; F = female; M = Male; BID = twice daily; ND = not determined; NOAEL = no observed adverse effect level; NOEL = no observed effect level; LOAEL = lowest observed adverse effect level; LOEL = lowest observed effect level; PPND = perinatal and postnatal development

[a] Multiple to clinical exposures were determined by dividing the nonclinical unbound or total exposure (AUC $_{(0-12)}$ or C_{max}) by the mean clinical unbound exposure (AUC of 32.14 ng.h/mL or C_{max} of 11.69 ng/mL) or mean clinical total exposure (AUC of 2009 ng.h/mL or C_{max} of 730.7 ng/mL). AUC values were used for calculation of all exposure multiples except for the PPND study where C_{max} was used as AUC values were not determined.

[b] Unbound AUC $_{(0-12)}$ or C_{max} is determined by adjusting the total AUC $_{(0-12)}$ or C_{max} for plasma protein binding (see Module 2.6.4.4).

[c] Male fertility assessed in the 6-month repeat dose study in mice (VKS/0211)

[d] Female fertility assessed in study 0496M. Plasma exposures were not measured in this study. Exposure at NOEL is derived from the dose-range finding embryofetal development study (0430RM)

[e] PPND effects were evaluated in 20082140; AUC values were not determined in this study

2.6.6.9.2　死亡／忍容性

マウス（CD-1 及び CByB6F1 ハイブリッド）、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験においてセルメチニブ投与と関連する死亡が認められた。概してこれらの死亡は臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）での曝露量を超える曝露で発現した。

CD-1 マウスを用いた 7 日間（242 mg/kg BID 超）、1 カ月間（103 mg/kg BID 以上）及び 26 週間（20 mg/kg BID）の反復投与毒性試験で、セルメチニブ硫酸塩の投与は忍容性がなく、死亡や瀕死状態が認められた。セルメチニブと関連する死亡は、雌 CByB6F1 ハイブリッドマウスへの 100 g/kg BID の投与でも認められた。これらの動物では、一般状態変化として、活動性低下、半眼、蒼白、軟便／液状便／暗色便、腹部膨満、呼吸異常、泌尿・肛門生殖器領域周囲の着色、四肢冷触感などが認められた。これらの動物における主要な死因は、消化管の病理組織学的変化である可能性が最も高い。これらの動物が死亡したときの平均曝露量は、臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）での曝露量の 28 倍以上であった。

CD-1 マウスを用いた 26 週間反復投与毒性試験で、セルメチニブ硫酸塩を 20 mg/kg BID（臨床曝露量の約 28 倍相当）で 8 週間超～15 週間投与すると、雄マウスで球海綿体筋の海綿体にうっ血が認められ、これにより一部の動物が尿道閉塞のため早期死亡に至った。マウスでのこの変化の発生機序は不明であるが、カニクイザルへの最長 9 カ月間の反復投与、あるいは rasH2 Tg マウスへの 6 カ月反復投与試験でも、同様の変化は認められなかった。CD-1 マウスへの 20 mg/kg BID では 11～25 週目にも早期死亡が認められた。これらの死亡は大腸、特に結腸及び盲腸での著明な炎症性変化（穿孔や腹膜の罹患も散見された）によるものであった。また、これらの動物では、消化管の炎症による二次的変化が肝臓、脾臓、骨髄及びリンパ節にも認められた。

ラット 3 カ月間反復投与毒性試験で、セルメチニブ硫酸塩 20 mg/kg/日の雄への投与及び 25 又は 50 mg/kg/日の雌への投与で忍容性が認められなかった。これらの用量では、すべての動物が 26 日目又は 30 日目に早期屠殺に至った。これらの動物では、一般状態変化として、背側・腹側の部位における複数の皮膚病変及び／又は痂皮、過剰な毛づくろい／引っ掻き行動、立毛／粗毛、鋤起こし様動作などが認められた。これらの動物は、特に皮膚所見のために 3 カ月間の投与に耐えられないと判断され早期屠殺した。これらの動物では、臨床病理検査所見として、血小板数増加、赤血球量減少、網状赤血球数増加（雌のみ）、ALT、無機リン酸塩及びグロブリンの増加、並びにアルブミン減少が認められた。病理組織学的検査では、皮膚潰瘍形成、大腿骨の骨端軟骨異形成、大腿骨髄の細胞充実性減少、及び様々な組織（胃、腎臓、大動脈、心臓、腸間膜リンパ節、肺、舌）における鉱質化が認められた。これらの動物は、臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）での曝露量の約 17 倍（20 又は 25 mg/kg/日）から 35 倍（50 mg/kg/日）の曝露量で死亡に至った（薬物動態試験の概要文 2.6.4.3.2.5 項参照）。

29 日間の反復投与毒性試験で、30% w/w Captisol に溶解したセルメチニブ遊離塩基を投与すると、ラットで軟便、サルで下痢が認められた。サルでは、持続的な下痢が 3、10 及び 30 mg/kg BID で認められ、30 mg/kg BID（臨床曝露量の 2.1 倍相当）の雄 1 例が脱水、血液生化学的検査値異常、腎尿細管の病理組織学的変化などの二次的変化のために早期屠殺された。Captisol はラット及びイヌで胃腸障害を引き起こすことが知られている（Stella and He 2008）。このサル試験の実施中、各動物に投与する Captisol の総量を減量すると、特に対照群及び低用量群で下痢の発現率及び重症度が低下し、多量の Captisol 投与がセルメチニブによる胃腸障害（液状便）を悪化させていたことが示唆された。10 mg/kg BID 群の雄 2 例の瀕死状態及び 3 mg/kg BID 群の雄 1 例の死亡は、投与手順中に外傷が持続したことに起因すると考えられた。これらの動物で認められた病理組織学的所見は強制投与による外傷と一致していた。

2.6.6.9.3　　皮膚

セルメチニブ硫酸塩を雌ラットに 25 mg/kg（臨床曝露量の約 30 倍相当）以上の用量で 14 日間連日経口投与すると、皮膚病変／痂皮が用量依存的に認められた。セルメチニブ硫酸塩をラットに 3 カ月間連日経口投与すると、2.5 mg/kg/日（臨床曝露量の 4 倍相当）以上を投与した雌及び 5 mg/kg/日（臨床曝露量の 6 倍相当）以上を投与した雄で皮膚への影響が認められた。この 3 カ月試験の高用量では、皮膚病変及び対応する病理組織学的所見として潰瘍形成が認められた。2 年間のラットがん原性試験では、0.8 mg/kg/日（臨床曝露量の 1 倍相当）以上を投与した雄及び 1 mg/kg/日（臨床曝露量の 2.9 倍相当）以上を投与した雌で、用量依存的に皮膚にびらん／潰瘍の病理組織学的所見が認められた。

皮膚は、MEK 阻害剤を投与したげっ歯類、及び RAS-RAF-MEK-ERK 経路（RAS により調節される RAF-MEK-ERK 経路）阻害剤を投与した患者における毒性の標的臓器であることが知られている（Brown 2010、Welsh and Corrie 2015）。これらの試験では所見の可逆性は評価しなかったが、承認済みの MEK 1/2 阻害剤（Binimetinib (Mektovi®) 2018、Cobimetinib (Cotellic®) 2015、Trametinib (Mekinist!) 2013）の情報から、認められた皮膚病変は可逆的であると考えられる。

小児患者及び成人患者において、発疹はセルメチニブ単独投与中に最も多く報告されている有害事象であり、一般的にざ瘡様（丘疹膿疱性）であった。ざ瘡様皮疹は、セルメチニブの投与開始後 1 週間以内に発現する場合もあるが、通常は投与開始後 1 カ月以内に発現する。また、セルメチニブの臨床試験では皮膚乾燥も高頻度で報告されている（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.4　　消化管

セルメチニブ硫酸塩を CD-1 マウスに 11、34 及び 103/69 mg/kg BID の用量で 1 カ月間、又は 1、5 及び 20 mg/kg BID の用量で 26 週間連日投与すると、盲腸における限局性潰瘍形成、炎症及び／又は粘膜肥大、結腸における限局性漿膜炎、十二指腸ブルンナー腺の限局性変性、胃における腺上皮細胞変性及び急性炎症性細胞浸潤、腺性粘膜のびらん／潰瘍形成及び炎症、粘膜下及び漿膜の炎症を特徴とする腸疾患が認められた。これらの消化管所見は、1 カ月試験では 11 mg/kg BID（臨床曝露量の 19.5 倍相当）以上の投与で、26 週間試験では 1 mg/kg BID（臨床曝露量の 1.5 倍相当）以上の投与で認められた。セルメチニブ投与と関連する消化管での同様の変化は、CByB6F1 ハイブリッドマウスを用いた 1 カ月間用量設定試験でも、雄では 37.5 mg/kg BID（臨床曝露量の 46.7 倍相当）以上、雌では 50 mg/kg BID（臨床曝露量の 137.4 倍相当）以上で認められた。

ラット 29 日間反復投与毒性試験でセルメチニブ遊離塩基を 10、30 及び 100 mg/kg/日の用量で 1 日 1 回投与すると、10 mg/kg/日（臨床曝露量の 2.6 倍相当）以上を投与した雄及び 30 mg/kg/日（臨床曝露量の 6 倍相当）以上を投与した雌で軟便が認められた。これらの動物の消化管には、関連する病理組織学的所見は認められなかった。

セルメチニブ遊離塩基をサルに 3、10 及び 30 mg/kg BID の用量で 29 日間反復投与すると、3 mg/kg BID（臨床曝露量の約 1.3 倍相当）以上で下痢が認められた。また、下痢の持続による二次的変化として、脱水、血液生化学的検査値異常及び腎尿細管の病理組織学的変化が認められた。このサル試験の実施中に投与する Captisol の総量を減量すると、特に対照群及び低用量群で下痢の発現率及び重症度が低下した。セルメチニブ硫酸塩をサルに 26 週間投与した試験でも、1.5 mg/kg BID（臨床曝露量の 1.2 倍相当）を投与した雌及び 4 mg/kg BID（臨床曝露量の約 4.9 倍相当）を投与した雄で軟便／液状便が認められた。下痢は、休薬又は水分補給を必要とする脱水及び／又は体重減少が伴うこともあった。これら消化管への影響及び関連する臨床病理検査値の

変化については、休薬により回復傾向を示した。サルでは消化管において、下痢と関連する病理組織学的変化は認められなかった。セルメチニブ硫酸塩をサルに 9 カ月間投与したところ、1.5 mg/kg BID（臨床曝露量の 1 倍）以上で試験 5 週目までに散発的な軟便／液状便がみられた。本試験では、便の異常に関連する剖検所見あるいは病理組織学的変化は認められなかった。下痢はサルでの用量制限毒性であった。

げっ歯類及びサルで認められたこれら消化管への影響は、この薬剤クラスに共通する作用機序に関連すると考えられる。RAS により調節される RAF-MEK-ERK 経路は、消化管上皮細胞の増殖、分化、遊走及び生存を調節し、この調節作用は発達過程にある組織の成長、成体組織の再生、並びに潰瘍及び過剰増殖性疾患の治癒に重要な役割を果たしている（Osaki and Gama 2013）。臨床試験においてセルメチニブの投与により下痢、悪心及び嘔吐が認められていることから、非臨床試験で認められた消化管所見は臨床的に意義があると考えられる。臨床試験ではセルメチニブに関連する消化管への影響は止痢薬及び制吐薬を用いた早期の介入により管理可能であった（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.5　　骨（大腿骨）

Han Wistar ラットを用いた 3 カ月間反復投与試験で、臨床曝露量（25 mg/m^2 BID 投与時）の 11 倍以上の曝露量において、大腿脛骨関節に病理組織学的所見が認められた。セルメチニブ硫酸塩 10 mg/kg BID を投与した雄で、大腿骨に骨端軟骨異形成、25 mg/kg BID を投与した雌で、骨端軟骨に隣接する大腿骨の骨髄に細胞充実性減少が認められた。2 年間のラットがん原性試験では、臨床曝露量（25 mg/m2 BID 投与時）の約 3 倍（雌）及び約 4 倍（雄）の曝露量で、骨端軟骨異形成は認められなかった。

げっ歯類の骨端軟骨板における肥大軟骨細胞数増加がいくつかの薬剤で報告されており、この病理学的症候群は「成長板（骨端軟骨）異形成」と呼ばれている（Brown et al 2005、Frazier et al 2007、Hall et al 2006）。肥大軟骨細胞の帯域拡大及び長骨における一次骨化中心形成遅延に MEK 阻害が関与していることが、遺伝子改変マウスモデルを用いた研究で示されている（Matsushita and Murakami 2012）。したがって、ラットで認められた骨への影響はセルメチニブの薬効薬理作用が起因していると考えられる。ラットにおける骨端軟骨異形成は別の MEK1/2 阻害剤ビニメチニブでも認められ、28 日間投与後に 4 週間休薬することで回復することが示されている（Mektovi® (Binimetinib) 2018）。セルメチニブのラット 3 カ月間反復投与毒性試験では所見の回復性評価しなかったが、ビニメチニブ（Mektovi® (Binimetinib) 2018）及び抗血管新生薬（Bender et al 2011、Hall et al 2006、Patyna et al 2008、Patyna et al 2008、Wedge et al 2005）の情報から骨端軟骨異形成は可逆的な変化と考えられた。

マウス及びカニクイザルにセルメチニブをそれぞれ 26 週間あるいは 9 カ月間投与した試験では、骨端軟骨板に影響は認められなかった（使用したカニクイザルは未成熟で骨端がまだ開いている年齢であった）。しかし、骨端軟骨異形成は抗 VEGF 抗体を投与したカニクイザルでも報告され（Ryan et al 1999）、骨端軟骨板への影響は非臨床試験動物種を超えて発現する可能性が確認されている。VEGF 阻害剤であるバンデタニブはげっ歯類で骨端軟骨異形成を引き起こすが、小児患者を対象としたバンデタニブの第 I/II 相臨床試験においても骨端軟骨板の変化が報告されており（Bender et al 2011）、げっ歯類に骨端軟骨異形成をもたらす薬剤は、ヒトにおいても対応する影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

ラットにおける骨端軟骨異形成は臨床曝露量の 11 倍以上で認められたが、セルメチニブは骨格的に未成熟な患者の骨端軟骨板に影響を及ぼす可能性がある。そのため、セルメチニブの小児を対象とした臨床試験では定期的に骨成長を評価するとともに、骨端軟骨異形成のモニタリングを実施した。手術不能な PN を有する NF1 小児患者にセルメチニブを中央値で 30 サイクル投与

した臨床試験では、セルメチニブ投与による身長への測定可能な影響は認められなかった（Dombi et al 2016）。同様に、SPRINT 試験に組み入れられた小児患者に、骨成長の変化や骨端軟骨異形成の徴候は認められなかった（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.6　組織の鉱質化

ラット及びマウスにセルメチニブ遊離塩基又はセルメチニブ硫酸塩を投与すると、様々な組織で用量依存的に軟組織の鉱質化（カルシウム）が認められた。ラットにセルメチニブ遊離塩基を 29 日間投与した試験では、胃粘膜の鉱質化が 10 mg/kg/日（臨床曝露量の 2.6 倍相当）以上の雄及び 30 mg/kg/日（臨床曝露量の 6 倍相当）以上の雌で認められた。

マウスにセルメチニブ硫酸塩を 1 カ月間投与した試験では、11 mg/kg BID（臨床曝露量の 19.5 倍相当）以上の用量で、角膜、腎臓、肝臓、心筋、骨格筋、腺胃など、様々な組織で鉱質化が認められた。マウスとラットのいずれでも、鉱質化は血漿無機リン酸塩、カルシウム及びアルブミンの変化を伴っていた。血漿無機リン酸塩、カルシウム及びアルブミンの変化はマウスにセルメチニブ硫酸塩を 26 週間投与した試験でも認められたが、この試験で組織の鉱質化は肝臓で認められた軽微な多巣性鉱質化に限られ、しかもこれは 20 mg/kg BID（臨床曝露量の 28 倍相当）群の少数例でのみ認められた。マウスへのセルメチニブ硫酸塩投与で認められた病理組織学的所見及び関連する血液生化学的検査値の変化は、概ね患者に推奨用量を投与したときの 19 倍以上の曝露量で発現した。

線維芽細胞増殖因子 23 及び無機リン酸塩の増加を伴う軟組織の鉱質化は、過去にもラットを用いた MEK 阻害剤で報告されている（Diaz et al 2012）。したがって、セルメチニブ試験で認められた所見は MEK の薬理及び MAPK 経路の阻害に起因すると考えられる。カニクイザルでは、セルメチニブ遊離塩基を 29 日間投与した試験及びセルメチニブ硫酸塩を最大耐量までの用量で最長 9 カ月間投与した試験のいずれにおいても組織の鉱質化は認められなかった。血清リン増加と軟組織の鉱質化は MEK 阻害剤である PD0325901 を投与したイヌ及びサルにおいて、ラットより曝露量が著しく高かったにもかかわらず認められず、別の MEK 阻害剤 GEN-A を投与したイヌでも認められなかった（Brown 2010、Diaz et al 2012）。これは、げっ歯類が非げっ歯類と比べて、この毒性への感受性が高いことを示唆している。PD0325901 の臨床試験における血清カルシウム及び無機リン酸塩のモニタリングでは、血清カルシウムとリン酸塩のいずれについても明らかな影響は認められておらず、ヒトはこの影響を受けにくい可能性が示唆されている（Brown 2010）。

セルメチニブを投与した一部の成人患者（1%未満）で無症候性の血清カルシウム及びリンの増加が報告され、組織の鉱質化に対してヒトは感受性が低いことが示された。セルメチニブを投与した NF1 小児患者については、血清カルシウム及びリンをモニタリングしているが、小児患者で血清カルシウム及びリンに意義のある変化は認められなかった（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.7　泌尿生殖器系

CD-1 マウスを用いた 26 週間試験において、セルメチニブ硫酸塩を 20 mg/kg BID（臨床曝露量の 28 倍相当）の用量で 8～15 週間投与すると、雄で球海綿体筋の海綿体にうっ血が認められ、これが原因で一部の動物は炎症及び尿道閉塞を発現し、早期死亡に至った。これらの雄では二次的変化が膀胱、尿管及び腎臓に認められた。予定の剖検まで生存した動物では、泌尿生殖器系に投与と関連する所見は認められなかった。これらのマウスの陰茎変化の発現機序は不明であるが、同様の変化はセルメチニブ硫酸塩のカニクイザルへの 9 カ月間投与試験、あるいは rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間がん原性試験では認められなかった。腎尿細管の空胞化がマウス 1 カ月

間反復投与試験及びカニクイザル 29 日間反復投与試験で散発的に認められたが、これは媒体に用いた Captisol が原因である可能性が高かった。シクロデキストリンは、げっ歯類及び非ヒト霊長類で腎尿細管に空胞化を引き起こすことが知られている（Stella and He 2008）。げっ歯類の腎臓では鉱質化も認められたが、MEK 阻害剤はげっ歯類の組織に鉱質化を引き起こすことがよく知られており、げっ歯類の腎臓で認められた鉱質化もこの毒性の一部と考えられる。したがって、泌尿器はセルメチニブの標的臓器ではなく、CD-1 マウスを用いた 26 週間試験で認められた泌尿生殖器の変化は陰茎機能への影響である可能性が示唆された。マウスの陰茎に認められた変化の機序は不明であるが、rasH2 Tg マウスを用いた 6 カ月間試験及びカニクイザル試験で影響が認められなかったことは、対応する変化がヒトで発現する可能性が低いことを示唆している。また仮に同様の変化がヒトで発現しても、臨床では容易にモニタリングが可能であり、管理も可能と考えられる。現在までのところ、セルメチニブを投与した患者に陰茎機能への影響は認められていない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.8　肝臓

マウスにセルメチニブ硫酸塩を 20 mg/kg BID（臨床曝露量の 28 倍相当）の用量で最長 26 週間投与すると、肝門脈域に炎症性細胞浸潤が認められた。この肝臓の病理組織学的所見は、肝損傷を示唆する血漿マーカーの変化を伴っていなかった。同様の変化は、セルメチニブを最長 9 カ月間投与したカニクイザル及び最長 2 年間投与したラットでは認められなかった。マウスの肝臓で認められたこの炎症性変化は、消化管で認められたびらん性・炎症性変化に続発する変化と考えられた。

成人患者において、セルメチニブ投与開始後 1 週間以内に血清トランスアミナーゼ増加が認められた。NF1 小児患者では肝臓の生化学検査値をモニタリングしているが、成人への単独投与時の安全性プロファイルと比較し、それらのパラメータに顕著な変化は認められていない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.9　リンパ細網系

マウスにセルメチニブ硫酸塩を 20 mg/kg BID（臨床曝露量の 28 倍相当）の用量で最長 26 週間投与すると、骨髄の細胞充実性低下（萎縮）が認められ、関連して循環血中に存在する赤血球値の減少も認められた。これらの変化は網状赤血球の増加及び脾臓における髄外造血を伴い、骨髄及び末梢組織における適切な生理学的反応であることが示唆された。骨髄では顆粒球数増加も認められ、末梢の血液学的検査で好中球数、好酸球数及び単球数の増加が認められた。これらの変化は腸の炎症に対する反応と考えられた。リンパ節で認められた反応性過形成も腸の炎症に対する反応と考えられた。同様の変化は、最長 2 年間投与したラットでは認められなかった。ラット 3 カ月試験で、12.5 mg/kg/日（臨床曝露量の 11.5 倍相当）を投与した雌の大腿骨髄に造血亢進が認められたが、末梢の血液学的検査値では関連する変化は認められず、皮膚病変に対する反応と考えられた。カニクイザルの 9 カ月間試験では、1.5 mg/kg BID（臨床曝露の 0.9 倍）以上の数例で病理組織学的変化を伴わない軽微で一時的な好中球、白血球及び好酸球の増加、並びに鼠径リンパ節の腫脹が認められた。

マウス骨髄における細胞充実性低下（萎縮）は、セルメチニブ硫酸塩が骨髄に直接作用した可能性を示唆するが、腸の炎症、特に腸の慢性炎症が、赤血球生成の抑制に寄与した可能性もある。また、腸のびらん性・潰瘍性病変からの失血が赤血球量減少に寄与した可能性もある。網状赤血球の増加及び脾臓における髄外造血が認められたことから、適切な生理学的反応が維持されていたことが確認され、血小板数の増加は、網状赤血球増加に関連して血小板生成の必要性が増

加したことをおそらく反映している。白血球数増加も、骨髄が腸の炎症に適切に反応したことを示している。マウスで認められた血液学的検査値の変化はすべて、休薬後には完全に回復した。

セルメチニブを投与したNF1小児患者では、血液学的変化をモニタリングしているが、これまでに一部のNF1小児患者で赤血球パラメータ、白血球数及び血小板数に変化が認められている（臨床的安全性の概要2.7.4項参照）。

2.6.6.9.10　遺伝毒性及びがん原性

セルメチニブは細菌を用いた*in vitro*の復帰突然変異試験で突然変異誘発性を示さず、哺乳類細胞を用いた*in vitro*試験（小核試験、マウスリンフォーマ試験）でも遺伝毒性を示さなかったが、CD-1マウスの骨髄で小核を誘発した。この小核形成は異数性の誘発によることがセントロメア染色から示され、これはセルメチニブの既知の薬理作用により正常な紡錘体機能が障害されることと一致している。MEKキナーゼを阻害すると双極紡錘体が速やかに脱重合されることが知られており、MEK阻害剤であるUO126は紡錘体の重合を阻害することが示されている（Horne and Guadagno 2003）。

細菌及び哺乳類細胞を用いた*in vitro*試験で遺伝毒性を示さない他のMEK阻害剤でも、げっ歯類を用いた小核試験で骨髄に小核を誘発することが示されている（Tweats et al 2007）。また、動原体陽性小核誘発率が100%ではなく、通常70～80%程度であるコルヒチンやビンブラスチンなどの強力なチューブリン毒性物質は、リスクアセスメントにおいては異数性誘発物質として取り扱われる（ICH S2(R1)ガイドライン）。

小核試験の結果から、セルメチニブは分裂細胞に対して異数性を誘発する可能性が示され、セルメチニブ硫酸塩をマウスに投与した試験で小核誘発に関する無影響量は24 mg/kg/日であった。セルメチニブは一連の*in vitro*遺伝毒性試験で突然変異誘発性や染色体切断作用を示さなかったことから、染色体損失が起こらないと予想される曝露量閾値（臨床曝露量との比）を示すことが可能と考えられた。小核誘発の無影響量におけるセルメチニブの曝露量（C_{max}）は、臨床においてセルメチニブ硫酸塩25 mg/m^2 BIDを投与したときのC_{max}の約28倍であり、同じく代謝物N-脱メチル体の曝露量は臨床C_{max}の約59倍であった。

セルメチニブは小核試験の結果が陽性であり、また、NF1小児患者では投与期間が長期となり生涯続く可能性が高いことから、rasH2 Tgマウスを用いた6カ月間の試験及びラットを用いた2年間の試験でセルメチニブのがん原性を評価した。rasH2 Tgマウスを用いた6カ月間のがん原性試験では、セルメチニブ投与と関連する剖検所見あるいは腫瘍性の病理組織学的所見はいずれの用量でも認められなかった。試験を実施した最高用量（15 mg/kg BID）を投与したとき、雄及び雌マウスにおける曝露量は、臨床での平均曝露量のそれぞれ16倍及び24倍上回った。

2年間のラットがん原性試験では、セルメチニブ硫酸塩を最高2.5 mg/kg/日（雄）又は1 mg/kg/日（雌）で連日経口投与し、良好な忍容性が認められた。臨床曝露量の3.7倍（雄：2.5 mg/kg/日）又は2.9倍（雌：1 mg/kg/日）までの曝露量で投与したが、触知腫瘤や腫瘍性・前腫瘍性所見の発現率が増加することはなかった。

したがって、セルメチニブはrasH2 Tgマウスとラットのいずれにおいても、がん原性を示さないと考えられた。

2.6.6.9.11　生殖発生毒性

CD-1マウスを用いてセルメチニブの受胎能・生殖発生毒性試験を実施した。セルメチニブは雄に対して20 mg/kg BIDまで、雌に対して2.5 mg/kg BIDまでの用量で受胎能に影響を及ぼさな

かった。これらの用量による曝露量はヒトに 25 mg/m^2 BID を投与したときの曝露量のそれぞれ 22 倍及び 3.5 倍である。また、交尾行動及び受胎能への影響はなかったが、雌受胎能試験で 12.5 mg/kg BID（臨床曝露量の 22 倍相当）以上を投与した群で生存胎児数のわずかな減少が認められた。しかし、3 週間の休薬後には、いずれのパラメータにも影響は認められず、投与の影響は可逆的であると考えられた。

マウスを用いたセルメチニブの胚・胎児発生試験から、セルメチニブは母体毒性が発現しない用量で胚・胎児の発生及び生存に有害な影響を与える可能性が示唆された。器官形成期にセルメチニブを投与すると、臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）を投与したときの曝露量の 3.5 倍超で、着床後死亡胚の増加による生存胎児数の減少、平均胎児・同腹児体重の減少、並びに開眼及び口蓋裂の増加が認められた。MEK1 は眼瞼上皮の移動性辺縁に高濃度に発現しており、MEK1 欠損マウスでは胎児の眼瞼閉鎖は障害されることから（Zhang et al 2003、Newbern et al 2008、Parada et al 2015）、開眼はセルメチニブの薬理作用によると考えられた。

マウス胎児の眼瞼形成は、発達中の眼に隣接する表面外胚葉が襞になることで交尾後 13 日から始まる。眼瞼閉鎖は交尾後 15.5～16.5 日に生じる。このとき眼瞼表皮の最外層が眼の中心部に向かって移動し始め、眼の表面全体を覆い、融合して閉じた眼瞼を形成し、閉じた眼瞼は角膜を保護する役割を果たす（Zhang et al 2003）。ホモ接合性 MEK1 遺伝子欠失マウスは、開眼であることを除いて外観は比較的正常に生まれてくる。眼瞼閉鎖は、胎児表皮由来上皮細胞の角膜表面上への移動を伴うことが示されている。この移動は、トランスフォーミング増殖因子%（TGFα）及びインテグリン α5β1 細胞外マトリックス受容体により調節されている。TGFα 遺伝子の両アレルのみを破壊すると、MEK1 遺伝子欠失マウス同様、マウスは開眼状態で生まれる（Yujiri et al 2000）。

妊娠マウスに妊娠 6 日から授乳 20 日までセルメチニブを投与すると、出生児体重が減少し、生後 21 日に瞳孔収斂基準を満たす出生児の数も減少した。また、試験を実施したすべての用量で奇形（未成熟な開眼及び口蓋裂）の発現率が増加した。奇形は、母動物における血中薬物濃度（C_{max}）が臨床最高用量での平均曝露の 0.4 倍でみられた。出生前及び出生後の発生に関する試験の結果からも、セルメチニブが胎児の発生に影響を及ぼすことが示された。

このように、セルメチニブは臨床曝露に近い血漿中曝露量でマウスに胚・胎児毒性及び胎児異常を生じさせる可能性があることが示され、他の承認済みの MEK 阻害剤（Trametinib (Mekinist!) 2013、Cobimetinib (Cotellic®) 2015、Binimetinib (Mektovi®) 2018）でも非臨床試験で胎児に発生異常が認められている。したがって、セルメチニブの非げっ歯類を用いた第二の胚・胎児発生毒性試験については、実施した場合に更にリスクアセスメントに影響を与えるデータは得られず、実施は不要と考えられた。妊娠可能な女性には有効な避妊法を使用するよう、指導している（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.12　幼若動物での毒性

セルメチニブを小児患者に投与するための幼若動物を用いた毒性試験は実施しなかった。成熟動物を用いて実施した主要な毒性試験で確立された標的臓器毒性プロファイルは、全年齢の小児で意義を持つと考えられる。毒性試験で認められた消化管での所見、皮膚での所見及び血漿カルシウム及びリンの変化は、小児患者で容易にモニタリング及び管理が可能である。また、小児患者を対象とした進行中の臨床試験で得られた安全性データから、同程度の曝露量で比較したとき、小児患者と成人がん患者の有害事象プロファイルが概ね類似することが確認されている。

患者で認められた主な有害事象は、血中クレアチンホスホキナーゼ増加、嘔吐、皮膚乾燥、悪心、下痢、ざ瘡様皮膚炎及び口内炎であった。これらのうち、消化管及び皮膚への影響のみが非臨床毒性試験で認められた（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

成長過程の器官系への影響としては、ラットの大腿脛骨関節で病理組織学的所見が認められた。セルメチニブは骨格的に未成熟なヒトの骨端軟骨板に影響を及ぼす可能性がある。したがって、小児患者では骨端軟骨異形成の徴候及び骨成長への影響をモニタリングしている。これまでのところ、小児患者にセルメチニブを投与後、これらのパラメータに意義のある変化が認められたとの報告はない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。したがって、幼若動物を用いた毒性試験を実施しても、上記所見のリスクアセスメントに関してさらなる知見は得られないと考えられる。

[redacted]は、、20[redacted]年[redacted]月に EMA の[redacted]、20[redacted]年[redacted]月に EMA、20[redacted]年[redacted]月に FDA、20[redacted]年[redacted]月に PMDA により了承されている。

2.6.6.9.13　光毒性

セルメチニブは紫外線領域の光を吸収し、316 及び 1000 µg/mL の濃度で実施した 3T3 細胞を用いた *in vitro* ニュートラルレッド取り込み光毒性試験で、紫外線照射により細胞傷害作用が増強されることが示された。ただし、これらの濃度は現行の ICH S10 ガイドラインによる推奨最高濃度（100 µg/mL）のそれぞれ 3 及び 10 倍である。この光毒性試験の陽性結果は、臨床最高用量（25 mg/m^2 BID）での遊離型最高濃度の 8000 倍超という著しく高い濃度で認められたものである。本試験における試験濃度は OECD 2004 432 evaluation criteria に基づいて選択されたが、この基準はその後、陽性結果が高率で得られることから、1000 µg/mL から 100 µg/mL へ引き下げられた。また、セルメチニブはラットにおける全身オートラジオグラフィーの検討で、メラニンとの結合親和性が低いことが示された（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）。したがって、これまでに得られている非臨床試験データから、セルメチニブは光毒性リスクを示さないと考えられる。

臨床試験では、セルメチニブ投与中に被験者を UVA 照射から保護することについて、特別な対応は取っておらず、光毒性に関して意義のある安全性上の所見も得られていない（臨床的安全性の概要 2.7.4 項参照）。

2.6.6.9.14　代謝物及び不純物

セルメチニブの非臨床試験で 2 つの微量代謝物が同定された。1 つは N-脱メチル体（M8）で、これはマウスで検出され、薬理活性はセルメチニブの 3～5 倍である。もう 1 つはアミド体（M14）で、これはマウス、ラット及びサルで検出され、薬理活性はセルメチニブの 50 分の 1 以下である（薬理試験の概要文 2.6.2 項参照）。これらの代謝物は患者の循環血漿中に存在する総セルメチニブ関連物質の 10%未満の割合で検出され（臨床薬理の概要 2.7.2 項参照）、したがって ICH M3(R2)ガイドラインに基づくと、これらの代謝物を非臨床試験で評価することは必須ではない。しかし、N-脱メチル体のヒトでの濃度は当初不明であり、さらに薬理活性を有することから（薬理試験の概要文 2.6.2 項参照）、この代謝物の全身曝露量を毒性試験でモニタリングし、*in vitro* 遺伝毒性試験で評価した。N-脱メチル体は *in vitro* で遺伝毒性を示さなかった。この代謝物は CD-1 マウスを用いた 1 カ月間及び 26 週間の反復投与毒性試験並びに生殖発生毒性試験で検出され、血漿中濃度は血漿セルメチニブ濃度のそれぞれ最高約 7%、16%及び 4.5%であった。N-脱メチル体は CByB6F1/Tg マウスでも、血漿セルメチニブ濃度の約 10%～35%の範囲で検

出された（薬物動態試験の概要文 2.6.4 項参照）。セルメチニブアミドについてはマウス、ラット及びサルで血漿中濃度を測定し、さらなる評価は不要と考えられた。

ヒト血漿中に最も多く存在する代謝物（M2）は O-グルクロン酸抱合体で、これはヒトに[^{14}C]-セルメチニブを単回経口投与したとき、総放射能の約 22%を占めた。M2 は第二相抱合反応により生成され、薬理活性はないと推定される（Safety testing of drug metabolites, FDA 2016）。M2 はマウス及びラットで検出された。M2 は不活性代謝物であり、さらなる非臨床評価は不要と考えられた。

セルメチニブ硫酸塩の臨床使用バッチで、0.1%を超えるすべての有機不純物を同定し、それらがセルメチニブと構造的に関係することを確認した。検出された有機不純物は、 不純物A* 、 不純物B* 、 不純物C* 及び 不純物D* のみであった。マウス及びサルを用いた 1 カ月間又は 6 カ月間反復投与毒性試験並びにラット 3 カ月間反復投与毒性試験で使用したセルメチニブのロットは、これらの不純物を相応する濃度で含有し、臨床使用ロットでの安全性が確認された（品質に関する概括資料 2.3.S.4.5 項参照）。

不純物E* は、セルメチニブ硫酸塩（原薬）の工程中間体であり、セルメチニブ硫酸塩の加水分解物でもある。 不純物E* は、ネズミチフス菌の 2 種のヒスチジン要求性株（TA1535 及び TA1535NR）を用いた *in vitro* 復帰突然変異試験で弱い変異原性を示した。しかし、TA1535 株からニトロ還元酵素遺伝子が欠損した株である YG7127 株を用いて検討したところ、TA1535 株での陽性結果は細菌特異的な機序によるものであることが明らかになった。YG7127 株では陰性、TA1535 及び T1535NR 株は弱い陽性であったことから、陽性結果はニトロ還元酵素に起因することが示された。したがって、 不純物E* の陽性結果は哺乳類細胞では意義を持たないと考えられる。また、 不純物E* は、L5178Y マウスリンフォーマ細胞を用いた *in vitro* 小核試験において、S9 の存在下及び非存在下で 1 mM まで小核を誘発しなかった。1 mM という濃度は、*in vitro* 小核試験で使用する濃度として ICH S2(R1)ガイドラインが推奨する最高濃度である。したがって、この不純物は意義のある変異原性を示さないと考えられる。

不純物F* は *in vitro* 復帰突然変異試験で陽性であった。構造活性関係評価により、原薬の製造工程中にいくつかの潜在的変異原性不純物が同定された（品質に関する概括資料 2.3.S.3.2 項参照）。 不純物F* とこれらすべての潜在的変異原性不純物について、ICH M7(R1)ガイドラインに従って管理している。

ICH M7(R1)ガイドラインに従い、セルメチニブ硫酸塩中の理論的な不純物である 不純物H* の発がんリスク評価のため復帰突然変異試験を実施した。本試験は、N-ニトロソアミンの変異原性検出のためプレインキュベーション法を用い、また溶媒として DMSO を使用しないことにより最適化されたデザインを採用した。さらに、ニトロソアミンは変異原性を示す際に代謝活性化を必要とするため、ハムスター及びラットの S9 代謝活性化系を使用した。ハムスターの肝由来 S9 は、マウスあるいはラットの S9 よりもニトロソアミンの活性化に効果的であることが知られている（Prival and Mithcell 1981、Lijinsky and Andrews 1983）。例えば、既知の動物発がん物質であるジメチルニトロソアミンは、ラット S9 を使用した復帰突然変異試験では陰性であったが、ハムスターS9 を用いた場合は陽性結果を示した（Prival and Mithcell 1981）。 不純物H* は、ラット及びハムスターS9 代謝活性化系の有無に拘わらず復帰突然変異試験で陰性であったため、突然変異を誘発しないと考えられた。

2.6.6.10　結論

セルメチニブの非臨床毒性プロファイルは大部分がこの化合物の薬理作用を反映し、トラメチニブ、cobimetinib、ビニメチニブなど、他の市販の MEK 阻害剤で報告されている所見と概ね一致していた。反復投与毒性試験で明らかになった毒性の主要標的臓器は皮膚、骨及び消化管であった。げっ歯類のいくつかの器官で軟組織の鉱質化が認められ、関連して血漿総リン酸塩及び／又はカルシウムの増加並びにアルブミン減少が認められた。セルメチニブ投与と関連するすべての所見は、臨床で 25 mg/m^2 BID 投与時の曝露量と同程度かそれ以上の曝露量で認められた。げっ歯類で認められた軟組織の鉱質化を除き、すべての変化は可逆的であり、休薬により回復することが示された。

セルメチニブは細菌及び哺乳類細胞を用いた *in vitro* 試験で遺伝毒性を示さなかったが、マウスを用いた *in vivo* 試験で、主に異数性の誘発により骨髄に小核を誘発した。セルメチニブは、6 カ月間の rasH2 Tg マウス試験及び 2 年間の Han Wistar ラット試験でがん原性を示さなかった。

マウス生殖毒性試験において、セルメチニブの経口投与による受胎能への影響は雌雄ともに認められなかったが、着床後死亡胚の増加による生存胎児数の減少、平均胎児・同腹児体重の減少、並びに開眼及び口蓋裂の発現率増加が認められた。妊娠マウスに妊娠 6 日目から授乳 20 日目までセルメチニブを投与すると、出生児体重減少及び奇形（未成熟な開眼及び口蓋裂）の発現率増加が認められ、さらに生後 21 日目に瞳孔収斂基準を満たした出生児の数が減少した。これらの所見は、25 mg/m^2 BID の投与で達成される臨床曝露量より低い曝露量で認められた。

セルメチニブは、関連ガイドラインの推奨最高濃度（100 µg/mL）で試験を実施しても、光毒性リスクを示さなかった。

マウスを用いた主要毒性試験で、微量活性代謝物である N-脱メチル体への曝露が確認された。評価が必要となるすべての不純物について反復投与毒性試験で安全性が確認された。変異原性不純物及び潜在的変異原性不純物については、製造工程で濃度を管理している。

セルメチニブの非臨床毒性プロファイルは申請適応症において許容可能と考えられる。

2.6.6.11　参考文献

Bender et al 2011

Bender JG, Yamashiro DJ, Fox E.　Clinical development of VEGF signalling pathway inhibitors in childhood solid tumors. The Oncologist. 2011; 16: 1614-25.

Binimetinib (Mektovi®) 2018

Pharmacology review section of the FDA Approval Package for binimetinib (Mektovi). NDA 21-0498. June 2018.

Brown et al 2005

Brown AP, Courtney CL, King LM, Groom SC, Graziano MJ. Cartilage dysplasia tissue mineralization in the rat following administration of a FGF receptor tyrosine kinase inhibitor. Toxicologic Pathology. 2005; 33: 449-55.

Brown 2010

Brown AP. Development of serum calcium and phosphorus as clinical biomarkers for drug-induced systemic mineralization: Case study with a MEK inhibitor. In Biomarkers in Drug Development, 1st ed.

(M. R. Bleavins, C. Carini, M. Jurima-Romet, and R. Rahbari, Eds.), pp.301–322. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. 2010.

Cobimetinib (Cotellic®) 2015

Pharmacology review section of the FDA Approval Package for cobimetinib (Cotellic). NDA 20-6192. October 2015.

Diaz et al 2012

Diaz D, Allamneni K, Tarrant JM, Lewin-Koh SC, Pai R, Dhawan P, et al. Phosphorus dysregulation induced by MEK small molecule inhibitors in the rat involves blockade of FGF-23 signalling in the kidney. Toxicol Sci. 2012; 125(1): 187-95.

Dombi et al 2016

Dombi E, Baldwin A, Marcus LJ, Fisher MJ, Weiss B, Kim A, et al. Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1-Related Plexiform Neurofibromas. N Engl J Med. 2016; 375: 2550-60.

FDA 2016

The US FDA. Guidance for industry: safety testing of drug metabolites 2016.

Frazier et al 2007

Frazier K, Thomas R, Scicchitano M, Mirabile R, Boyce R, Zimmerman D, et al. Inhibition of ALK5 signaling induces physeal dysplasia in rats. Toxicologic Pathology. 2007; 35: 284-95.

Hall et al 2006

Hall AP, Westwood R, Wadsworth PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate. Toxicologic Pathology. 2006; 34: 131-47.

Horne and Guadagno 2003

Horne MM, Guadagno TM. A requirement for MAP Kinase in the assembly and maintenance of the mitotic spindle. J Cell Biology 2003; 161: 1021-28.

Lijinsky and Andrews 1983

Lijinsky W, Andrews AW. The superiority of hamster liver microsomal fraction for activating nitrosamines to mutagens in Salmonella typhimurium. Mutation Research. 1983; 111: 135-44.

Long et al 2010

Long GG, Goodman DF, Credille KM, Mann PC, Wilson JM, Cardy R. Hematopoietic proliferative lesions in the spleen of rasH2 transgenic mice treated with NMU. Toxicol Pathol. 2010; 38 (7): 1026-36.

Matsushita and Murakami 2012

Matsushita T, and Murakami S. The ERK MAPK Pathway in Bone and Cartilage Formation. In Protein Kinases, (Gabriela Da Silva Xavier, Eds.), pp.380-400. InTech, Rijeka, Croatia. 2012.

Mektovi® (Binimetinib) 2018

Nonclinical assessment report. Committee for Medicinal Product for Human Use (CHMP). EMA assessment report, 2018; EMA Procedure No. EMEA/H/C/004579/0000; EMA/CHMP/554701/2018. July 2018

Nambiar et al 2012

Nambiar PR, Turnquist SE, Morton D. Spontaneous tumor incidence in rasH2 mice: Review of internal data and published literature. Toxicol Pathol. 2012; 40: 614-23.

Newbern et al 2008

Newbern J, Zhong J, Wickamasinghe RS, Li X, Wu Y, Samuels I, et al. Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. Proc Natl Acad Sci. 2008; 105(44): 17115-20.

Osaki and Gama 2013

Osaki L, Gama P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation. Int. J. Mol. Sci. 2013; 14: 10143-61.

OECD 2004 432 evaluation criteria

Test No. 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Section 4. 2004 Nov.

Parada et al 2015

Parada C, Han D, Grimaldi A, Sarrion P, Park SS, Pelikan R, et al. Disruption of the ERK/MAPK pathway in neural crest cells as a potential cause of pierre robin sequence. Development 2015; 142: 3734-45.

Patyna et al 2008

Patyna S, Arrigoni G, Terron A, Kim T, Heward J, Vonderfecht S, et al. Nonclinical safety evaluation of sunitinib: A potent inhibitor of VEGF, PDGF, KIT, FLT3 and RET receptors. Toxicol Pathol. 2008; 36: 905-16.

Prival and Mithcell 1981

Prival MJ, Mitchell VD. Influence of microsomal and cytosolic fractions from rat, mouse, and hamster liver on the mutagenicity of dimethylnitrosamine in the Salmonella plate incorporation assay. Cancer Research. 1981; 41: 4361-67.

Ryan et al 1999

Ryan AM, Eppler DB, Hagler KE, Bruner RH, Thomford PJ, Hall RL, et al. Preclinical safety evaluation of rhuMAbVEGF, an antiangiogenic humanized monoclonal antibody. Toxicologic Pathology. 1999; 27: 78-86.

Stella and He 2008

Stella VJ, He Q. Cyclodextrins. Toxicol Pathol. 2008; 36: 30-42.

Trametinib (Mekinist!) 2013

Pharmacology Review section of the FDA Approval Package for trametinib NDA 20-4114. May 2013.

Tweats et al 2007

Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Morita T, et al. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests. II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. Mutation Research. 2007; 627: 92–105.

Wedge et al 2005

Wedge SR, Kendrew J, Hennequin LF, Valentine PJ, Barry ST, Brave SR, et al. AZD2171: A highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. Cancer Res. 2005; 65 (10): 4389-400.

Welsh and Corrie 2015

Welsh SJ, Corrie PG. Management of BRAF and MEK inhibitor toxicities in patients with metastatic melanoma Ther Adv Med Oncol 2015; 7(2): 122-36.

Yamada et al 1997

Yamada M, Espinosa-Aguirre J, Watanabe M, Matsui K, Sofuni T, Nohmi T. Targeted disruption of the gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538. Mutat Res. 1997; 375: 9-17.

Yujiri et al 2000

Yujiri T, Ware M, Widmann C, Oyer R, Russell D, Chan E, et al. MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97(13): 7272-77.

Zhang et al 2003

Zhang L, Wang W, Hayashi Y, Jester JV, Birk DE, Gao M, et al. A role for MEK kinase 1 in TGF-β/activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. The EMBO Journal. 2003; 22(17): 4443-54.

第 2 部　CTD の概要

一般名：セルメチニブ硫酸塩

版番号：[redacted]

2.6.7　毒性試験概要表
セルメチニブ硫酸塩

本資料に記載された情報に係る権利はアレクシオンファーマ合同会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次

標題ページ 1
目次 2
2.6.7.1　毒性試験：一覧表 3
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 9
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 11
2.6.7.3.1　Steady State Plasma Exposure (AUC) of Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Hyd-Sulfate 11
2.6.7.3.2　Steady State Plasma Exposure (AUC) of Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Free Base 13
2.6.7.3.3　Steady State Plasma Exposure (AUC) to N-desmethyl Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Hyd-Sulfate 14
2.6.7.3.4　Steady State Exposure (C_{max}) to Selumetinib Following Repeated Oral dose of Selumetinib Hyd-Sulfate 16
2.6.7.3.5　Steady State Plasma Exposure (C_{max}) to Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Free Base 18
2.6.7.3.6　Steady State Plasma Exposure (C_{max}) to N-desmethyl Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Hyd-Sulfate 19
2.6.7.4　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 21
2.6.7.5　単回投与毒性試験 23
2.6.7.6　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 25
2.6.7.7　反復投与毒性試験：重要な試験 27
2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験 72
2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験 83
2.6.7.10　がん原性試験 88
2.6.7.11　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 103
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 105
2.6.7.13　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 108
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 111
2.6.7.15　新生児を用いた試験 118
2.6.7.16　局所刺激性試験 119
2.6.7.17　その他の毒性試験 120
2.6.7.17.1　代謝物の毒性試験 120
2.6.7.17.2　不純物の毒性試験 126
2.6.7.17.3　光毒性試験 160

2.6.7.1　毒性試験：一覧表

Type of study	Species/ strain	Method of admini.	Duration of dosing	Doses mg/kg[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
Single-dose toxicity	Rat/ Crl:CD (SD)	PO	1 day	0, 30, 100, 300	Yes	[redacted], US	223-001	4.2.3.1.1
	Monkey/ Cynomolgus	PO	1 day	0, 10, 30, 100 (BID)	Yes	[redacted], US	1638-213	4.2.3.1.2
Repeat-dose toxicity	Rat/ SD	PO	14 days	0, 30, 100, 300	No	[redacted] Inc., US	RTOX/ ARY-1	4.2.3.2.4
	Rat/ Crl:CD (SD)	PO	29 days	0, 10, 30, 100	Yes	[redacted], US	223-002	4.2.3.2.5
	Monkey	PO	29 days	0, 3, 10, 30 (BID)	Yes	[redacted], USA	1639-213	4.2.3.2.6
	Mouse/ Alpk:ApfCD-1	PO	7 days	0, 50.4, 151 0, 241.7, 342.4 (BID)	Yes	AstraZeneca UK	0354DM	4.2.3.2.1
	Mouse/ Alpk:ApfCD-1	PO	1 month	0, 11.5, 34.5 103/68.5 (BID)	Yes	AstraZeneca UK	0355AM	4.2.3.2.2
	Mouse/ Crl:CD1	PO	26 weeks	0, 1, 5, 20 (BID)	Yes	[redacted], UK	VKS0211 (0428PM)	4.2.3.2.3
	Monkey/ Cynomolgus	PO	MTD 6-14 days then 28 days	MTD 0.92 (7d), 3 (6d) 7.5 (7d), 15 (14d) (BID) then 1.5, 5, 10/5, 10/7.5 (BID)	Yes	[redacted], UK	VKS/0153	4.2.3.2.7

Type of study	Species/ strain	Method of admini.	Duration of dosing	Doses mg/kg[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
	Monkey/ Cynomolgus	PO	6 months	0, 0.5, 1.5, 4 (BID)	Yes	[redacted] UK	VKS/0210	4.2.3.2.8
	Monkey/ Cynomolgus	PO	9 months	0, 0.5, 1.5, 2.5 (BID)	Yes	[redacted], UK	512415	4.2.3.2.9
Genotoxicity	*S. typhimurium* and *E. Coli*	In vitro	NA	2.5, 7.5, 25, 75, 200, 600, 1800 and 5000 µg/plate, or 50, 150, 500, 1500, 5000 µg/plate	Yes	[redacted] US	AA78NV.503 .BTL	4.2.3.3.1.1
	L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	In vitro	NA	25, 50, 75, 100, 150, 200, or 5, 15, 25, 50, 75, 100 µg/mL	Yes	[redacted] US	AA78NV.704 .BTL	4.2.3.3.1.2
	Mouse/ ICR	PO	Single dose	0, 50, 1000, 2000 mg/kg	Yes	[redacted] US	AA78NV.123 .BTL	4.2.3.3.2.1
	Mouse/ ALpk:APfCD-1	PO	Single dose	Phase 1 500, 1000, 2000 Phase 2 50, 160, 500 mg/kg	Yes	AstraZeneca, UK	0156QM	4.2.3.3.2.2
	L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	In vitro	NA	34,42, 52, 66, 82, 102, 128, 160 or 46, 92, 137, 183, 229 and 275, or 46-183 µg/mL	No	AstraZeneca, UK	0480QV	4.2.3.3.1.3
	Mouse/ ALpk:APfCD-1	PO	Two doses (24 hr apart)	0, 24, 121, 242 mg/kg	Yes	AstraZeneca, UK	0416QM	4.2.3.3.2.4

Type of study	Species/ strain	Method of admini.	Duration of dosing	Doses mg/kg[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
Carcinogenicity	Mouse/ CByB6F1 hybrid	PO	1 and 7 days	1 day 25, 50, 100, 200, 350 (BID) 7 days 0, 25, 75, 150 (BID)	No	[redacted], US	20062136 (0992DM)	4.2.3.4.2.1
	Mouse/ CByBB6F1 hybrid	PO	28 days	Male 0, 25, 37.5, 50 Female 0, 50, 75, 100	Yes	[redacted], US	20062137 (0993DM)	4.2.3.4.2.2
	Mouse/ CByC6F1/TG rasH2 Hemizygous	PO	6 months	0 (water), 0 (vehicle), 3, 8 and 25/15 (BID)	Yes	[redacted], US	20086561 (0994CM)	4.2.3.4.2.3
	Rat/ CRL:WI (Han)	PO	4 and 14 days	4 days M: 15, 50, 100 F:100, 150, 200 14 days M: 0, 7.5, 15, 25 F: 0, 25, 50, 100	No	[redacted], UK	528072 (3853DR)	4.2.3.4.1.1
	Rat/ CRL:WI (Han)	PO	Up to 29 days and 91/92 days	Up to 29 days 20 (M), 25 (F), 50 (F) 91/92 days 0 (M+F), 1 (M) 2.5 and 5 (M+F), 10 (M), 12.5 (F)	Yes	[redacted], UK	528088 (3854HR)	4.2.3.4.1.2
	Rat CRL:WI (Han)	PO	24 months	M: 0, 0.25, 0.8, 2.5 F: 0.1, 0.3, 1 mg/kg/day	Yes	[redacted], UK	501094 (3855CR)	4.2.3.4.1.3

Type of study	Species/ strain	Method of admini.	Duration of dosing	Doses mg/kg[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
Reproductive & development toxicity	Mouse/ Alpk:APfCD-1	PO	21 days (14 days before pairing, during pairing till GD6)	0, 2.5, 12.5, 37.5 (BID)	Yes	AstraZeneca, UK	0496GM	4.2.3.5.1.1
	Mouse/ Alpk:APfCD-1	PO	GD 6 to 16	0, 2.5, 12.5, 37.5 75 (BID)	Yes	AstraZeneca, UK	0430RM	4.2.3.5.2.1
	Mouse/ Alpk:APfCD-1	PO	GD 6 to 16	0, 2.5, 37.5 (BID)	Yes	AstraZeneca, UK	0480TM	4.2.3.5.2.2
	Mouse/ Crl/CD1	PO	GD6 - LD15 and GD16 - LD15	GD6 - LD 15 0, 10, 25, 50, 80, 150 GD16 - LD15 150	No	[redacted], [redacted], US	20082138 (1042WM)	4.2.3.5.3.1
	Mouse/Crl:CD-1	PO	GD6 - LD20	0, 0.5, 2, 7.5 (BID)	Yes	[redacted], [redacted], US	20082140	4.2.3.5.3.2
Studies in juvenile animals	Not applicable[b]							
Local tolerance	Not applicable[b]							
Other toxicity studies								
Metabolite (AZ12442942)	*S. typhimurium* and *E. Coli*	In vitro	NA	16-5000 µg/mL	Yes	AstraZeneca UK	0750BV	4.2.3.7.5.1
	L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	In vitro	NA	14-167 µg/mL (3 hr) 14-111 µg/mL (24 hr)	Yes	AstraZeneca UK	0751MV	4.2.3.7.5.2

Type of study	Species/ strain	Method of admini.	Duration of dosing	Doses mg/kg[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
不純物E*	*S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98,TA100) and *E.coli* (WP2 *uvrA*)	In vitro	NA	100-5000 µg/plate	Yes	[redacted] Ltd, UK	YV7434	4.2.3.7.6.1
	S. typhimurium (TA1535, TA1535NR, YG7127)	In vitro	NA	5-5000 µg/mL	Yes	[redacted] UK	8316541 (3527BV)	4.2.3.7.6.2
	L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	In vitro	NA	10.65-155 µg/mL	No	[redacted], UK	8314208 (3504QV)	4.2.3.7.6.3
	L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	In vitro	NA	9.63-375 µg/mL (3 hr), 150-350 µg/mL (24 hr)	Yes	[redacted] UK	8316542 (3526MV)	4.2.3.7.6.4
不純物F*	*S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E.coli* (WP2 *uvrA*)	In vitro	NA	100-5000 µg/plate	Yes	[redacted] Ltd, UK	YV7433	4.2.3.7.6.5
不純物I*	*S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E.coli* (WP2 *uvrA*)	In vitro	NA	100-5000 µg/plate	No	[redacted] Ltd, UK	YV7145	4.2.3.7.6.6
不純物G*	*S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E.coli* (WP2 *uvrA*)	In vitro	NA	5-5000 µg/plate	Yes	[redacted], UK	8466469	4.2.3.7.6.7
不純物H*	*S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E.coli* (WP2 *uvrA*)	In vitro	NA	0.5-5000 µg/plate	Yes	[redacted] Limited, UK	AME01418	4.2.3.7.6.8

Type of study	Species/ strain	Method of admini.	Duration of dosing	Doses mg/kg[a]	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location in CTD
Phototoxicity	Balb/c 3T3 fibroblast	In vitro	NA	0.316-1000 µg/mL	Yes	[redacted], [redacted] UK	88/459 (8998BV)	4.2.3.7.7.1

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

[b] Studies not required for the present indication.

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

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number
Single dose	Rat/SD	PO	30, 100, 300	Yes	223-001
Single dose	Monkey/Cynomolgus	PO	10, 30, 100	Yes	1638-213
7 Day dose range finding	Mouse/Alpk:ApfCD-1	PO	50, 151, 242, 342 (BID)	Yes	0354DM
1-Month toxicity	Mouse/Alpk:ApfCD-1	PO	11, 34, 103/69 (BID)	Yes	0355AM
26-Week toxicity	Mouse/CrlCD-1	PO	1, 5, 20 (BID)	Yes	VKS0211 (0428PM)
14-Day toxicity	Rat/SD	PO	30, 100, 300	No	RTOX/ARY-1
29-Day toxicity	Rat/SD	PO	10, 30, 100	Yes	223-002
MTD and 28-Day toxicity	Monkey/cynomolgus	PO	MTD 0.92 (7d), 3 (6d), 7.5 (7d), 15 (14d), (BID) 28 days 1.5, 5, 10/5, 10/7.5 (BID)	Yes	VKS/0153
29-Day toxicity	Monkey/cynomolgus	PO	3, 10, 30 (BID)	Yes	1639-213
6-Month toxicity	Monkey/cynomolgus	PO	0.5, 1.5, 4 (BID)	Yes	VKS/0210
9-Month toxicity	Monkey/cynomolgus	PO	0, 0.5, 1.5, 2.5 (BID)	Yes	512415
MTD and 7-day dose range finding	Mouse/CByB6F1	PO	MTD (1 day): 25, 50, 100, 200, 350 (BID) 7 day: 25, 75, 150 (BID)	No	20062136 (0992DM)
1-Month dose range finding	Mouse/CByB6F1	PO	M: 25, 37.5, 50 (BID) F: 50, 75, 100 (BID)	Yes	20062137 (0993DM)
6-Month carcinogenicity	Mouse/CByC6F1/ TG rasH2	PO	3, 8, 25/15 (BID)	Yes	20086561 (0994CM)
MTD and 14-day range-finding	Rat/Han Wistar	PO	MTD Phase M: 15, 50, 100 F: 100, 150, 200 DRF Phase M: 7.5, 15, 25 F: 25, 50, 100	No	528072 (3853DR)

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (mg/kg)	GLP Compliance	Study Number
3-Month toxicity	Rat/Han Wistar	PO	Up to 29 days M: 20 F: 25, 50 91/92 days M: 1, 2.5, 5, 10 F: 2.5, 5, 12.5	Yes	528088 (3854HR)
Range-finding embryofetal Development	Pregnant Mouse/Alpk:ApfCD-1	PO	2.5, 12.5, 37.5, 75 (BID)	No	0430RM
Range-finding pre- and postnatal	Mouse/Crl/CD-1	PO	GD6-LD15 10, 25, 50, 80, 150 GD16-LD15 150	No	20082138 (1042WM)
Developmental, peri- and postnatal reproduction	Mouse/Crl/CD-1	PO	0.5, 2, 7.5	Yes	20082140 (1043WM)

MTD　maximum tolerated dose; GD　gestation day; LD　lactation day

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

2.6.7.3.1　Steady State Plasma Exposure (AUC) of Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Hyd-Sulfate

Dose@ mg/kg/day, or (mg/kg BID)	$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)		$AUC_{(0-24)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey (male)	Monkey (female)	Human
0.1				3.57 (7.8)[h]			
0.25			6.91 (15.1)[h]				
0.3				13.18 (28.8)[h]			
0.8			22.2 (48.5)[h]				
1 (0.5x2)			27.1 (59.3)[i]	61.8 (135)[h]	0.861 (1.88)[k] 0.572 (1.25)[n]	0.948 (2.07)[k] 0.701 (1.53)[n]	
2 (1x2)	3.93 (8.58)[a]	5.08 (11.1)[a]					
2.5			62.7 (137)[i] 80 (175)[h]	86 (188)[i]			
3 (1.5x2)					2.65 (5.78)[l] 2.67 (5.82)[k] 2.19 (4.79)[n]	3.59 (7.83)[l] 2.45 (5.35)[k] 2.21 (4.82)[n]	
5 (2.5x2)		10.4 (22.6)[f]	131 (286)[i]	185 (404)[i]	3.21 (7.02)[n]	2.53 (5.53)[n]	2.009 (4.39)[m]
6 (3x2)	5.72 (12.5)[b]	10.85 (23.7)[b]					
7.5			207 (452)[j]				
8.0 (4x2)					9.8 (21.4)[k]	7.05 (15.4)[k]	
10 (5x2)	22.5 (49.1)[a]	25.8 (56.3)[a]	250 (546)[i]		4.95 (10.8)[l] 10.3 (22.4)[l]*	3.41 (7.45)[l] 11.4 (24.8)[l]*	
12.5				246 (537)[i]			
15 (7.5x2)			313 (684)[j]		12.4 (27.1)[l**]	10.1 (22.0)[l**]	
16 (8x2)	14.6 (31.9)[b]	38.4 (83.9)[b]					
23 (11.5x2)	51.8 (113)[c]	62.3 (136)[c]					
25 (12.5x2)		65.5 (143)[f]	341 (745)[j]	645 (1410)[j]			
30 (15x2)	46.7 (102)[b]	71.0 (155)[b]					
40 (20x2)	65.0 (142)[a]	98.9 (216)[a]					

Dose@ mg/kg/day, or (mg/kg BID)	$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)		$AUC_{(0-24)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL (µmol.h/L)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey (male)	Monkey (female)	Human
50 (25x2)	79.2 (173)[d] 71.9 (157)[e]	185 (403)[d]		843 (1840)[j]			
69 (34.5x2)	154 (337)[c]	218 (475)[c]					
75 (37.5x2)	136 (298)[e]	312 (681)[f]					
100 (50x2)	199 (435)[e] 271 (591)[g]	273 (596)[e] 258 (563)[g]		1231 (2690)[j]			
150 (75x2)	243 (530)[d]	495 (1080)[d] 344 (750)[e] 577 (1260)[f]					
200 (100x2)		402 (877)[e]					
206 (103x2)	360 (787)[c]	476 (1040)[c]					
302 (151x2)	847 (1850)[g]	806 (1760)[g]					

@　Selumetinib was administered BID in the mouse and monkey studies (doses shown as mg/kg BID and mg/kg/day) and was administered QD in the rat studies (doses shown as mg/kg/day).

[a]　KS0211/0428DM (6-month mouse toxicity). Week 26 for 2 and 10 mg/kg/day groups and 40 mg/kg/day females, Week 16 for 40 mg/kg/day males.

[b]　20086561/ 0994CM (6-month transgenic mouse assay). High dose was reduced from 25 mg/kg BID to 15 mg/kg BID from Week 19.

[c]　0355AM (1-month mouse tox study)

[d]　0992DM/20062136 (7-Day MTD non-transgenic mouse study), AUC_{0-t}

[e]　0993DM/20062137 (1-Month DRF non-transgenic mouse study), AUC_{0-t}

[f]　0430RM (mouse embryofetal development study)

[g]　0354DM (7-day mouse study)

[h]　3855 CR/501094 (rat carcinogenicity study)

[i]　528088/3854HR (3-month rat study)

[j]　3853DR/528072 (4- and 14-day rat study, DRF phase)

[k]　VKS0210/073130 (6-month monkey study)

[l]　VKS0153/063745 (MTD and 1-month monkey). * dose was reduced from Day 2 to 5 mg/kg BID, ** Dose reduced to 7.5 mg/kg BID from Day 16.

[m]　Selumetinib is intended for treatment of paediatric patients aged 3 years and above and as such the recommended dose is 25 mg/m^2 of body surface area (BSA) taken orally twice daily.　The gmean values for selumetinib hyd-sulfate capsule in paediatric patients on Day 1 in Phase 2 Sprint trial (2019) were 2.009 µg.h/mL ($AUC_{(0-12)}$) and　0.7307 µg/mL.(C_{max}) for selumetinib.　The BSA in the dosing scheme in patients ranges from 0.55 m^2 to ≥1.9 m^2 (up to a maximum single dose of 50 mg).

[n]　512415 (9-month monkey study)

MW of selumetinib is 457.7, 1 µmol/L is equivalent to 458 ng/mL

2.6.7.3.2 Steady State Plasma Exposure (AUC) of Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Free Base

Dose@ mg/kg/day, or (mg/kg BID)	$AUC_{(0-t)}$ µg.h/mL(µmol.h/L)		$AUC_{(0-24)}$ µg.h/mL(µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL(µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ (µg.h/mL)
	Mouse (male)[a]	Mouse (female)[a]	Rat (male)	Rat (female)	Monkey (male)	Monkey (female)	Human
6 (3x2)					3.076 (6.716)[c]	2.285 (4.989)[c]	No human data
10			55 (120)[b]	49 (107)[b]			
20 (10x2)					3.559 (7.770)[c]	4.007 (8.749)[c]	
30			134 (293)[b]	130 (284)[b]			
60 (30x2)					4.452 (9.721)[c]	4.226 (9.227)[c]	
100			199 (434)[b]	282 (616)[b]			

[a] No mouse study was conducted with selumetinib free base
[b] 223-002 (29-Day rat study)
[c] 1639-213 (29-Day monkey study)
MW of selumetinib is 457.7, 1 µmol/L is equivalent to 458 ng/mL

2.6.7.3.3　Steady State Plasma Exposure (AUC) to N-desmethyl Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Hyd-Sulfate

Dose@ mg/kg/day, or (mg/kg BID)	$AUC_{(0-12)}$ μg.h/mL(μmol.h/L)		$AUC_{(0-t)}$ μg.h/mL(μmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ μg.h/mL(μmol.h/L)		Plasma $AUC_{(0-12)}$ (μg.h/mL)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey# (male)	Monkey# (female)	Human
0.1				BLQ[h]			0.1691 (0.38)[k]
0.25/0.3			BLQ[h]	BLQ[h]			
0.8			ND[h]				
1			ND[i]	0.20 (0.453)[h]			
2 (1x2)	0.644 (1.45)[a]	0.537 (1.21)[a]					
2.5			ND[i] 0.036 (0.0805)[h]	0.235 (0.530)[i]			
5 (2.5x2)		0.471 (1.06)[e]	0.046 (0.104)[i]	0.372 (0.837)[i]			
6 (3x2)	1.41 (3.17)[c]	1.85 (4.17)[c]					
7.5			0.255 (0.574)[j]				
10 (5x2)	2.76 (6.22)[a]	2.08 (4.68)[a]	0.194 (0.437)[i]				
12.5				0.382 (0.860)[i]			
15 (7.5x2)			0.314 (0.707)[j]				
16 (8x2)	2.89 (6.52)[c]	3.75 (8.44)[c]					
23 (11.5x2)	3.21 (7.22)[b]	2.03 (4.58)[b]					
25 (12.5x2)		2.05 (4.62)[e]	0.340 (0.766)[j]	1.28 (2.89)[j]			
30 (15x2)	5.33 (12.0)[c]	5.18 (11.3)[c]					
40 (20x2)	7.95 (17.9)[a]	4.07 (9.17)[a]					
50 (25x2)	11.2 (25.2)[d] 10.8 (24.3)[f]	8.30 (18.7)[f] 8.13 (18.3)[d]		1.40 (3.15)[j]			
69 (34.5x2)	11.4 (25.7)[b]	4.75 (10.7)[b]					
75 (37.5x2)	15.7 (35.3)[d]	4.44 (10.0)[e]					
100 (50x2)	16.8 (37.9)[d] 7.15 (16.1)[g]	8.1 (18.3)[d] 3.64 (8.19)[g]		1.75 (3.94)[j]			

Dose@ mg/kg/day, or (mg/kg BID)	$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL(µmol.h/L)		$AUC_{(0-t)}$ µg.h/mL(µmol.h/L)		$AUC_{(0-12)}$ µg.h/mL(µmol.h/L)		Plasma $AUC_{(0-12)}$ (µg.h/mL)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey# (male)	Monkey# (female)	Human
150 (75x2)	16.3 (36.8)[f]	7.50 (16.9)[d] 5.3 (11.9)[e] 10.2 (22.9)[f]					
200 (100x2)		8.66 (19.5)[d]					
206 (103x2)	6.4 (14.5)[b]	8.17 (18.4)[b]					
302 (151 x2)	12.6 (28.4)[g]	7.06 (15.9)[g]					

[#] N-desmethyl selumetinib concentrations were low and not detectable or quantifiable in the monkey plasma samples.

[a] VKS0211/0428DM (6-month mouse toxicity). Week 26 for 2 and 10 mg/kg/day groups and 40 mg/kg/day females, Week 16 for 40 mg/kg/day males.

[b] 0355AM (1-Month mouse tox study)

[c] 0994CM/20086561 (6-month transgenic mouse assay)

[d] 0993DM/20062137 (1-month DRF non-transgenic mouse study), AUC_{0-t}

[e] 0430RM (mouse embryofetal development study)

[f] 0992DM/20062136 (7-Day MTD non-transgenic mouse study), AUC_{0-t}

[g] 0354DM (7-Day mouse study)

[h] 3855CR/501094 (24-month rat carcinogenicity study), AUC_{0-t}

[i] 3854HR/528088 (3-Month rat study), AUC_{0-t}, t=24 hr

[j] 3853DR/528072 (4 and 14-Day rat study)

[k] Selumetinib is intended for treatment of paediatric patients aged 3 years and above and as such the recommended dose is 25 mg/m^2 of body surface area (BSA) taken orally twice daily. The gmean values for selumetinib hyd-sulfate capsule in paediatric patients on Day 1 in Phase 2 Sprint trial (2019) were 0.1691 µg.h/mL ($AUC_{(0-12)}$) and 0.0537 µg/mL.(C_{max}) for the N-desmethyl selumetinib metabolite. The BSA in the dosing scheme in patients ranges from 0.55 m^2 to ≥1.9 m^2 (up to a maximum single dose of 50 mg).

MW of N-desmethyl selumetinib is 444, 1 µmol is equivalent to 444 ng/mL

BLQ: All concentrations below the limit of quantification. ND: not determined (less than 3 consecutive concentrations were quantified).

2.6.7.3.4　Steady State Exposure (C_{max}) to Selumetinib Following Repeated Oral dose of Selumetinib Hyd-Sulfate

Dose@ mg/kg/day QD or mg/kg BID	C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey (male)	Monkey (female)	Human
0.1				0.294 (0.643)[h]			0.7307 (1.60)[m]
0.25			0.436 (0.952)[h]				
0.3				1.06 (2.31)[h]			
0.8			1.88 (4.10)[h]				
1 (0.5 x2)			1.73 (3.78)[i]	4.32 (9.43)[h]	0.204 (0.446)[k] 0.193 (0.422)[n]	0.305 (0.665)[k] 0.194 (0.424)[n]	
2 (1x2)	0.976 (2.13)[a]	1.64 (3.58)[a]					
2.5			4.50 (9.82)[i], 6.55 (14.3)[h]	7.51 (16.4)[i]			
3 (1.5x2)					1.07 (2.34)[l] 0.779 (1.70)[k] 0.542 (1.18)[n]	1.54 (3.37)[l] 0.820 (1.79)[k] 0.436 (0.953)[n]	
5 (2.5x2)		2.17 (4.74)[f]	8.61 (18.8)[i]	15.1 (32.9)[i]	0.992 (2.17)[n]	0.625 (1.37)[n]	
6 (3x2)	1.83 (3.99)[b]	2.43 (5.30)[b]					
7.5			12.8 (28.0)[j]				
8.0 (4x2)					2.64 (5.76)[k]	3.04 (6.63)[k]	
10 (5x2)	6.14 (13.4)[a]	5.50 (12.0)[a]	14.9 (32.5)[i]		1.59 (3.48)[l] 3.14 (6.85)[l]	1.16 (2.54)[l] 5.50 (12.0)[l]	
12.5				20.1 (43.9)[i]			
15 (7.5x2)			22.3 (48.6)[j]		5.77 (12.6)[l]	2.57 (5.61)[l]	
16 (8x2)	4.9 (10.8)[b]	10.4 (22.7)[b]					
23 (11.5x2)	11.9 (25.9)[c]	16.8 (36.6)[c]					
25 (12.5x2)		17.5 (38.2)[f]	25.8 (56.4)[j]	48.1 (105)[j]			
30 (15x2)	12.0 (26.2)[b]	11.6 (25.4)[b]					
40 (20x2)	17.9 (39.1)[a]	27.8 (60.6)[a]					

Dose@ mg/kg/day QD or mg/kg BID	C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey (male)	Monkey (female)	Human
50 (25x2)	16.9 (37)[d] 17.4 (38.1)[e]	33.5 (73.1)[d]		54.5 (119)[j]			
69 (34.5x2)	21.4 (46.8)[c]	54.5 (119)[c]					
75 (37.5x2)	24.1 (52.6)[e]	37.2 (81.3)[f]					
100 (50x2)	41.7 (91.1)[e] 55.0 (120)[g]	36.8 (80.3)[e] 63.2 (138)[g]		71 (155)[j]			
150 (75x2)	41.7 (91.0)[d]	73.3 (160)[d] 46.7 (102)[e] 79.2 (173)[f]					
200 (100x2)		49.5 (108)[e]					
206 (103x2)	59.5 (130)[c]	79.2 (173)[c]					
302 (151x2)	109 (237)[g]	104 (228)[g]					

@　Selumetinib was administered BID in the mouse and monkey studies (doses shown as mg/kg BID and mg/kg/day) and was administered QD in the rat studies (doses shown as mg/kg/day).

[a]　VKS0211/0428DM (6-month mouse toxicity). Week 26 for 2 and 10 mg/kg/day groups and 40 mg/kg/day females, Week 16 for 40 mg/kg/day males.

[b]　20086561/ 0994CM (6-month transgenic mouse assay). High dose was reduced from 25 mg/kg BID to 15 mg/kg BID from Week 19.

[c]　0355AM (1-month mouse tox study)

[d]　0992DM/20062136 (7-Day MTD non-transgenic mouse study)

[e]　0993DM/20062137 (1-Month DRF non-transgenic mouse study)

[f]　0430RM (mouse embryofetal development study)

[g]　0354DM (7-day mouse study)

[h]　3855CR/501094 (rat carcinogenicity study)

[i]　528088/3854HR (3-month rat study)

[j]　3853DR/528072 (4- and 14-day rat study, DRF phase)

[k]　VKS0210/073130 (6-month monkey study)

[l]　VKS0153/063745 (MTD and 1-month monkey). * dose was reduced from Day 2 to 5 mg/kg BID, ** Dose reduced to 7.5 mg/kg BID from Day 16.

[m]　Selumetinib is intended for treatment of paediatric patients aged 3 years and above and as such the recommended dose is 25 mg/m^2 of body surface area (BSA) taken orally twice daily.　The gmean values for selumetinib hyd-sulfate capsule in paediatric patients on Day 1 in Phase 2 Sprint trial (2019) were 2.009 µg.h/mL ($AUC_{(0\text{-}12)}$) and 0.7307 µg/mL.(C_{max}) for selumetinib.　The BSA in the dosing scheme in patients ranges from 0.55 m^2 to ≥1.9 m^2 (up to a maximum single dose of 50 mg).

[n]　512415 (9-month monkey study)

MW of selumetinib is 457.7, 1 µmol/L is equivalent to 458 ng/mL

2.6.7.3.5 Steady State Plasma Exposure (C_{max}) to Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Free Base

Dose@ mg/kg/day QD or mg/kg BID	C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)
	Mouse (male)[a]	Mouse (female)[a]	Rat (male)	Rat (female)	Monkey (male)	Monkey (female)	Human
6 (3x2)					0.495 (1.08)[c]	0.374 (0.817)[c]	No human data
10			8.3 (18.1)[b]	7.8 (17.0)[b]			
20 (10x2)					0.568 (1.24)[c]	0.604 (1.319)[c]	
30			21.9 (47.8)[b]	18.9 (41.3)[b]			
60 (30x2)					0.552 (1.205)[c]	0.689 (1.504)[c]	
100			31.4 (68.6)[b]	44.3 (96.7)[b]			

[a] No mouse study was conducted with selumetinib free base
[b] 223-002 (29-day Rat)
[c] 1639-213 (29-Day Monkey)

2.6.7.3.6　Steady State Plasma Exposure (C_{max}) to N-desmethyl Selumetinib Following Repeated Oral Dose of Selumetinib Hyd-Sulfate

Dose@ mg/kg/day QD or mg/kg BID	C_{max} µg./mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey# (male)	Monkey# (female)	Human
0.25/0.3			BLQ[h]	BLQ[h]			0.0537 (0.12)[k]
0.8			0.0009 (0.00204)[h]				
1			0.0009 (0.00213)[i]	0.0121 (0.0273)[h]			
2 (1x2)	0.0928 (0.209)[a]	0.123 (0.278)[a]					
2.5			0.0055 (0.0123)[h] 0.0014 (0.00306)[i]	0.0206 (0.0463)[i]			
5 (2.5x2)		0.0741 (0.167)[e]	0.0064 (0.0145)[i]	0.0226 (0.0510)[i]			
6 (3x2)	0.412 (0.929)[c]	0.316 (0.711)[c]					
7.5			0.0149 (0.0335)[j]				
10 (5x2)	0.524 (1.18)[a]	2.08 (4.68)[a]	0.0123 (0.0276)[i]				
12.5				0.0265 (0.0597)[i]			
15			0.0185 (0.0417)[j]				
16 (8x2)	1.04 (2.35)[c]	0.74 (1.67)[c]					
23 (11.5x2)	0.39 (0.880)[b]	0.519 (1.17)[b]					
25 (12.5x2)		0.375 (0.845)[e]	0.0186 (0.0419)[j]	0.079 (0.179)[j]			
30 (15x2)	1.59 (3.59)[c]	0.87 (1.97)[c]					
40 (20x2)	1.43 (3.23)[a]	0.706 (1.59)[a]					
50 (25x2)	1.82 (4.09)[d] 1.80 (4.06)[f]	1.39 (3.14)[f]		0.092 (0.207)[j]			
69 (34.5x2)	1.82 (4.11)[b]	1.15 (2.59)[b]					
75 (37.5x2)	2.16 (4.87)[d]	0.546 (1.23)[e]					
100 (50x2)	3.09 (6.97)[d] 1.25 (2.82)[g]	1.15 (2.60)[d] 0.737 (1.66)[g]		0.110 (0.247)[j]			
150 (75x2)	2.31 (5.21)[f]	0.78 (1.75)[d] 0.675 (1.52)[e] 2.02 (4.56)[f]					

Dose@ mg/kg/day QD or mg/kg BID	C_{max} µg./mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)		C_{max} µg/mL (µmol/L)
	Mouse (male)	Mouse (female)	Rat (male)	Rat (female)	Monkey# (male)	Monkey# (female)	Human
200 (100x2)		0.91 (2.06)[d]					
206 (103x2)	1.11 (2.49)[b]	0.85 (1.92)[b]					
302 (15 x2)	1.33 (3.00)[g]	0.777 (1.75)[g]					

[#] N-desmethyl selumetinib concentrations were low and not detectable or quantifiable in the monkey plasma samples.

[a] VKS0211/0428DM (6-month mouse toxicity). Week 26 for 2 and 10 mg/kg/day groups and 40 mg/kg/day females, Week 16 for 40 mg/kg/day males.

[b] 0355AM (1-Month mouse tox study)

[c] 0994CM/20086561 (6-month transgenic mouse assay)

[d] 0993DM/20062137 (1-month DRF non-transgenic mouse study)

[e] 0430RM (mouse EFD study)

[f] 0992DM/20062136 (7-Day MTD non-transgenic mouse study).

[g] 0354DM (7-Day mouse study)

[h] 3855 CR/501094 (24-month rat carcinogenicity study)

[i] 3854HR/528088 (3-Month rat study). Week 13 data shown.

[j] 3853DR/528072 (4 and 14-Day rat study, DRF phase)

[k] Selumetinib is intended for treatment of paediatric patients aged 3 years and above and as such the recommended dose is 25 mg/m^2 of body surface area (BSA) taken orally twice daily. The gmean values for selumetinib hyd-sulfate capsule in paediatric patients on Day 1 in Phase 2 Sprint trial (2019) were 0.1691 µg.h/mL ($AUC_{(0-12)}$) and 0.0537 µg/mL.(C_{max}) for the N-desmethyl selumetinib metabolite. The BSA in the dosing scheme in patients ranges from 0.55 m^2 to ≥1.9 m^2 (up to a maximum single dose of 50 mg).

MW of N-desmethyl selumetinib is 444, 1 µmol is equivalent to 444 ng/mL

BLQ　All concentrations below the limit of quantification

2.6.7.4　　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

Batch number	Purity (% w/w)	Specified impurities (% w/w)				Study number	Type of study
		不純物B*	不純物D*	不純物A*	不純物C*		
Proposed specifications	[redacted]% to [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%		
Selumetinib Hyd-sulfate:							
[redacted]	98.9	0.21	<0.05	0.25	0.06	0354DM 0355AM VKS/0153 0416QM 0430RM 88/459	7 Day Mouse – Oral 1 Month Mouse – Oral MTD and 1 Month Monkey – Oral Mouse Micronucleus – Oral Mouse Dose Range Finding Embryofetal Development – Oral Phototoxicity Assay – In Vitro
[redacted]	98.7	0.29	0.33	0.24	<0.05	20062136 528072 528088	1- and 7-Day Mouse – Oral 4 and 14-Day Rat – Oral 3-Month Rat – Oral
[redacted]	98.4 - 98.64	0.52	0.33	0.31	<0.05	VKS/0211 VKS/0210 0480TM 0496GM	6 Month Mouse – Oral 6 Month Monkey – Oral Mouse Embryofetal Development – Oral Mouse Fertility and Early Embryonic Development Study – Oral
[redacted]	99.2 - 99.4	0.33	0.09	0.08	<0.05	20062137 20086561 501094 20082140	1 Month Dose Range Finding Mouse – Oral 6-Month Carcinogenicity Mouse – Oral 24-Month Carcinogenicity Rat – Oral Developmental, Peri- and Postnatal Reproduction Mouse – Oral
[redacted]	99.3	0.31	<0.05	0.11	<0.05	512415	9 Month Monkey – Oral

Batch number	Purity (% w/w)	Specified impurities (% w/w)				Study number	Type of study
		不純物B*	不純物D*	不純物A*	不純物C*		
Proposed specifications	[redacted]% to [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%	NMT [redacted]%		
Selumetinib free base							
[redacted]	98.13	NA	NA	NA	NA	223-001 1638-213 223-002 1639-213 AA78NV.503.BTL AA78NV.704.BTL AA78NV.123.BTL 0156QM	Single Dose Rat – Oral Single Dose Monkey – Oral 29 Day Rat – Oral 29 Day Primate – Oral Bacterial Mutation Assay – In Vitro Mouse Lymphoma Assay – In Vitro Mouse Micronucleus– Oral Mouse Micronucleus– Oral
[redacted]	98	NA	NA	NA	NA	0156QM 0480QV	Mouse Micronucleus– Oral Mouse Lymphoma Assay and Micronucleus Assay– In Vitro

Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886).

NA: not applicable; Selumetinib free base form was replaced with selumetinib hyd-sulfate in the nonclinical and clinical studies. The impurity profile and specifications set for selumetinib hyd-sulfate do not apply to the free base form.

% w/w: % weight/weight.

MTD: maximum tolerated dose.

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Crl:CD® (SD) IGS BR	Oral (gavage) / solution in Captisol®	0 30 100 300	5M + 5F	300	Not determined	Rats tolerated single oral doses of selumetinib (formerly referred to as ARRY-142886) up to 300 mg/kg without adverse effects. Based on the absence of toxicity at any dosage level, the no observed adverse effect level (NOAEL) on this study was 300 mg/kg and the maximum tolerated single oral dose (oral MTD) of selumetinib in rats is ≥ 300 mg/kg. At 300 mg/kg, C_{max} was 27 and 48 µg/mL for M/F, and AUC_{all} was 588 and 970 µg•h/mL for M/F respectively.	[redacted], USA	223-001
Monkey / Cynomolgus	Oral (gavage) / 30% solution of Captisol®	0 10 30 100 (BID)[a]	3M + 3F	100 BID	Not determined	All the doses were well tolerated. Slightly increased serum enzyme values (ALT, AST and LDH) in high dose animals (200 mg/kg/day) were transient and of no toxicological significance. Also, of no toxicological significance, were the gross and microscopic changes in the spleen (minimal lymphoid hyperplasia and follicular hypertrophy) of the high dose animals. The 30 mg/kg dose was the no observed effect level (NOEL). Toxicokinetic analyses revealed dose-limiting oral absorption over the 10 to 100	[redacted], USA	1638-213

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	Observed Maximum Non-Lethal Dose (mg/kg)	Approximate Lethal Dose (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
						mg/kg/dose range with a maximum mean $AUC_{0\text{-}12hr}$ of 13.2 µg-hr/mL and C_{max} of 2.6 µg/mL. The average T_{max} was between 1.8 to 3.5 hours after dosing and there were no sex-related differences in exposure. The biomarker data suggest that following a single dose of selumetinib, the maximum inhibition of pERK occurs at a plasma concentration of 1 µg/mL, below which there was a direct correlation between concentration and inhibition of TPA-induced pERK. At plasma concentrations above the threshold of 1 µg/mL, increased selumetinib concentrations did not increase pERK inhibition.		

M male

F female.

All single dose studies were conducted to GLP.

[a] Selumetinib was administered twice daily, approximately 12 hours between doses

ALT alanine aminotransferase; AST aspartate aminotransferase; BID twice daily dosing; LDH lactate dehydrogenase; MTD maximum tolerated dose; NOAEL no observed adverse effect level; TPA-induced pERK 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced phosphorylated extracellular signal-regulated kinase

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / Sprague Dawley	Oral (gavage) / (1% CMC)	14 days	0 30 100 300	5M + 5F	Not stated	Males at 300 mg/kg/day had increases in AST, ALT, phosphorus and decreases in total protein, albumin and globulin. Females had increases in AST (100 mg/kg/day), phosphorus (30 and 100 mg/kg/day) and decreases in total protein (100 mg/kg/day), albumin (100 and 300 mg/kg/day) and globulin (30 mg/kg/day). All male dose groups had decreased lymphocyte but increased neutrophil counts. Slight but significant decreased thymic cortical diameter measurements were evident in both males and females given 300 mg/kg/day and in males treated with 100 mg/kg/day. This finding, in conjunction with the apparent stress leukogram (lymphopenia, neutrophilic leukocytosis), suggests that animals in the high dose groups and to a lesser extent mid dose, had an increased corticosterone levels possible as a result of stress associated with administration of Selumetinib.	[redacted] Inc., USA	RTOX/ARY-1

RTOX/ARY-1 study was non-GLP compliant.

M: male, F: female. CMC: carboxymethylcellulose; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase

[a] No Observed Adverse Effect Level.

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Mouse / Alpk:APfCD-1	Oral (gavage) / (solution in 30% w/v aqueous Captisol®)	7 days	0 100.7 302.1 0 483.32 684.7 Doses stated are daily total. Mice were dosed twice daily, 12 hours apart	4M + 4F	100.7	Oral administration of Selumetinib to mice for 7 days at dose levels of 483.32 and 684.7 mg/kg/day was not tolerated and resulted in the early deaths of all animals dosed at these dose levels. Oral administration of Selumetinib to mice for 7 days at a dose level of 302.1 mg/kg/day was also associated with the early death of one male mouse. The principal cause of death in all these mice was intestinal enteropathy and mineralization, glandular epithelial cell degeneration and submucosal oedema in the stomach. In surviving animals dosed at 302.1 mg/kg/day, adverse histopathological changes, and associated haematology and plasma chemistry changes, were seen in the pancreas and spleen. Oral administration of Selumetinib to mice for 7 days at a dose level of 100.7 mg/kg/day was well tolerated.	AstraZeneca, UK	0354DM

Study 0354DM contains a GLP statement.

M　male

F　female

[a]　No Observed Adverse Effect Level

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Report Title: Twenty-Nine Day Repeated Dose Oral Gavage Toxicity Study of ARRY-142886 in Sprague-Dawley Rats

Test Article: Selumetinib free base

Species / Strain: Rat / Crl:CD® (SD) IGS BR

Duration of dosing: 29 days

Study number: 223-002

Initial age: Approximately 8 weeks old at start of dosing

Duration of post-dose: 30 days

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted], USA

Special features: None.

Vehicle / Formulation: Solution in 30% Captisol®

No observed adverse-effect level: Females 10 mg/kg/day. Males not established.

Conclusion: Rats tolerated oral doses of selumetinib (formerly referred to as ARRY-142866) up to 100 mg/kg/day for 29 days, and no selumetinib related deaths occurred. Selumetinib related effects were soft stool ≥10 mg/kg/day in males and at ≥30 mg/kg/day in females.

Slight subclinical changes in several clinical chemistry parameters, specifically increased phosphorus concentration at ≥10 mg/kg/day in both sexes on study days 7, 14 and 30; increased urea nitrogen concentration in males at ≥10 mg/kg/day on study day 7 and ≥ 30 mg/kg/day on study days 14 and 30, and in females at ≥ 30 mg/kg/day on study days 7 and 14 and at 100 mg/kg/day on study day 30; decreased albumin concentration at ≥30 mg/kg/day in both sexes on study days 7, 14 and 30; and increased globulin concentration in males at ≥30 mg/kg/day on study day 14 and ≥10 mg/kg/day on study day 30, and in females at 100 mg/kg/day on study days 14 and 30. Increased incidence and magnitude of mineralization of the gastric mucosa at all dose levels in males and at ≥30 mg/kg/day in females. Gastric mucosal mineralization was essentially unchanged at the end of the 30-day recovery period.

Daily Dose (mg/kg/day)	0		10		30		100	
Number of Animals								
Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Recovery	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	NA	NA	M: 5	F: 5
Toxicokinetics [a]:								
$AUC_{(0-24)}$ (h-μg/mL)			55	49	134	130	199	282
C_{max} (μg/mL)			8.3	7.8	21.9	18.9	31.4	44.3
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund[b]	0	1	0	1	0	1	2	0
Body Weight Gain (%)[c]	(g)							
Days 1 to 8	37.7	7.1	+10.1	+25.4	+0.5	-4.2	-5.8	-104*
Days 1 to 29	149.5	45.5	-7.9	+6.2	-3.4	+12.5	+2.7	+16.7
Clinical Observations[d]	-	-	++	-	++	+	++	++
Serum Chemistry (Day 30)								
Albumin (g/dL)	4.2	4.7	4.1	4.6	3.9**	4.2**	4.0	3.9**
Globulin (g/dL)	1.8	2.0	2.1*	2.2	2.1*	2.0	2.1*	2.7**
Phosphorus (mg/dL)	10.8	9.3	11.0	10.9*	12.5**	12.3**	12.0*	11.6**
Urea nitrogen (mg/dL)	13	16	14	18	16**	19	17**	22**
Histopathology Early Deaths + Day 30 sacrifice								
Number examined	10	10	10	10	10	10	10	10
Stomach, Glandular Mucosa Mineralisation	0	0	4	0	10	5	10	10
Tunica Muscularis Mineralisation	0	0	0	0	0	0	1	0

Daily Dose (mg/kg/day)	0		10		30		100	
Number of Animals								
Main	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Recovery	M: 5	F: 5	M: 5	F: 5	NA	NA	M: 5	F: 5
Recovery Group								
Number Evaluated	5	5	5	5			5	5
Noteworthy findings								
Histopathology								
Stomach, Glandular								
Mucosa Mineralisation	1	1	2	0	NA	NA	5	2

M male

F female

NA no animal available for evaluation

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate.

* $p<0.05$; ** $p<0.01$. Significant intergroup differences were evaluated by use of ANOVA, with a post hoc Dunnett's Test.

[a] Day 29 mean data shown. Additional satellite animals were used for the toxicokinetic assessment (up to 4/sex/group/time point).

[b] Five rats died or were euthanised in moribund condition during this study, but none of the deaths were attributed to selumetinib. The control female died due to haemorrhagic cystitis. The remaining 4 rats died due to dosing accidents.

[c] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown.

[d] The only clinical sign, effect or toxicity was soft stool.

Report Title: A 29-Day Repeat-Dose Toxicity Study of ARRY-142886 Administered by Oral Gavage to Cynomolgus Monkeys with a 4-Week Recovery Period

Test Article: Selumetinib free base

Species / Strain:
Monkey / Cynomolgus

Duration of dosing: 29 days (BID)

Study number: 1639-213

Initial age:
2.7 to 3.2 years for males
2.3 to 6.0 years for females

Duration of post-dose: 4 weeks

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]th [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage by nasogastric or orogastric intubation)

Testing Facility: [redacted], USA

Special features: None.

Vehicle / Formulation: Suspension in 30% solution of Captisol®

No observed adverse-effect level: Not stated.

Conclusion: Twice-daily nasogastric or orogastric administration of selumetinib (formerly referred to as ARRY-142886) in Captisol® to male and female monkeys at doses ranging from 6 to 60 mg/kg/day (3 to 30 mg/kg/dose) was associated with gastrointestinal disturbances resulting in persistent watery-liquid stools across the dose range. Changes secondary to the gastrointestinal disturbances in all test article treated groups included dehydration, serum chemistry abnormalities, renal tubular microscopic changes (2 of 10 high dose animals) and moribundity in 1 of 10 high dose animals. In individual low and mid-dose animals (3 of 20 animals), moribundity and death occurred from procedural-related esophageal perforation. The extent to which Selumetinib contributed, either directly or indirectly, to esophageal erosion and gastrointestinal intolerability is unclear. However, the absence of mortality or severe dehydration in vehicle treated animals suggest that, under the conditions of this study, repeated twice daily administration of selumetinib by nasogastric or orogastric gavage in Captisol® vehicle was not well tolerated in individual animals in the dose range tested. The absence of findings in the recovery animals confirms that treatment related effects on the gastrointestinal tract, on clinical pathology and histopathology were reversible. Based on toxicokinetic analyses, selumetinib demonstrated dose-limited absorption with a maximum mean $AUC_{(0\text{-}12hr)}$ of 6.7 µg-hr/mL and C_{max} of 1.41 µg/mL in cynomolgus monkeys. The biomarker analyses data suggest that when dosed chronically with selumetinib, the maximum inhibition of TPA-induced pERK occurred around plasma concentrations of 0.3 µg/mL selumetinib. At selumetinib plasma concentrations under this threshold, there was a direct correlation between selumetinib plasma concentrations and inhibition of TPA-induced pERK.

Daily Dose (mg/kg/day)	0		6		20		60	
Number of Animals								
Main	M: 3	F: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3
Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2
Toxicokinetics [a]:								
$AUC_{(0\text{-}12hr)}$ (μg-hr/mL)			2.6		3.8		4.3	
C_{max} (μg/mL)			0.43		0.59		0.63	
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund[b]	0	0	1	0	2	0	1	0
Body Weight Gain (%)[c]		(kg)						
Day 1 - 28	0.1	0.14	-50	-57.1	0	-14.3	-220	-114
Clinical Observations[d]	++	++	++	++	++	++	++	++
Serum Chemistry (Day 29)								
Albumin (g/dL)	4.8	4.8	4.8	4.4	4.0	4.2	4.1	3.9
Blood urea nitrogen (mg/dL)	20	19	20	21	19	19	29	20
Chloride (mEq/L)	108	110	110	111	110	110	106	106
Creatinine (mg/dL)	0.8	0.8	0.8	0.7	0.9	0.7	1.1	0.8
Globulin (g/dL)	2.0	2.0	2.3	2.6	2.6	2.7	2.9	2.6
Potassium (mEq/L)	5.2	4.7	5.3	5.1	5.0	4.6	4.8	4.8
Histopathology								
Number examined	3	3	2	3	2	3	2	3
Kidney								
Infiltrate, mononuclear cell	1	3	0	1	0	1	1	2
Mineralization	0	1	0	0	1	0	0	0
Tubular epithelial swelling, moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Tubular vacuolation, mild	0	1	0	0	0	0	0	1
Chronic inflammation	0	0	0	0	0	1	0	0

Daily Dose (mg/kg/day)	0		6		20		60	
Number of Animals								
Main	M: 3	F: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3	M: 3
Recovery	M: 2	F: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2	M: 2
Oesophagus								
Infiltrate, mononuclear cell	1	1	1	2	0	0	1	1
Inflammation, chronic active	0	0	1	0	1	0	0	0
Fibrosis	0	0	0	0	1	0	0	0
Post-dose Evaluation								
Number Evaluated	2	2	2	2	1	2	2	2
Noteworthy findings	-	-	-	-	-	-	-	-

M male, F female.

- No noteworthy findings; ++ Moderate

[a] Day 29 mean data shown. All samples from control group animals were below limit of quantification (0.0100 µg/mL), apart from one Day 1 sample which was <0.0200 µg/mL.

[b] The moribund condition of the two-mid dose animals and death of one low dose animal on Days 13, 27 and 20 respectively, appeared to be due to dosing procedure–related injuries. The high dose animal was killed moribund on Day 29, due to watery-liquid stool from Days 3 to 29, dehydrated, weak and bloody mucoid water stool on Day 29.

[c] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown.

[d] Watery-liquid stools in all dose groups, including the controls. Secondary changes include dehydration (decreased skin turgor). The dose volume (20 mL/kg) was decreased (to 0.5 mL/kg) and dose suspension concentration was increased on Day 14 to help alleviate the condition of watery-liquid stool likely attributable to the volume of the vehicle.

Report Title: AZD6244: One Month Toxicity Study with Assessment of Recovery in the Mouse

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain: Mouse / Alpk: APfCD-1

Duration of dosing: Twice daily for one month

Study number: 0355AM

Initial age: Approximately 7 to 8 weeks old

Duration of post-dose: 4 weeks

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted]th [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: AstraZeneca, UK

Special features: None.

Vehicle / Formulation: solution in 30% Captisol®

No observed adverse-effect level: Not established.

Conclusion: Oral administration of selumetinib (formerly referred to as AZD6244) to mice for a month at a high dose level of 206 mg/kg/day was not tolerated and resulted in the early deaths of four animals. As a result, the high dose was reduced to 137 mg/kg/day from Day 12, and all remaining animals at this dose survived to scheduled termination. Oral administration of selumetinib to mice for a month at a dose level of 137 mg/kg/day was also associated with the early death of one male mouse. The cause of death in these animals was associated primarily with gastro-intestinal pathology and haematopoietic atrophy.

In surviving animals, dosed at 137 mg/kg/day, adverse histopathological findings were seen in the intestines, stomach, haematopoietic system (spleen, bone marrow and mesenteric lymph nodes), liver and gall bladder, with evidence of reversibility at the end of a 1-month recovery period. These were associated with correlative haematology and plasma chemistry changes. Mineralisation was seen in a variety of tissues, including the cornea (with associated ophthalmoscopy findings of corneal opacity), kidney, liver, myocardium, skeletal muscle and stomach, and was associated with increases in plasma calcium and/or phosphate. Tissue mineralization was still present in some tissues following a 1-month recovery period, although with a reduced incidence. In surviving animals dosed at 69 mg/kg/day, histopathological changes were similar to those in the high dose group but with a reduction in incidence and severity.

Oral administration of selumetinib to mice for a month at a dose level of 23 mg/kg/day was well tolerated, with histopathological changes seen in the stomach and mesenteric lymph node of individual animals. Mineralisation was present in the cornea (with associated ophthalmoscopy findings) and liver.

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Toxicokinetics[c]:								
Selumetinib:								
$AUC_{(0-12)}$ (µmol/h/L)			113	136	337	475	787	1040
$AUC_{(0-24)}$ (µmol/h/L)			257	324	562	1040	1960	2500
C_{max} (µmol/L)			25.9	36.6	46.8	119	130	173
N-desmethyl selumetinib: (metabolite)								
$AUC_{(0-12)}$ (µmol/h/L)			7.22	4.58	25.7	10.7	14.5	18.4
$AUC_{(0-24)}$ (µmol/h/L)			15.0	10.0	39.6	19.9	28.9	37.5
C_{max} (µmol/L)			0.880	1.17	4.11	2.59	2.49	1.92
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund[d]	0	0	0	0	1	0	3	1
Body Weight Gain (%)[e]	(g)							
Day 1 - 29	2.0	2.0	+35.0	-40.0	+16.6	-30.0	+18.9	-45.0
Clinical Observations[f]	-	-	+	-	+	+	++	+
Ophthalmoscopy[g]								
Opacity in center of cornea (No mice/eyes affected)	0 (0)	2/(2)	5 (7)	1 (1)	2 (3)	3 (4)	8 (15)	6 (11)
Haematology								
Neutrophil ($x10^9$/L)	0.66	0.41	0.72	0.54	1.30	0.63	2.64	1.09***
Red cell distribution width (%)	12.5	12.9	12.4	12.5	13.4*	12.8	17.0***	14.1
White blood cell count ($x10^9$/L)	4.03	2.95	3.61	2.27	5.31	2.64	6.26	3.70
Serum Chemistry								
Albumin (g/L)	33	34	33	34	31	35	29	31***
Albumin/globulin ratio	1.38	1.61	1.35	1.51***	1.32	1.56*	1.03***	1.39***
ALP (IU/L)	126	149	108	204***	105	222***	97	242***
Calcium (mmol/L)	2.72	2.61	2.80	2.58	2.70	2.59	2.78	2.75**
Phosphate (mmol/L)	2.91	2.64	3.13	2.57	3.18	3.04	3.27	3.23*

Daily Dose (mg/kg/day)[a]		0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals	Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Total Protein	(g/L)	57	56	58	57	55	57	57	53*
Triglycerides	(mmol/L)	1.88	2.33	1.75	1.67**	1.81	1.57***	1.58	1.32***
Organ Weights (%)[e]									
Spleen	Absolute	0.102 g	0.116 g	-2.0	-9.5	+20.6	+0.9	+52.0***	+5.2
	Relative	0.228 %	0.314 %	0	-4.5	+21.5**	+2.9	+57.0***	+8.9
Kidney	Absolute	0.637 g	0.398 g	+6.0	-3.5	+12.6*	+2.5	+16.8**	+9.5
	Relative	1.430	1.079	+8.3**	+3.4	+12.0***	+4.0	+19.8***	+12.8***
Heart	Absolute	0.260 g	0.210 g	-8.5	-6.2	-12.4	-10*	-7.7	-18.6***
	Relative	0.583	0.569	-6.5	-0.9	-12.5	-8.8*	-6.0	-16.1***
Thymus	Absolute	0.063 g	-	-11.2	-	-4.8	-	-20.6*	-
	Relative	0.141	-	-10	-	-3.5	-	-19.9*	-
Gross Pathology Number examined		10	10	10	10	10	10	10	10
Heart Discolouration		0	0	0	0	1	0	1	0
Intestine Dilation/distension		0	0	0	0	0	0	2	1
Liver Consistency change – firm		0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph node - mesenteric Enlarged		0	0	0	1	0	0	3	1
Stomach Thickened, nonglandular area		0	0	0	0	0	0	1	0
Thymus Small		0	0	0	0	0	0	2	0

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Histopathology								
Number examined (unless otherwise stated)	10	10	10	10	10	10	10	10
Aorta		(9)						
Focal mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Bone and marrow - sternum								
Myelofibrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Bone marrow atrophy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0
Increased bone marrow granulocytes								
Minimal	0	0	0	0	2	1	1	6
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0
Eyes								
Focal corneal epithelial degeneration								
Mild	0	0	1	0	0	1	0	1
Focal corneal mineralisation								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0
Mild	0	0	0	0	0	1	0	2
Femoro-tibial joint								
Myelofibrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	2	1
Bone marrow atrophy								

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	2
Mild	0	0	0	0	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Increased bone marrow granulocytes								
Minimal	0	1	0	0	5	0	2	6
Mild	0	0	0	0	0	1	2	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	0
Gall bladder				(9)	(9)		(8)	
Diffuse mucosal acute inflammatory cell infiltration								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Heart								
Myocardial myodegeneration								
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	0
Myocardial mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	2	0	2	1
Mild	0	0	0	0	1	0	2	0
Focal epicardial mineralisation								
Mild	0	0	0	0	1	0	0	0
Intestine - caecum								
Enteropathy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	4
Mild	0	0	0	0	0	0	3	2
Focal ulceration and inflammation								
Severe	0	0	0	0	0	0	1	0
Mucosal hypertrophy								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Intestine - colon								
Enteropathy								
Minimal	0	0	0	0	0	1	2	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	2	0
Focal serositis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Intestine - duodenum								
Enteropathy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Focal mucosal mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Focal Brunner’s glands degeneration								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Intestine - ileum								
Enteropathy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	1
Intestine - jejunum								
Enteropathy								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	4
Intestine - rectum			(8)		(9)	(9)		(9)
Enteropathy								
Minimal	0	0	0	0	0	1	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0
Kidneys								
Cortical tubular vacuolation								
Mild	0	0	0	0	2	0	2	0
Medullary mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	1	3	1	0

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Multifocal cortical mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	1	0	2	0
Hilar arterial mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Liver								
Mineralisation								
Minimal	1	0	3	0	1	0	2	0
Mild	0	0	1	0	1	0	0	0
Moderate	0	0	1	0	3	0	2	0
Multifocal periportal mixed inflammatory cell infiltration								
Minimal	0	0	0	0	0	0	5	0
Mild	0	0	0	0	1	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Lungs								
Von Kossa stain examined positive	0	0	0	0	1	0	0	0
Focal mineralised pulmonary thrombus	0	0	0	0	1	1	1	0
Lymph node - mesenteric								
Lymphoid atrophy								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Multifocal sinusoidal acute inflammatory cell in filtration								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Multifocal acute inflammatory cell infiltration								
Mild	0	0	0	0	1	0	0	2
Reactive lymphoid hyperplasia								
Minimal	0	0	1	0	2	1	0	1

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals　Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Mild	0	0	0	0	2	1	3	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	2
Muscle - skeletal								
Mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	4	0
Mild	0	0	0	0	1	0	1	2
Salivary glands: parotid								
Multifocal acinar cell apoptosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Multifocal acinar cell cytoplasmic vacuolation								
Minimal	0	0	1	0	1	1	0	2
Mild	0	0	1	0	0	3	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Seminal vesicles	(9)		(9)					
Multifocal epithelial apoptosis								
Minimal	0		0		0		1	
Mild	0		0		0		1	
Skin								
Focal epidermal ulceration								
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Focal ulceration: muzzle								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Spleen								
Lymphoid follicular lymphocytolysis								
Minimal	0	0	0	0	1	0	3	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	1
Extramedullary haematopoiesis								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Increased red pulp megakaryocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	0	3	0
Mild	0	0	0	0	0	1	1	1
Red pulp neutrophils								
Minimal	0	0	0	0	2	1	4	5
Mild	0	0	0	0	1	0	1	3
Stomach								
Focal glandular mucosa ulceration								
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Severe	0	0	0	0	0	0	1	0
Focal limiting ridge mucosal acute inflammatory cell infiltration								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Focal non-glandular mucosa ulceration								
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Severe	0	0	0	0	0	0	1	0
Focal tunical muscularis mineralisation								
Mild	0	0	0	0	0	0	0	1
Glandular epithelial cell degeneration								
Minimal	0	0	1	0	1	0	3	2
Mild	0	0	0	0	0	0	2	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	2	0
Glandular mucosa mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	0

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Multifocal glandular mucosal erosions								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Multifocal glandular mucosa acute inflammatory cell infiltration								
Mild	0	0	0	0	1	0	2	1
Multifocal submucosal and/or serosal inflammation –glandular stomach								
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Vos Kossa stain examined positive	0	0	0	0	0	0	3	0
Thymus								
Atrophy								
Severe	0	0	0	0	0	0	2	0
Tongue							(8)	
Mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	1	0
Post-dose Evaluation: Number Evaluated	8	8					8	7
<u>Noteworthy findings</u>								
Ophthalmoscopy[h]	-	-					+	+
Opacity in center of cornea	0 (0)						3 (6)	3 (5)
rough surface with corneal opacity	-						-	1 (1)
No of mice (eyes) affected								
Organ Weights (%)[e]								
Spleen Absolute	0. 103 g	0.109 g					+31.1*	+33.9*
Relative	0.232 %	0.278 %					+26.7	+26.3*

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Gross Pathology								
Number examined	8	8					8	8
Liver								
Discolouration	0	0					1	0
Lymph node – mesenteric								
Enlarged	0	0					1	0
Spleen								
Discolouration	0	0					1	0
Histopathology								
Number examined (unless otherwise stated)	8	8					8	8
Bone and marrow - sternum								(7)
Increased bone marrow granulocytes								
Minimal	0	0					2	2
Mild	0	0					1	0
Eyes								(7)
Focal corneal mineralisation (right)								
Minimal	0	0					0	1
Moderate	0	0					1	0
Focal corneal mineralisation (bilateral)								
Moderate							0	1
Femoro-tibial joint								
Increased bone marrow granulocytes								
Minimal	0	0					2	1
Moderate	0	0					1	0
Heart								
Focal myocardial mixed inflammatory cell infiltration								

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals　Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Minimal	0	0					3	0
Multifocal myocardial mineralisation								
Minimal	0	0					1	0
Intestine - caecum								(7)
Enteropathy								
Minimal	0	0					1	1
Intestine - colon		(7)						(7)
Enteropathy								
Minimal	0	0					0	1
Intestine - ileum								(7)
Enteropathy								
Minimal	0	0					1	0
Intestine - jejunum								(7)
Enteropathy								
Minimal	0	0					1	1
Kidney								
Cortical tubular vacuolation								
Mild	0	0					2	0
Cortical mineralisation								
Minimal	0	1					5	0
Liver								(7)
Hepatocellular degeneration/necrosis								
Minimal	1	3					5	1
Mild	0	0					1	1
Mixed inflammatory cell infiltration								
Minimal	2	3					5	2
Mild	0	0					2	1
Multifocal periportal mononuclear cell infiltration								

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Mild	0	0					0	1
Multifocal mineralisation								
Minimal	1	0					0	0
Mild	0	0					3	0
Lymph node - mesenteric								(7)
Reactive lymphoid hyperplasia								
Mild	0	0					1	1
Muscle - skeletal								
Mineralisation								
Minimal	0	0					3	2
Skin								
Dermal mixed inflammatory cell infiltration: muzzle								
Minimal	0	0					1	1
Multifocal dermal mineralisation								
Minimal	0	0					1	0
Spleen								(7)
Multifocal lymphoid follicular lymphocytolysis								
Minimal	0	0					2	0
Mild	0	0					1	1
Multifocal lymphoid follicular macrophage infiltration								
Mild	0	0					1	0
Increased multifocal red pulp megakaryocytes								
Minimal	0	0					0	2
Multifocal red pulp neutrophils								
Minimal	0	0					2	0

Daily Dose (mg/kg/day)[a]	0		23		69		206/137[b]	
Number of Animals Main Recovery	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8	M:10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10 M: 8	F: 10 F: 8
Stomach								(7)
Glandular mucosa acute inflammatory cell infiltration								
Minimal	0	0					1	0
Mild	0	0					0	1
Multifocal non-glandular mucosal mononuclear cell infiltration								
Mild	0	0					1	0
Multifocal glandular mucosal mononuclear cell infiltration								
Minimal	0	0					0	1
Focal tunical muscularis mineralisation								
Minimal	0	0					1	0
Focal glandular mucosa erosion								
Minimal	0	0					1	0
Multifocal glandular epithelial cell degeneration								
Minimal	0	0					2	0

M male, F female.

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. For main study animals, body weight, food and water consumption and absolute organ weight data were analysed using Williams' test; clinical pathology and relative organ weight data were analysed by Shirley's test. For recovery animals, data were analysed using Student's t-test, apart from clinical pathology and organ weight data where Wilcoxon-Mann-Whitney test was used.

[a] mg/kg/day figures are approximate.

[b] Dosing in this group was not tolerated at 206 mg/kg/day and was suspended following first sub-dose on Day 8. Dosing recommenced on Day 12 at 137 mg/kg/day.

[c] Day 28 mean data shown. Additional satellite animals were used for the toxicokinetic assessment (3/sex/group/time point). All samples from control group animals were below limit of quantification.

[d] Following dosing at 206 mg/kg/day, one female (recovery animal) was found dead (without clinical signs) on Day 10 and three males (two from the toxicokinetic groups) were killed for humane reasons on Days 6 to 8, following adverse signs (including extremely decreased activity, eyes half shut, pilo-erection, pale, staining around the uro/ano-genital region, cold extremities, soft faeces, and/or increased depth of respiration) and/or reductions in bodyweight and food consumption. One male at 69 mg/kg/day was also killed for humane reasons on Day 12, following similar clinical signs.

[e] For controls, group means are shown, for treated groups, percent differences from controls are shown.

[f] Watery-liquid stools in all dose groups. Secondary changes include dehydration (decreased skin turgor). The dose volume was decreased and dose suspension concentration was increased on Day 14 to help alleviate the condition of watery-liquid stool likely attributable to the volume of the vehicle. In animals that survived to termination, there were also dose-related increased incidences of distended abdomen, decreased activity, piloerection and cold extremities, more so in males than in females. Also, masses on the lower ventral surface were seen in some 206/137 mg/kg/day males and one male at 69 mg/kg/day.

[g] Ophthalmology findings during Week 4 included opacity in the centre of the cornea across all groups and rough surface to corneal opacity seen in the group dosed with selumetinib.

[h] Ophthalmology findings during Week 8 included opacity in the centre of the cornea and rough surface to corneal opacity seen in the group previously dosed with selumetinib.

Report Title: **AZD6244: Toxicity Study by twice daily Oral Gavage Administration to CD-1 Mice for 26 Weeks with Assessment of Effects on Male Fertility followed by a 13 Week Recovery Period**

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain:
Mouse / Crl:CD1(ICR)

Duration of dosing: up to 6 months

Study number: VKS0211

Initial age:
Main study: approximately 40 to 47 days at start of dosing
Fertility: approximately 10 to 11 weeks prior to pairing
Males: approximately 16 to 17 weeks prior to pairing

Duration of post-dose:13 weeks

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage), BID

Testing Facility: [redacted], UK

Special features:
Assessment of male fertility.

Day of C Section: Day 14 of gestation

Vehicle / Formulation: Solution in 30% Captisol in water

No observed adverse-effect level: Not established.

Conclusion: Twice daily oral administration of selumetinib (formerly referred to as AZD6244) to CD-1 mice for 26 weeks at a dose of 20 mg/kg BID resulted in mortality in both males and females. The male 20 mg/kg BID group was prematurely terminated after 15 weeks of treatment. In these males the bulbocavernosus muscle was a target organ, the engorgement of the corpus cavernosum led to the obstruction of the urinary tract and back flow pressure effects leading to death or early sacrifice of the majority of these males. In early decedent females and occasionally in males given 20 mg/kg BID there was severe inflammatory changes of the gastro-intestinal tract, in particular the colon and caecum. Similar, but less severe, inflammatory changes were seen in males given 20 mg/kg BID prematurely killed in Week 16 and in the 20 mg/kg BID terminal sacrifice females. Consequently, it is the large intestine that has been identified as the main target organ. Treatment-related changes were present in the large intestine of a few animals given 1 mg/kg BID and therefore, a NOAEL was not established in this study. After 13 weeks off-dose, full or partial recovery was seen for most of the changes but there was still evidence of lesions (albeit minimal in severity) in the lower G.I. tract of a few animals.

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Toxicokinetics[b]:								
Selumetinib								
$AUC_{(0\text{-}12hr)}$ (µmol.h/L)			8.58	11.1	49.1	56.3	142	216
AUC (µmol.h/L)			9.17	13.3	58.0	64.6	157	-
C_{max} (µmol/L)			2.13	3.58	13.4	12.0	39.1	60.6
N-desmethyl selumetinib: (metabolite)								
$AUC_{(0\text{-}12hr)}$ (µmol.h/L)			1.45	1.21	6.22	4.68	17.9	9.17
AUC (µmol.h/L)			1.65	1.60	8.48	5.64	21.6	NA
C_{max} (µmol/L)			0.209	0.278	1.18	0.657	3.23	1.59
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund[c]	0	1[d]	1	0	0	1	14[d]	6[d]
Body Weight Gain (%)[e]	(g)							
Week 0 to 15	7.9	8.9	-11.4	+6.7	-12.7	+2.2	-22.8**	-28.1
Week 0 to 26	10.0	10.8	-8.0	-1.9	-15.0	-19.4*		-44.4**
Clinical Observations[f]	-	-	-	-	-	-	+++	++
Haematology (Week 26)[g]								
Eosinophil ($x10^9$/L)	0.20	0.11	0.15	0.18*	0.17	0.18*	0.19	0.24**
Haematocrit (L/L)	0.447	0.454	0.446	0.439	0.430*	0.436	0.388	0.400**
Haemoglobin (g/dL)	13.9	14.2	14.0	13.9	13.7	13.7	12.4	12.2**
Large Unstained Cells ($x10^9$/L)	0.04	0.05	0.04	0.07	0.04	0.06	0.05	0.21**
Monocyte ($x10^9$/L)	0.12	0.11	0.16	0.20**	0.21*	0.22**	0.18	0.20**
Mean cell haemoglobin (pg)	15.0	15.6	15.0	15.7	15.3	15.2	14.4	14.4**
Mean cell volume (fl)	48.2	49.9	47.9	49.5	48.1	48.3	44.9	46.9**
Neutrophil ($x10^9$/L)	0.92	0.79	1.06	1.03	1.53*	1.78**	3.52	6.77*
Platelets ($x10^9$/L)	1492	1419	1561	1313	1465	1633	1387	2011**
Red blood cells ($x10^{12}$/L)	9.27	9.11	9.33	8.88	8.96	9.04	8.65	8.53**

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Reticulocyte (%)	2.70	2.56	2.66	2.88	2.91	3.15	3.11	4.12**
White blood cells ($x10^9$/L)	5.03	4.68	5.23	6.05	5.38	6.29	5.92	10.22**
Plasma Chemistry (Week 27)[g]								
Albumin (g/L)	31	32	32	32	30*	31	28	27**
Albumin/globulin ratio	1.28	1.43	1.29	1.39	1.24	1.32	1.03	0.95**
Calcium (mmol/L)	2.34	2.37	2.38	2.34	2.37	2.35	2.34	2.45
Glucose (mmol/L)	8.37	10.07	9.01	10.11	9.26	9.99	8.93	6.79**
Phosphorus (mmol/L)	2.72	2.05	2.04*	2.12	2.06*	1.79	2.06	2.41*
Sodium (mmol/L)	155	151	154	152	153	151	156	153**
Urea (mmol/L)	7.66	6.30	8.29	6.76	8.53	6.53	9.46	6.94
ALP (U/L)	72	56	55	59	52	57	67	75*
Triglycerides (mmol/L)	1.18	1.04	1.07	1.13	0.99	1.19	0.94	0.73
Urine Chemistry (Week 16)[h]								
Chloride (mmol/L)	66.0						96.9*	
pH	7.9						7.5*	
Sodium (mmol/L)	132.7						163.4*	
Organ Weights (%)[e]	(g)							
Spleen: absolute	0.102	0.139	+28.4	+1.4	+3.9	-10.8	+13.7	+84.9**
Gross Pathology[hi]								
Number examined	15	15	14	15	15	14	16	13
Abdomen								
Adhesions	0	0	0	0	0	0	0	2
Masses	0	0	0	0	0	0	0	1
Adipose tissue								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	2
Animal thin	0	0	0	0	0	0	0	8**

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Bulbocavernosus muscle								
Swollen	0	0	0	0	0	0	1	0
Caecum								
Thickened	0	0	0	0	1	0	1	7**
Pale	0	0	0	0	0	0	0	1
Colon								
Thickened	0	0	0	0	0	0	0	7**
Pale	0	0	0	0	0	0	0	1
Duodenum								
Thickened	0	0	0	0	0	0	0	1
Gall bladder								
Distended	0	0	0	0	0	0	2	5*
Jejunum								
Thickened	0	0	0	0	0	0	0	1
Kidney								
Enlarged	0	0	0	0	0	0	2	0
Lymph node mesenteric								
Enlarged	0	0	0	2	1	1	1	10**
Pituitary								
Dark	0	0	0	0	0	0	6*	0
Spleen								
Enlarged	0	4	3	5	2	2	3	9*
Swollen	0	1	1	0	2	0	1	6*
Urethra								
Abnormal content	0	0	0	0	0	0	1	0

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Histopathology[i]								
Number examined (unless otherwise specified)	15	15	14	15	15	14	16	13
Bone marrow (No. examined)							(12)	
Sternum								
Increased granulopoieses	0	0	0	0	0	0	3	6**
Femur								
Increased granulopoieses	0	0	0	0	1	0	4*	6**
Bulbocavernosus muscle								
Congestion: corpus cavernosum								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Slight	0	0	1	0	0	0	4	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	3	0
Overall significance[j]							**	
Caecum (No examined)							(12)	
Adhesion(s)								
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Abscess (es)								
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Mucosal inflammation								
Minimal	0	1	0	0	0	0	2	0
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2
Marked	0	0	0	0	1	0	0	0
Mucosal erosion								
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Mucosal ulceration								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Submucosal Inflammation								

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Marked	0	0	0	0	1	0	0	0
Overall significance[j]								*
Submucosal Oedema								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2
Overall significance[j]								**
Epithelial hyperplasia								
Slight	0	0	0	0	0	0	1	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	1
Necrosis								
Slight	0	0	0	0	1	0	0	0
Inflammatory cell infiltration: muscularis propria								
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Degeneration muscularis propria								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Inflammatory cell infiltration: peritoneum								
Slight	0	0	0	0	1	0	0	1
Severe	0	0	0	0	0	0	0	1
Colon (No. examined)							(12)	
Mucosal inflammation								
Minimal	0	0	1	1	1	0	0	1
Slight	0	0	0	1	2	0	2	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	4
Overall significance[j]								**

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Mucosal ulceration								
Minimal	0	0	0	0	0	0		2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	0
Severe	0	0	0	0	0	0	0	1
Overall significance[j]								*
Epithelial hyperplasia								
Minimal	0	0	1	1	2	0	0	0
Slight	0	0	0	1	1	0	3	7
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	2
Overall significance[j]								**
Submucosal inflammation								
Minimal	0	0	1	1	1	0	1	3
Slight	0	0	0	0	0	0	1	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	4
Overall significance[j]								**
Submucosal oedema								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Necrosis								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammatory cell infiltration muscularis propria								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	1	2
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Overall significance[j]								**
Degeneration muscularis propria								
Slight	0	0	0	0	0	0	1	1

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Inflammatory cell infiltration peritoneum								
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Adhesion(s)								
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Duodenum (No. examined)							(12)	
Inflammatory cell infiltration								
Minimal	0	2	1	0	2	0	0	2
Slight	0	0	0	0	1	0	2	7
Overall Significance[j]								**
Ileum/Peyers (No. examined)							(12)	
Mucosal inflammation								
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Submucosal inflammation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Liver (No. examined)							(12)	
Increased mitotic figures								
Minimal	0	0	0	1	0	1	0	2
Slight	0	1	0	0	2	1	0	2
Reduced vacuolation								
Minimal	0	0	1	0	0	0	0	0
Slight	0	0	0	0	0	0	2	0
Moderate	2	0	0	0	0	0	0	7
Overall significance[j]								**
Reduced basophilia	0	0	0	1	0	0	0	4
Minimal								*
Overall significance[j]								

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Inflammatory cell infiltration; portal area								
Minimal	1	0	0	0	1	0	0	4
Slight	0	0	0	0	0	0	0	3
Overall significance[j]								**
Pigment in kupffer cells								
Minimal	5	4	1	0	8	0	4	10
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Overall significance[j]								**
Multifocal mineralisation								
Minimal	0	0	0	0	1	0	0	0
Lymph node – mesenteric (No. examined)			(1)	(3)		(2)	(12)	
Plasmacytosis								
Minimal	0	0	0	0	1	1	2	2
Slight	0	0	0	0	0	0	2	3
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	5
Marked	0	0	0	0	0	0	0	1
Overall significance[j]								**
Pancreas (No. Examined)			(0)	(0)		(0)	(12)	
Acinar cell degranulation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	3
Overall significance[j]								**
Parotid S.G. (No. examined)							(12)	
Acinar atrophy: diffuse								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	2
Slight	0	0	0	0	0	0	0	2
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Vacuolation								

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Minimal	1	0	0	0	0	0	0	3
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Pituitary (No. examined)			(0)	(0)		(1)	(11)	
Congestion								
Minimal	0	0	0	0	0	1	6	0
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Overall significance[j]							**	
Preputial Glands								
Abscessation								
Slight	0		1		0		0	
Cystic atrophy								
Minimal	0		0		3		0	
Slight	2		2		1		0	
Moderate	1		1		0		4	
Duct(s) distended with secretory material								
Minimal	0		0		1		0	
Slight	0		0		0		1	
Moderate	0		0		0		3	
Inflammation								
Minimal	0		0		0		1	
Slight	0		0		1		0	
Moderate	0		2		0		2	
Necrosis								
Moderate	0		0		0		1	

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Rectum (No. examined)							(12)	
Mucosal inflammation								
Minimal	0	0	0	0	1	0	1	3
Slight	0	0	0	0	0	0	2	0
Moderate	0	0	0	0	1	0	0	0
Epithelial hyperplasia								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	1	0	1	0
Subucosal inflammation								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	1	0	0	0
Spleen (No. examined)							(12)	
Extramedullary haemopoiesis								
Minimal	3	4	5	4	8	4	4	1
Slight	6	4	3	8	4	5	4	5
Moderate	0	4	0	2	0	2	0	5
Marked	0	0	0	0	0	0	0	2
Increased cellularity: Granulocytes								
Minimal	0	0	0	0	0	0	1	0
Slight	0	0	0	0	0	0	1	0
Stomach (No. examined)							(12)	
Mucosal inflammation: glandular								
Minimal	1	0	0	1	0	0	0	0
Slight	2	0	0	0	0	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Submucosal inflammation: non-glandular								
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	1
Slight	0	0	0	0	0	0	0	1
Subucosal inflammation: glandular								
Minimal	0	1	0	0	0	0	0	0

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Slight	0	0	0	1	1	0	0	0
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	1
Urethra (No examined)				(0)		(0)		
Congestion								0
Minimal	2	0	0	0	0	0	2	0
Slight	1	0	0	0	0	0	0	
Reproductive Phase								
Number of males mated	25		20		20		24	
Number siring a pregnancy	23		18		20		22	
(fertility rate %)	92		90		100		92	
Mating performance and fertility[k]	-	-	-	-	-	-	-	-
Post-dose Evaluation: Number Evaluated	10	10					7	9
Noteworthy findings								
Plasma Chemistry								
Albumin (g/L)	31	32					30	30*
Albumin/globulin ratio	1.34	1.32					1.13*	1.15*
Cholesterol (mmol/L)	3.12	2.54					3.13	1.85*
Phosphorus (mmol/L)	2.06	1.82					2.37*	2.01
Urea (mmol/L)	7.78	7.49					9.71*	7.34
Organ Weights (%)[e]	(%)							
Spleen: relative to bodyweight	0.322	0.401					-1.9	+68.8*
Gross Pathology								
Number examined	10	10					7	9
Spleen								
Enlarged	1	4					1	8*

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals　Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Histopathology								
Number examined	10	10					7	9
Caecum								
Mucosal inflammation								
Slight	0	0					0	1
Submucosal Inflammation								
Slight	0	0					0	1
Moderate	0	0					0	1
Epithelial hyperplasia								
Slight	0	0					0	2
Inflammatory cell infiltration: muscularis propria	0	0					0	1
Moderate								
Degeneration muscularis propria	0	0					0	1
Moderate								
Inflammatory cell infiltration: peritoneum								
Moderate	0	0					0	1
Colon								
Mucosal inflammation								
Slight	0	0					0	1
Moderate	0	0					1	0
Submucosal inflammation								
Slight	0	0					1	0
Epithelial hyperplasia								
Slight	0	0					1	0
Inflammatory cell infiltration: muscularis propria								
Slight	0	0					1	0
Minimal	0	0					0	1
Degeneration muscularis propria								

Daily Dose (mg/kg) BID	0		1		5		20	
Number of Animals Main	M: 15	F: 15	M:15	F: 15	M:15	F: 15	M: 15	F: 15
Recovery	M: 10	F: 10	M: 5[a]		M: 5[a]		M: 10	F: 10
Fertility Assessment		F: 25		F: 20		F: 20		F: 25
Slight	0	0					1	1
Inflammatory cell infiltration: peritoneum								
Slight	0	0					1	0
Liver								
Reduced basophilia								
Slight	0	0					0	2
Multifocal mineralisation								
Minimal	0	0					2	0
Multifocal Kupffer Cells Proliferation								
Minimal	0	0					0	1
Slight	0	0					0	1
Increased numbers of sinusoidal cells								
Slight	0	0					0	1
Preputial Glands								
Abscessation								
Slight	1						0	
Cystic atrophy								
Slight	0						2	
Duct(s) distended with secretory material								
Slight	0						1	
Inflammation								
Slight	0						1	
Moderate	1						1	

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked

AUC Area under plasma concentration time curve to infinity* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. For categorical data, including pathological findings, the proportion of animals was analysed using Fisher's Exact test. For continuous data, Bartlett's test (Bartlett 1937) was first applied to test the homogeneity of variance between the groups. If Barlett's test was not significant, then Williams' test or Dunnett's test were used.

[a] Animals killed after fertility established (Week 15).

[b] Week 16 data are shown for high dose males. Week 26 data for remaining groups. Additional (satellite) animals were used for the toxicokinetic assessment. No selumetinib or its metabolites were detected in TK control samples. NA = insufficient data to calculate AUC.

[c] The high dose level of 20 mg/kg BID was not tolerated in the males and resulted in the early deaths of 14 animals in Weeks 8 to 16, and the premature sacrifice of the remaining males in this group after 15 weeks of treatment. The cause of death in the majority of these males was due to changes in the lower urinary tract (swollen, congestion and/or haemorrhage of the corpus cavernosum of the bulbocavernosus muscle, haemorrhagic and inflammatory changes in the urethra, obstruction of the penile urethra and marked distension of the urinary bladder; the urethral obstruction resulted in backflow pressure which led to secondary changes in the ureters, seminal vesicles, prostate and kidneys). Thickening of the duodenum, colon and caecum was occasionally observed. One male and Group 4 females resulted in marked inflammatory changes in the intestine, particularly the colon and caecum, with occasional perforation and/or involving the peritoneum. Group 1 female and Group 2 male showed nephrophy and Group 3 female had malignant lymphoma.

[d] Of those found dead or killed for welfare reasons, 1 control group female and 8 high dose males and 3 females were satellite animals.　3 high dose males and 1 female were recovery group animals.

[e] 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). Surviving males were killed prematurely; data not available for week 26.

[f] The predominant clinical signs reported prior to death in the animals killed prematurely (20 mg/kg BID) included underactive and unresponsive behaviour (one female was recorded as prostrate and the posture of one male and one female was described as flat), piloerection, hunched posture, reduced body temperature, abnormal breathing (fast/irregular/deep/slow), thin and general pallor. Several animals had dull/dark eyes. Tremor was reported in a few animals and poor/absent reflexes were noted for one male and one female. Animals that survived to termination, females surviving 20 mg/kg BID were considered thin/emaciated and were observed to have fast breathing.

[g] Week 16 Group 4 males compared with control data from animals after 26 weeks of dosing

[h] Urine samples were obtained in Week 16 from all surviving Control and Group 4 male animals only.

[i] Group summary for animals killed after 15 weeks (20 mg/kg males) or 26 weeks of dosing.

[j] Statistical significance was calculated comparing total number of incidences with those in Control group.

[k] Mating performance and fertility were unaffected by selumetinib.

Report Title: AZD6244: Maximum tolerated dose and 28-Day oral toxicity study followed by a 28-Day recovery period in Cynomolgus monkeys

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain:
Monkey / Cynomolgus

Duration of dosing:
MTD: 6 to 14 days, bid
Repeat dose: 28 days, bid

Study number: VKS/0153

Initial age: Approximately 25 to 36 months at start of dosing

Duration of post-dose: 28 days
10/5 mg/kg b.i.d group were continued on as the recovery.

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted], UK

Special features: None.

Vehicle / Formulation: Solution in 30% Captisol in water

No observed adverse-effect level: 1.5 mg/kg/b.i.d

Conclusion: Twice daily administration of selumetinib (formerly referred to as AZD6244) at doses of 15 mg/kg for up to 14 days was associated with persistent loose/liquid/red stained faeces, pain/abdominal discomfort, signs of dehydration, and haematology and plasma chemistry changes suggestive of an acute blood loss anaemia and requiring one male to be killed prematurely. Inflammatory/degenerative histopathological changes were seen in the stomach of one female. Based on short duration of treatment, 7.5 mg/kg b.i.d was the maximum tolerated dose level on the escalating dose phase. Twice daily administration of 5 mg/kg or above for 28 days caused persistent loose/liquid faeces and dehydration in some animals, and decreased red blood cell parameters, increases in reticulocytes and decreased plasma albumin, with evidence of recovery following a 28-day recovery period. However, there were no treatment related histopathological findings. Therefore based on these findings, 1.5 mg/kg b.i.d is the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) in cynomolgus monkeys following dosing for 28 days.

Duration of dosing: MTD phase	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL (mg/kg)	Noteworthy findings
7 to 14 days	Two daily doses, 12 hours apart. Days 1-7: 0.92 mg/kg Days 9-14: 3 mg/kg Days 15-21: 7.5 mg/kg Days 22-35: 15 mg/kg	2 M + 2F	Not evaluated	Dosing at up to 7.5 mg/kg b.i.d for 6 or 7 days was well tolerated. Following dosing at 15 mg/kg b.i.d, abdominal discomfort, persistent loose/liquid/red stained faeces, red anal discharge, mild dehydration and bodyweight loss were recorded in one male after dosing for 9 days, and this male was killed for humane reasons on the following day. Findings associated with responsive acute blood loss anaemia were apparent and included reduced haemoglobin, red blood cell count and haematocrit, increased reticulocyte, decreased albumin and A/G ratio. However, histopathological evaluation revealed no significant changes in this animal. The remaining animals completed 14 days dosing at 15 mg/kg b.i.d, but showed similar adverse signs (including abdominal discomfort, loose/liquid faeces), and similar haematology and plasma chemistry changes. At necropsy, abnormal GI content, distended GI tract were observed; congested areas were seen in the stomach of one female, correlated microscopically with mucosal inflammation with glandular microabscesses, parietal cell degeneration and submucosal oedema.

Daily Dose (mg/kg b.i.d)	0 Control		1.5		5		10/5[a, b]		10/7.5[a]	
Number of Animals	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Toxicokinetics[c]:										
$AUC_{(0\text{-}12)}$ (µmol.h/L)			5.78	7.83	10.8	7.45	22.4	24.8	27.1	22.0
AUC (µmol.h/L)			6.37	8.92	18.5	9.90	27.7	27.9	33.5	-
C_{max} (µmol.h/L)			2.34	3.37	3.48	2.54	6.85	12.0	12.6	5.61
Noteworthy Findings										
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (kg)										
Day 29	2.45	2.63	2.28	1.98	2.38	2.32	2.62	2.68	2.30	2.43
Body Weight Gain (kg)										
Days 1 to 29	-0.05	+0.08	+0.15	+0.10	-0.03	-0.02	+0.20	+0.19	-0.02	+0.02
Clinical Observations[d]	-	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++
Haematology (Day 28)										
Haematocrit (L/L)	0.378	0.371	0.420	0.415	0.361	0.375	0.385	0.379	0.335	0.343
Haemoglobin (g/dL)	12.5	12.4	14.2	14.3	12.0	12.1	12.9	12.5	10.7	11.1
Neutrophils ($x10^9$/L)	2.66	4.01	3.78	3.59	4.43	10.05	11.24	12.16	5.90	7.69
Reticulocytes (%)	1.50	1.73	1.26	1.12	1.27	1.27	1.45	1.14	2.09	1.24
Serum Chemistry										
Albumin (g/L)	43	38	45	45	35	37	38	37	36	34
Albumin/globulin ratio	1.27	1.21	1.27	1.53	0.89	0.94	1.25	1.10	0.94	0.86
Gross Pathology										
Number examined	2	2	2	2	2	2	0[b]	0[b]	2	2
GI tract										
Abnormal contents	0	0	0	0	0	0			0	1
Distended	0	0	0	0	0	0			0	1

Daily Dose (mg/kg b.i.d)	0 Control		1.5		5		10/5[a, b]		10/7.5[a]	
Number of Animals	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Stomach										
Body congested area(s); mucosa	0	0	0	0	0	1			0	1
Pylotic antrum contested area(s)	0	0	0	0	0	1			0	1
Body depressions	0	0	0	0	0	1			0	0
Post-dose Evaluation: Number Evaluated							2	2		
Noteworthy findings							-	-		

M male,　F female.

-　No noteworthy findings; +　Mild; ++　Moderate; +++　Marked.

AUC　Area under the plasma concentration time curve to infinity

The small sample size of the study precluded statistical analysis.

[a]　14 days of dosing at 10 mg/kg b.i.d indicated that this dose could not be tolerated for the remaining duration, and therefore following the cessation of dosing for one day the dose level was reduced to 7.5 mg/kg b.i.d from Day 16.　The other group dosed at 10 mg/kg b.i.d had a staggered start and the dose was reduced to 5 mg/kg b.i.d from Day 2.

[b]　Following 28 days dosing the 10/5 mg/kg b.i.d group were continued on as the recovery group for 28 days.

[c]　Day 28 mean data shown.　No AZD6244 was detected in plasma samples from control animals. N-desmethyl AZD6244 was undetectable on Day 28.

[d]　Clinical observation findings associated with treatment were loose/liquid faeces, red faecal stained faeces and/or red anal discharge and the occasional sign of dehydration in some animals characterised as sunken eyes (M237, 10/7.5 mg/kg b.i.d) and/or skin tenting and tacky membrane (M235, 10/7.5 mg/kg b.i.d). The incidence of loose/liquid faeces at doses of 5 mg/kg b.i.d or above was considered to be adverse.　In addition, ungroomed coat (unkempt behaviour) was also recorded for a few treated males.

Report Title: AZD6244: Toxicity Study By Oral Gavage Administration to Cynomolgus Monkeys for 26 Weeks

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain: Monkey / Cynomolgus

Duration of dosing: Twice daily for 26 weeks

Study number: VKS0210

Initial age: Approximately 31 to 43 months at start of dosing

Duration of post-dose: Not applicable

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted], UK

Special features: None.

Vehicle / Formulation: Solution in 30% w/v aqueous Captisol, pH adjusted to 2.5 ± 0.3

No observed adverse-effect level: 1.5 mg/kg b.i.d

Conclusion: Oral administration of Selumetinib (formerly referred to as AZD6244) up to a dose level of 4 mg/kg b.i.d in cynomolgus monkeys for 26 weeks caused liquid and/or loose faecal consistency. Dosing at 4 mg/kg b.i.d caused adverse production of liquid faeces, slight increases in AST and reductions in albumin. In addition, one male at 4 mg/kg b.i.d showed elevated circulating phosphorus levels. There were no histopathological findings that could be attributed to treatment with Selumetinib. The intermediate dose of 1.5 mg/kg b.i.d was well tolerated, and therefore based on clinical findings, 1.5 mg/kg b.i.d was considered to be the No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL).

Daily Dose (mg/kg bid)	0 (vehicle)		0.5		1.5		4	
Number of Animals Main	M: 4	F: 4	M: 4	F:4	M: 4	F: 4	M:4	F: 4
Toxicokinetics [a]:								
AZD6244:								
$AUC_{(0-12)}$ (µmol/h/L)			1.88	2.07	5.82	5.35	21.4	15.4
AUC (µmol/h/L)			2.60	2.95	7.29	6.89	26.3	18.3
C_{max} (µmol/L)			0.446	0.665	1.70	1.79	5.76	6.63
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (%)[b,c]		(kg)						
Week 0-26	0.49	0.44	+28.6	-27.3	+44.9	-27.3	-34.7	-9.1
Clinical Observations[d]	+	-	+	+	+	++	++	+++
Serum Chemistry (Week 26)								
Albumin (g/L)	39	39	39	37	39	37	34*	33*
Albumin/globulin ratio	1.21	1.10	1.11	0.95	1.00*	0.94	0.81**	0.62**
AST (IU/L)	28	39	44	56	55*	43	60*	92
Beta globulin (g/L)	10	11	12	12	12	13	15**	16*
Calcium (mmol/L)	2.46	2.40	2.46	2.39	2.42	2.36	2.30**	2.45
Cholesterol (mmol/L)	3.35	3.47	3.98	3.17	3.15	3.55	2.63*	3.40
Gamma globulin (g/L)	15	17	15	19	19	19	21*	25*
Phosphorus (mmol/L)	2.07	1.89	2.22	1.86	2.60	1.91	2.53	2.15

M = male, F = female. BLQ = Below Limit of Quantification, AST= aspartate aminotransferase. AUC Area under the plasma concentration time curve to infinity

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked

$p<0.05$; ** $p<0.01$: Body weights and serum chemistry data were compared using pairwise Fisher's Exact tests.

[a] Week 26 mean data shown. All samples from control group animals were below limit of quantification. All AZD6244 N-desmethyl (metabolite) samples were BLQ.

[b] At end of dosing period.

[c] 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] The main clinical sign considered to be attributable to Selumetinib treatment was liquid faecal consistency and loose faeces with an apparent dose related response. These signs were noted predominantly in the 4 mg/kg b.i.d dose group particularly in the females, and at a lower frequency in a few females and occasionally in the males at the 1.5 mg/kg b.i.d dose group. Sporadic occurrences of loose faeces were observed in the 0.5 mg/kg b.i.d dose group and controls. Dehydration was also noted occasionally in a few animals at doses of 1.5 mg/kg b.i.d and above during the study. Following weight loss, one high dose female at 4 mg/kg b.i.d was taken off dose for 7 days in Weeks 18-19. This animal recommenced dosing following demonstration of satisfactory recovery.

Report Title: AZD6244: Nine Month Oral (Gavage) Toxicity Study in Cynomolgus Monkeys

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain: Cynomolgus Monkey

Duration of dosing: 9 months

Study number: 512415

Age at start of dosing: 2-3 years

Duration of post-dose: None

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted], [redacted], UK

Special features: Twice daily dosing (12 hours apart).

Vehicle / Formulation: Suspension in 30% Captisol in Milli-Q water

No observed adverse-effect level: 2.5 mg/kg BID (5 mg/kg/day)

Conclusion: Twice daily (12 hours apart) oral gavage administration of AZD6244 to cynomolgus monkeys for 9 months was well tolerated up to and including 2.5 mg/kg BID (5 mg/kg/day) and was associated with a single incidence of swollen inguinal lymph nodes on Day 274 (Week 39) at ≥1.5mg/kg BID and slightly lower body weight gain throughout the study in animals dosed at 2.5 mg/kg BID.

Clinical pathology changes included minor transient increases in white blood cell and neutrophil counts and progressive increases in eosinophils at ≥ 1.5 mg/kg BID and increases in aspartate aminotransferase activity at 2.5 mg/kg BID.

Based on these results, the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) was considered to be 2.5 mg/kg BID (5 mg/kg/day).

Daily Dose (mg/kg BID)[a]	0 (Vehicle)		0.5		1.5		2.5	
Number of Animals Main	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Toxicokinetics [b]:								
Mean $AUC_{(0\text{-}t)}$ (µmol·h/L)			1.25	1.53	4.79	4.82	7.02	5.53
Mean C_{max} (µmol/L)			0.422	0.424	1.18	0.953	2.17	1.37
Noteworthy Findings								
Died or Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight Gain (%) [c]	(g)							
Day 1-92	0.15	0.20	-	-	-	-	-47	-35
Day 92-183	0.30	0.33	-	-	-	-	-7	-15
Day 183-274	0.48	0.38	-	-	-	-	-31	-61
Day 1-273	0.93	0.90	-	-	-	-	-27	-39
Clinical Observations [d]	-	-	-	-	+	+	+	+
Haematology [e]								
White Blood Cells (10^9/L)								
Week 13	10.568	10.608	-	-	1.56x	-	1.54x	1.60x
Neutrophils (10^9/L)								
Week 13	2.808	4.898	-	-	2.71x	-	2.55x	2.78x
Eosinophils (10^9/L)								
Week 13	0.245	0.100	-	-	-	3.65x[f]	-	3.33x
Week 26	0.203	0.180	-	-	-	11.65x[f]	-	3.84x
Week 39	0.308	0.190	-	-	-	12.82x[f]	-	7.17x[g]
Plasma Chemistry [e]								
Aspartate aminotransferase (U/L)								
Week 26	48.8	41.0	-	-	-	-	1.81x	1.45x
Week 39	42.3	40.0	-	-	-	-	1.70x	1.485x

M = male,　F = female.

-　No noteworthy findings; +　Mild; ++　Moderate; +++　Marked

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Body weight, haematology and serum chemistry data analysed using Anova % Dunnett's Test.

[a] Dosing was performed twice daily 12hr. apart.

[b] Day 273 mean data shown.

[c] 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] Swollen inguinal lymph nodes were observed in two males dosed 2.5 mg/kg BID (M4002 and M4004), one female dosed 1.5 mg/kg BID (F3502) and three females dosed 2.5 mg/kg BID (F4502, F4503 and F4504) on Day 274. Red discolouration of the inguinal region was observed in Animal M4004 and F4501 from Week 19 onwards. Additionally, there were isolated incidences of soft/liquid faeces in animals (generally males) at ≥ 1.5 mg/kg BID, however, this was only observed up to Week 5 (Day 30).

[e] Values presented are fold change from controls.

[f] Individual fold change compared to baseline value for Animal F3503

[g] Mainly driven by Animal F4501.

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Report Title: Bacterial Reverse Mutation Assay **Test Article: Selumetinib free base**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.

Number of independent assays: 2

Study number: AA78NV.503.BTL

Strains: *S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E coli* WP2 *uvrA*

Number of replicate cultures:
Assay 1: 2
Assay 2: 3

GLP compliance: Yes

Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9, 10%

Number of cells analysed/culture: Not applicable

Testing Facility: [redacted], USA

Vehicles: **For Test Article:** DMSO

For positive controls: DMSO (2-nitrofluorene, 2-aminoanthracene, methyl methanesulfonate, 9-aminoacridine) and Water (Sodium Azide)

Treatment: Two assays (-/+S9), plate incorporation for 48-72 hours.

Date of treatment: [redacted] – [redacted] 20[redacted]

Selumetinib was formerly referred to as ARRY-142886.

Cytotoxic effects: None.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts (mean)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*
Without activation	DMSO	100 μL/plate	21	9	12	137	15
	Selumetinib	2.5	17	8	15	121	13
		7.5	20	6	15	124	16
		25	12	8	10	137	19
		75	21	7	14	146	9
		200	14	10	16	134	13
		600	20	8	18	149	15
		1800[NP]	12	5	16	147	11
		5000[IP]	14	5	7	174	9
	Sodium Azide	1	299			459	
	2-Nitrofluorene	1			173		
	9-Aminoacridine	75		569			
	Methyl methanesulfonate	1000					121

[IP] Interfering precipitate
[NP] Non-Interfering precipitate

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts (mean)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*
With activation	DMSO	100 μL/plate	15	11	22	113	14
	Selumetinib	2.5	11	11	26	114	16
		7.5	12	9	21	120	17
		25	17	9	24	113	18
		75	12	7	22	113	12
		200	14	6	27	102	12
		600	13	7	23	125	16
		1800	15	9	29	125[NP]	15
		5000[IP]	10	6	22	126	7
	2-Aminoanthracene	1	70	41	255	965	
		10					334

[IP] Interfering precipitate
[NP] Non-Interfering precipitate

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 2: Revertant colony counts (mean)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*
Without activation	DMSO	100 μL/plate	13 (2)	7 (2)	10 (2)	106 (9)	13 (2)
	Selumetinib	50	12 (2)	7 (1)	11 (1)	105 (4)	10 (2)
		150	13 (2)	6 (1)	9 (2)	108 (9)	10 (1)
		500	12 (4)	4 (1)	11 (1)	111 (7)	12 (3)
		1500	11 (2)	5 (2)	14 (1)[NP]	116 (5)	12 (3)
		5000[IP]	12 (2)	6 (1)	10 (1)	122 (4)	10 (1)
	Sodium Azide	1	765 (5)			715 (65)	
	2-Nitrofluorene	1			297 (40)		
	9-Aminoacridine	75		472 (176)			
	Methyl methanesulfonate	1000					248 (96)
With activation	DMSO	100 μL/plate	11 (4)	5 (0)	12 (3)	127 (12)	12 (1)
	Selumetinib	50	9 (2)	7 (2)	12 (2)	119 (11)	10 (1)
		150	9 (2)	5 (3)	15 (2)	114 (5)	11 (1)
		500	13 (2)	6 (2)	13 (2)	121 (10)	11 (2)
		1500	10 (2)	6 (2)	15 (5)	131 (19)	10 (0)
		5000[IP]	5 (1)	8 (2)	12 (1)	134 (16)	9 (1)
	2-Aminoanthracene	1	204 (9)	186 (4)	1120 (186)	1042 (9)	
		10					420 (65)

[IP] Interfering precipitate
[NP] Non-Interfering precipitate

Report Title: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (L5178Y$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Assay)　Test Article: Selumetinib free base

Test for induction of: Gene mutation and chromosome aberrations.	**Number of independent assays:** 2	**Study number:** AA78NV.704.BTL
Strains: L5178Y TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	**Number of replicate cultures:** 2	**GLP compliance:** Yes
Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9	**Number of cells analysed/culture:** 6 x 10^6 (4 hour treatment) 3 x 10^5 (24 hour treatment)	**Testing Facility:** [redacted], USA
Vehicles:　**For Test Article:** DSMO	**For positive controls:** DMSO	
Treatment: Assay 1, 4 hours in the presence and absence of S9. Assay 2, 24 hours in the absence of S9.		**Date of treatment:** [redacted] 20[redacted]

Selumetinib was formerly referred to as ARRY-142886.

Cytotoxic effects: None.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/mL)	Assay 1: 4 hour exposure			
			Mutant Frequency	Suspension Growth	Cloning Average (Visual Count)	Total Growth (%)
With activation	DMSO	100 μL	74	15.1	161	
	Selumetinib	25	108	15.4	174	110
		50	118	15.2	175	109
		75	137	13.4	164	90
		100	107	9.7	164	65
		150[P]	88	3.4	181	25
		200[P]		1.9	++	
	7, 12-Dimethyl-benz(a)anthracene)	2.5	201	11.3	146	67
		4	424	4.5	82	15
Without activation	DMSO	100 μL	63	23.6	174	
	Selumetinib	25	84	22.5	199	108.5
		50	115	20.4	173	85
		75	80	18.8	174	79.5
		100	103	15.5	186	70.5
		150[P]	63	13.1	160	50.5
		200[P]		14.3	++	
	Methyl methanesulfonate	10	194	16.5	112	45
		20	723	9.7	49	12

[P] Precipitating dose
++ Not chosen for cloning

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/mL)	Assay 2: 24 hour exposure			
			Mutant Frequency	Suspension Growth	Cloning Average (Visual Count)	Total Growth (%)
Without activation	DMSO	100 μL	48	14.5	132	
	Selumetinib	5	29	14.6	165	126.5
		15	67	15.0	140	110
		25	25	15.1	152	120.5
		50	49	14.6	186	143
		75 [P]	47	14.0	165	121
		100 [P]		14.4	++	
	Methyl methanesulfonate	2.5	95	12.0	83	53
		5	194	14.0	96	71

[P] Precipitating dose
++ Not chosen for cloning

Report Title: AZD6244: Genetic Toxicity Evaluation Using a Limited Mouse Lymphoma Cell Thymidine Locus and *in vitro* Micronucleus Assay

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Test for induction of: Gene mutation and chromosome aberrations.

Number of independent assays: 4

Study number: 0480QV

Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c

Number of replicate cultures:
4 (control)
1 (Selumetinib)
2 (positive control)

GLP compliance: No

Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9

Number of cells analysed/culture:
10 x 10^6 (3 hour treatment)
4 x 10^6 (24 hour treatment)

Testing Facility: AstraZeneca, UK

Vehicles: **For Test Article:** DSMO

For positive controls: DMSO

Treatment: Assay 1, 3 hours in the presence and absence of S9. Assay 2, 24 hours in the absence of S9. Assay 3, 16 hours in the absence of S9.

Date of treatment: [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: Testing to a concentration of 160 µg/mL gave 4%, 49% and 4% survival following 3 hours exposure in the presence and absence of S9, and 24 hours exposure in the absence of S9, respectively.

Genotoxic effects: Small increases in the number of micronuclei were seen following treatment with Selumetinib (formerly referred to as AZD6244). However, these did not reproducibly fulfil the criteria for a positive response.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Assay 1: 3 hour exposure				
			Cloning efficiency (%)	Relative total growth	Mutant Frequency x 10^{-6}	Small colonies (%)	Micrococlei per 1000 cells
Without activation	Control	0	109	100[1]	58[1]	67	2[2]
	Selumetinib	34	94	80	68	39	3
		42	103	87	71	58	3
		52	108	92	70	59	2
		66	116	79	60	56	1
		82	110	63	69	48	2
		102	98	35	24	56	2
		128[P]	83	8	56	18	2
		160[P]	83	6	49	60	4
	4-nitroquinoline-1-oxide mmol/L	0.001 mmol/L	50.5	23[1]	1211[1]	54	87[2]
With activation	Control	0	111	100[1]	54[1]	67	2[2]
	Selumetinib	34	100	85	64	43	1
		42	88	83	69	41	3
		52	88	74	69	73	3
		66	110	77	61	58	1
		82	87	41	63	75	4
		102	77	20	68	68	4
		128	73	9	104	37	7
		160	51	4	85	56	4
	Cyclophosphamide	0.01 mmol/L	75.5	46[1]	719[1]	51	47[2]

[1] Mean values from pooled microwell plate counts, not the arithmetic mean of replicates.　[2] Arithmetic mean.

[P] Precipitate seen at the end of treatment incubation.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Assay 2: 24 hour exposure				
			Cloning efficiency (%)	Relative total growth	Mutant Frequency x 10^{-6}	Small colonies (%)	Micrococlei per 1000 cells
Without activation	Control	0	91	100[1]	54[1]	56	3[2]
	Selumetinib	34	87	79	54	53	1
		42	114	80	46	63	2
		52	87	55	67	57	3
		66	87	41	44	79	6
		82	77	26	42	83	5
		102	91	16	45	80	2
		128 [P]	53	4	82	63	6
		160 [P]	80	4	61	50	2
	4-nitroquinoline-1-oxide	0.00033 mmol/L	71	34[1]	611[1]	57	21[2]

[1] Mean values from pooled microwell plate counts, not the arithmetic mean of replicates. [2] Arithmetic mean.

[P] Precipitate seen at the end of treatment incubation.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Assays 3 & 4: 16 hour exposure	
			Relative Suspension Growth	Micronuclei per 1000 cells
Without activation	Control	0	100	3[1]
	Selumetinib	46	75	1
		92	58	7
		137	29	4
		183	13	6
		229[P]	6	7
		275[P]	4	9
	4-nitroquinoline-1-oxide	0.001 mmol/L	3	106
	Carbendazim	0.1 mmol/L	5	24
Without activation	DMSO	0	100	4[2]
	Selumetinib	46	91	3
		92	51	3
		137	21	3
		183	9	6
	4-nitroquinoline-1-oxide	0.001 mmol/L	21	77
	Carbendazim	0.1 mmol/L	25	11

[1] Mean values from pooled microwell plate counts, not the arithmetic mean of replicates. [2] Arithmetic mean.
[P] Precipitate seen at the end of treatment incubation.

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

Report Title: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test　　**Test Article: Selumetinib free base**

Test for induction of: Bone-marrow micronuclei (MN)

Treatment schedule: Single dose

Study number: AA78NV.123.BTL

Species / Strain:
Mouse / ICR

Sampling time: 24 and 48 hours after dosing

GLP compliance: Yes

Age: Approximately 6-8 weeks old

Method of administration:
Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted], USA

Cells evaluated: Micronucleated Polychromatic Erythrocytes (PCEs)

Vehicle / Formulation: 20% aqueous solution HPBCD

Date of dosing: [redacted] 20[redacted]

Number of cells analysed/animal: 2000

Special features: None.

Selumetinib was formerly referred to as ARRY-142886.

Toxic/cytotoxic effects: None.

Genotoxic effects: A nominal dose of 2000 mg/kg induced a significant increase in the number of micronucleated polychromatic erythrocytes in both male and female ICR mice.　Selumetinib showed evidence of mutogenic activity and was concluded to be positive in the mouse micronucleus assay.

Evidence of exposure: Dosing formulations for the mid and high dose concentrations were significantly different from the theoretical values. Both samples at concentrations of 50 and 100 mg/mL were approximately 31% and 34% off from the theoretical values leading to the conclusions that animals were exposed to doses of approximately 670 and 1300 mg/kg instead of 1000 and 2000 mg/kg, respectively. However, based on the bone marrow analysis, the bone marrow was exposed and saturated with the test article at the high dose, therefore the analytical results and observed deviation from nominal concentrations did not adversely impact the integrity of the study.

Sampling time	Test Article	Dose (mg/kg)	Number of Animals	Micronucleated PCEs/ 1000PCEs: Male	Female
24 hour	Vehicle	20 mL/kg	5M + 5F	0.4	0.5
	Selumetinib	500	5M + 5F	0.3	0.5
		1000	5M + 5F	0.7	0.5
		2000	5M + 5F	2.5*	2.9*
	Cyclophosphamide	50	5M + 5F	19.3*	21.5*
48 hour	Vehicle	20 mL/kg	5M + 5F	0.6	0.4
	Selumetinib	2000	5M + 5F	0.6	0.9

M = male,　F = female.
Analysis conducted using Kastenbaum-Bowman Tables ; * $p<0.05$.

Report Title: AZD6244: Genetic Toxicity Evaluation using the Mouse Micronucleus Test after a Single Oral Dose

Test Article: Selumetinib free base

Test for induction of: Bone-marrow micronuclei (MN)

Treatment schedule:
Phase 1 and 2: Single dose

Study number: 0156QM

Species / Strain:
Mouse / Alpk:APfCD-1

Sampling time:

Phase 1: 24 + 48 hours after dose
Phase 2: 24 hours after dose

GLP compliance:

Main study: Yes
Centromeric labelling: No

Age: 5 to 6 weeks at start of dosing

Method of administration:
Oral (gavage)

Testing Facility: AstraZeneca, UK

Cells evaluated: Immature erythrocytes (IEs)

Vehicle / Formulation: Water containing 20% w/v hydroxypropyl-β-cyclodextrin

Date of dosing: [redacted] 20[redacted]

Number of cells analysed/animal:
2000 or 6000

Special features: Centromeric labelling was conducted under study number 0120KY. Investigative work to determine whether induction of micronuclei in the bone marrow of mice by AZD6244 free-base was a consequence of chromosome breakage (clastogenicity) or chromosome loss (aneugenicity).

Toxic/cytotoxic effects: None.

Genotoxic effects: In Phase 1, Selumetinib (formerly referred to as AZD6244) induced statistically and biologically significant increases in micronucleated immature erythrocytes (MIE) in the bone marrow of male Alpk;Apf CD-1 mice after a single oral dose of 500, 1000 and 2000 mg/kg, the maximum tolerated dose. The increase was seen at 24 hours after dosing but not at 48 hours.
In Phase 2, there was no observable increase in MIE in bone marrow of male Alpk;Apf CD-1 mice after a single oral dose of 50, 160 and 500 mg/kg. It was concluded that Selumetinib induced statistically and biologically significant increases in MIE at the two highest doses of 1000 and 2000 mg/kg but was equivocal at 500 mg/kg. The no-observable effect level (NOEL) was 160 mg/kg.

Evidence of exposure: Plasma concentrations of AZD6244 were highest in the 1h plasma samples in all groups. Peak mean observed concentrations were in the range 18-32 μg/mL. There was no clear evidence of an increase in peak exposure across the dose range 500 to 2000 mg/kg suggesting that dose limiting absorption occurs at and above 500 mg/kg.

Centrometic labelling findings: Centromeric positive stained micronuclei were present in significant numbers in animals from all AZD6244 dosed groups. This suggests that AZD6244 induces micronuclei via an aneugenic, rather than clastogenic, mechanism.

Test Article	Dose (mg/kg)	Number of Animals	Mean number of MIE in 2000/ 6000IE				Mean % of IEs	
			24 hour		48 hour		24 hour	48 hour
			2000	6000	2000	6000		
Phase 1								
Vehicle	20 mL/kg	7M	3.6	6.9 (2.3)	2.6	8.0 (2.7)	60.2	60.9
Selumetinib	500	7M	5.3	5.3 (5.1)**[1]			65.1	
	1000	7M	6.6	19.7 (6.6)***[1]			63.8	
	2000	7M	6.6	16.3 (5.4)**[1]	2.7	7.6 (2.5)[1]	62.0	58.8
Cyclophosphamide	65	3M	32.0	105 (35)***[2]			56.5	
Phase 2								
Vehicle	20 mL/kg	7M	2.4				65.4	
Selumetinib	50	7M	3.1				62.6	
	160	7M	3.0				61.4	
	500	7M	3.3				59.7	
Cyclophosphamide	65[3]	3M	40.7***[2]				56.5	

M = male.　MIE = micronucleated IEs

***[1]　Extended counts of 4000 IE's were performed and added to the initial 2000 count to give a combined count of 6000 IE, in brackets this number is expressed out of 2000 for comparative purposes. Average square root transformation was performed, ANOVA on transformed counts was carried out at the 5% level, $p<0.001$ ** $P<0.01$

***[2]　Fishers Exact Test $p<0.001$

[3]　Slides coded into the study from phase 1.

Group and Dose level details for 0120KY		Total Micronuclei			Individual micronuclei	
		Total Micronuclei per 1000 cells	Centromere positive per 1000 cells	Percentage centromere positive	Centromere positive per 1000 cells	Percentage centromere positive
Vehicle	20 mL/kg	2.2	0.23	11	0.00	0
Selumetinib	160 mg/kg	1.35	0.15	11	NC	NC
	500 mg/kg	3.6	1.66	47	1.44	110
	1000 mg/kg	5.2	2.0	39	1.77	59
	2000 mg/kg	3.0	0.72	25	0.49	61

NC　Not calculated as total micronuclei values were less than vehicle controls.

2.6.7.10　がん原性試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Mouse / CByB6F1 Hybrid (non-transgenic littermates)	Oral (gavage) (suspensions in 10% ethanol / 30% PEG 400 / 60% Phosal 50)	1 day 7 days	25 50 100 200 350 0 25 75 150 Animals were dosed twice daily, 12 hours apart.	2 M + 2 F 3 M + 3 F	Not reported	Oral administration of selumetinib (formerly referred to as AZD6244) twice daily for 1 day to CByB6F1 Hybrid mice at doses up to 350 mg/kg BID (700 mg/kg/day) was well tolerated. Oral administration of selumetinib twice daily for 7 days at doses of 75 or 150 mg/kg BID (150 or 300 mg/kg/day) was not tolerated and caused mortalities or early terminations in males (≥75 mg/kg BID) and females (150 mg/kg BID) due to clinical signs and adverse effects on body weight (losses or reduced gain). Twice daily dosing for 7 days at 25 mg/kg BID (50 mg/kg/day) in males and up to 75 mg/kg BID (150 mg/kg/day) in females was tolerated with no notable clinical signs or no apparent effects on body weight, gross pathology findings effects, or organ weights.	[redacted], USA	20062136

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Mouse/ CByB6F1 Hybrid (non-transgenic littermates)	Oral gavage (10% Ethanol, 30% Polyethylene Glycol 400, 60% Phosal 50 PG)	Twice daily for 28 days (12 hours ± 1 hour apart)	Males: 0, 25, 37.5, 50 Females: 0, 50, 75, 100	Main Groups 1-4: 10M/10F Satellite Groups 1-4 Toxicokinetics Day 1: 3M/3F Group 1 and 9M/9F Groups 2-4 Satellite Groups 1-4 Toxicokinetics Day 28: 3M/3F Group 1 and 6M/6F Groups 2-4	Not identified in females; 25 mg/kg BID in males	Mortality (100 mg/kg BID females). Body weight losses (≥ 50 mg/kg BID females). Decreased food consumption (≥75 mg/kg/BID females) Non-adverse increases in AST, phosphorus, and potassium (37.5 mg/kg BID males and 50 mg/kg BID females); decreases in albumin (50 mg/kg BID males and ≥ 50 mg/kg BID females); increases in ALT and decreases in total protein and A/G ratio (≥ 50 mg/kg BID females); and an increase in globulin (100 mg/kg BID females). Non-adverse increases in neutrophils and monocytes (≥ 25 mg/kg BID males) and reticulocytes (37.5 mg/kg BID males); decreases in erythrocytes, hemoglobin, and hematocrit with increases in platelets (50 mg/kg BID males and ≥ 50 mg/kg BID females); and increases in red cell distribution width (100 mg/kg BID females) consistent with inflammation and/or possible bleeding that correlated with erosion/ulceration observed microscopically in the stomach, cecum, and colon (males ≥ 37.5 mg/kg BID and females ≥ 50 mg/kg BID). Estrus cycle shift (females ≥ 75 mg/kg BID) that correlated with reduced uterine and potentially with reduced ovarian weights (≥ 50 mg/kg BID).	[redacted], USA	20062137

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Duration of dosing	Doses (mg/kg)	Gender and number per group	NOAEL[a] (mg/kg)	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Rat / HanWistar CRL:WI (Han)	Oral (gavage) (suspensions in 10% ethanol / 30% PEG 400 / 60% Phosal 50)	4 days (MTD) DRF 14 days	Male 15 50 100 Females 100 150 200 Males 0 7.5 15 25 Females 0 25 50 100	3 M + 3 F for both phases	Not reported	Oral administration of selumetinib to rats for 4 days resulted in premature euthanasia of males due to adverse clinical signs at 50 and 100 mg/kg/day. There were changes in white blood cell count and plasma chemistry parameters. Macroscopic findings were noted in the mesenteric lymph nodes, heart and lungs in males at dose levels >15 mg/kg/day and in females at dose levels >100 mg/kg/day. Fluid accumulation was noted in the thoracic cavity in males at 50 or 100 mg/kg/day and females receiving 150 and 200 mg/kg/day and in the trachea of males at all dose levels and females at 100 mg/kg/day. In addition in decedent animals abnormal content in the stomach (fluid) and prominent lobular architecture and/or discolouration of the liver was noted at 50 or 100 mg/kg/day. Administration of selumetinib for 14 days resulted in scabs on the skin of females at all dose levels, a reduction in body weight gain in females receiving 50 or 100 mg/kg/day, changes in white blood cell count in males receiving 25 mg/kg/day and females receiving 25, 50 or 100 mg/kg/day and changes in plasma chemistry parameters in males receiving 25 mg/kg/day and females receiving 50 or 100 mg/kg/day. Macroscopic findings were noted in the lungs and/or trachea of males at dose levels ≥7.5 mg/kg/day and in females at or above 150 mg/kg/day.	[redacted], UK	528072

Studies 20062137 contain GLP statements. Studies 20062136 and 528072 do not claim GLP-compliance.

M male F female ALT alanine aspartate aminotransferase AST Aspartate aminotransferase MTD Maximum tolerated dose
DRF Dose range finding. BID Twice daily dosing [a] No Observed Adverse Effect Level

Report Title: AZD6244: 3 Month Oral (Gavage) Toxicity Study in the Rat

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain: Rat / Han Wistar CRL:WI(Han)

Duration of dosing: up to 91/92 days

Study number: 528088

Age at start of dosing: 6 to 7 weeks

Duration of post-dose: None

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted] Ltd., UK

Special features: None.

Vehicle / Formulation: Solution in 10% ethanol, 30% PEG 400 and 60% Phosal 50

No observed adverse-effect level: Males: 2.5 mg/kg/day; females: not determined.

Conclusion: Oral administration of selumetinib (formerly referred to as AZD6244) to male rats at 20 mg/kg/day and female rats at 25 or 50 mg/kg/day was not well tolerated and resulted in the unscheduled euthanasia of 2 females at 50 mg/kg/day on Day 26, and the scheduled early euthanasia of all males at 20 mg/kg/day and all females at 25 or 50 mg/kg/day on Day 30 due to adverse clinical signs.

Doses of 1, 2.5, 5 or 10 mg/kg/day (males) and 2.5, 5 or 12.5 (females) were well tolerated systemically for up to 3 months. Clinical signs including skin lesions and / or scabs, ungroomed and/or erected fur and thin fur cover were noted at all dose levels. Selumetinib-related histopathological changes were present in the liver and / or kidney at all dose levels, in the skin at 2.5 mg/kg/day, in the stomach at 5 mg/kg/day and above, in the bone, heart and lung at 10 mg/kg/day and above, aorta and tongue at 20 mg/kg/day and above. Vascular mineralisation of the mesenteric lymph node was present only in females at 25 mg/kg/day and above.

As the kidney mineralisation in males receiving 1 or 2.5 mg/kg/day was considered non-adverse the no-observed adverse-effect dose level (NOAEL) for males was considered to be 2.5 mg/kg/day, however in females due to the presence of skin ulceration at all dose levels a NOAEL was not determined.

Daily Dose (mg/kg)		0 (Vehicle)		1	2.5		5		12.5	10	25#	20#	50#
Number of Animals		M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Toxicokinetics [a]:													
Day 28				58.1	193	95.3	408	257	660	429	806	1010	1650
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µmol.h/L)				3.46	16.8	6.04	27.7	18.2	54.7	26.8	54.2	59.4	100
C_{max} (µmol/L)													
Week 13													
$AUC_{(0\text{-}24h)}$ (µmol.h/L)				59.3	188	137	404	286	537	546	ND	ND	ND
C_{max} (µmol/L)				3.78	16.4	9.82	32.9	18.8	43.9	32.5	ND	ND	ND
Noteworthy Findings													
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Terminated Early (Day 30)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	8
Body Weight Gain (%) [b]		(g)											
Days 1 – 29		114	55	+28.9*	+25.5	+19.3	+14.5	+1.8	+1.8	-3.5	-3.6	+0.9	-36.4*
Days 1 – 92		223	95	+15.7	+18.9**	+10.8	+11.6	-5.4	0	-8.1	ND	ND	ND
Water Consumption (%) [b]		(g/animal/day)											
Days 8 – 15		35.0	24.2	+11.1	+2.9	+7.4	+3.7	+2.0	+13.6	0	+33.9***	+8.0	+50.4***
Clinical Observations [c]		-	-	+	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++
Haematology													
Week 4													
Haemoglobin	(g/dL)	15.8	15.3	14.9**	14.8	15.1	14.9	15.6	15.0	15.5	13.6***	15.2	13.7**
Haematocrit	(L/L)	0.483	0.466	0.440***	0.435*	0.442***	0.431**	0.480	0.460	0.473	0.426**	0.469	0.433
Monocytes	(10^9/L)	0.16	0.08	0.15	0.12	0.15	0.12	0.15	0.24**	0.17	0.45***	0.47**	0.66***
Neutrophils	(10^9/L)	1.30	0.75	1.23	1.04	1.30	1.22	1.48	2.77**	1.82	5.78***	6.12**	8.59***
Platelets	(10^9/L)	661	672	813*	750	746	772	629	727	611	963**	748	1223***
Red blood cells	(10^{12}/L)	8.46	8.29	7.87**	7.84*	7.92*	7.98	8.57	8.13	8.38	7.56**	8.38	7.77
Reticulocytes	(10^9/L)	157.7	167.7	207.0*	173.8	206.6*	139.1	152.4	143.9	149.7	248.6	201.2	202.8
White blood cells	(10^9/L)	7.69	5.37	7.68	4.97	7.39	4.53	7.07	6.25	6.99	9.88	11.38	13.54*
Week 13													
Haemoglobin	(g/dL)	15.3	14.5	15.2	14.3	14.9	13.9	14.9	13.5**	14.4***	ND	ND	ND
Haematocrit	(L/L)	0.452	0.450	0.438	0.416**	0.430*	0.406***	0.436	0.430	0.421***			
Monocytes	(10^9/L)	0.10	0.05	0.10	0.10	0.09	0.12*	013	0.29***	0.17			
Neutrophils	(10^9/L)	0.99	0.55	1.20	1.27	1.14	2.62**	1.58	6.00***	2.44*			
Platelets	(10^9/L)	708	591	691	665	612*	671	727	867***	746			
Red blood cells	(10^{12}/L)	8.68	8.13	8.44	7.57**	8.35*	7.54**	8.62	7.70	8.23**			
Reticulocytes	(10^9/L)	195.1	153.1	208.3	258.5***	201.8	262.3***	162.1	213.3	161.9			
White blood cells	(10^9/L)	5.53	4.27	6.49	4.32	5.42	5.23	5.82	9.72**	6.34			

Daily Dose (mg/kg)		0 (Vehicle)		1	2.5		5		12.5	10	25#	20#	50#
Number of Animals		M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Serum Chemistry													
Week 4													
A/G ratio		3.7	3.1	2.9*	3.1	2.7***	3.0	3.2	2.3*	3.0	1.4***	2.1***	1.1**
Albumin	(g/L)	48	49	44**	45	43***	45	47	41**	45	34***	39***	32***
ALT	(U/L)	87	49	68	53	71	53	78	60	83	67*	79	74
AST	(U/L)	76	84	73	76	74	77	82	105	83	125***	93**	118
Globulin	(g/L)	13	16	15	15	16*	15	15	19	15	25**	19***	28*
Phosphate	(mmol/L)	1.94	1.44	2.02	1.60	2.01	1.72	1.99	1.73	1.98	1.83**	2.25	2.39***
Total protein	(g/L)	61	65	59	60*	59	60**	61	60**	60	59***	58*	59*
Week 13													
A/G ratio		2.8	3.5	2.4*	2.6	2.4*	2.3**	2.5	1.5***	2.2***	ND	ND	ND
Albumin	(g/L)	46	51	45	47	45	45*	45	36***	42**			
ALT	(U/L)	73	47	64	56	57*	50	66	59*	77			
AST	(U/L)	70	66	68	71	72	76	76	91***	87**			
Globulin	(g/L)	17	15	19*	18	19*	20*	18	25***	20**			
Phosphate	(mmol/L)	1.42	1.09	1.66*	1.50*	1.46	1.51	1.39	1.65**	1.49			
Total protein	(g/L)	63	66	64	65	64	65	62	61**	62			
Urinalysis (Week 4)													
NAG/creatinine ratio		3.7	2.5	3.6	2.7	3.0	2.4	3.5	2.6	3.6	3.3*	3.5	3.9***
Protein/creatinine ratio		71.17	43.41	106.72	47.72	79.56	52.43	72.92	39.64	89.04	57.23	75.45	85.99***
Organ Weights (%) [b,d]		(g)											
Adrenal gland		0.0550	0.0653	+1.6	+10.3	-2.4	+14.2	-7.1	+25.7**	-12.2	0.0680	0.0537	0.0667
Heart		1.220	0.780	+0.08	+2.5	-5.6	+2.2	-11.9*	+3.8	-14.0**	0.728	0.975	0.667
Kidneys		2.290	1.620	+14.1*	+6.9	+6.4	+8.9	-1.0	+14.2	-3.3	1.723	1.982	1.670
Spleen		0.706	0.561	-4.4	-14.4	-10.8	-14.1	-18.6**	+10.3	-24.2***	0.495	0.507	0.415
Gross Pathology													
Number examined		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8
Skin													
Scabs		0	0	0	3	0	8	1	10	2	10	7	8
Histopathology													
Number examined		10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	8
(unless otherwise indicated)													
Aorta				(0)	(0)	(0)	(0)						
Mineralisation													
Minimal		0	0					0	0	0	0	0	1
Mild		0	0					0	0	0	0	1	0
Moderate		0	0					0	0	0	1	1	0

Daily Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)		1	2.5		5		12.5	10	25#	20#	50#
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Bone, femur				(0)		(0)						
Dysplasia, physis												
Minimal	0	0	0		0		0	0	4	0	9	0
Mild	0	0	0		0		0	0	0	0	1	0
Bone marrow, femur			(0)		(0)							
Decreased cellularity												
Minimal	0	0		0		0	0	0	0	4	0	3
Mild	0	0		0		0	0	0	0	0	0	2
Increased haematopoiesis												
Mild	0	0		0		0	0	3	0	2	0	0
Heart			(0)	(0)	(0)	(0)						
Mineralisation, vascular												
Minimal	0	0					0	0	2	1	4	0
Mild	0	0					0	0	0	0	2	0
Kidneys												
Basophilia, tubular												
Minimal	1	9	2	8	2	8	3	6	7	6	4	5
Mild	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0
Mineralisation, increased												
Minimal	0	0	6	1	8	1	2	2	4	3	1	7
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mineralisation, vascular												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	1
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2
Liver				(0)		(0)						
Mineralisation												
Minimal	0	0	1		0		1	0	22	1	0	0
Mild	0	0	0		0		1	0		0	1	0
Lung			(3)	(1)	(2)	(3)						
Mineralisation, vascular												
Minimal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Mesenteric lymph node				(0)		(0)						
Mineralisation, vascular												
Minimal	0	0	0		0		0	0	0	0	0	2
Mild	0	0	0		0		0	0	0	0	0	3
Moderate	0	0	0		0		0	0	0	1	0	1

Daily Dose (mg/kg)	0 (Vehicle)		1	2.5		5		12.5	10	25#	20#	50#
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Skin												
Ulceration												
Minimal	0	1	0	1	0	3	0	3	1	2	1	1
Mild	0	0	0	2	0	3	1	7	2	7	5	2
Moderate	0	0	0	0	0	2	0	2	0	4	1	8
Stomach												
Mineralisation, mucosal +/- mural, glandular												
Minimal	0	0	0	0	0	0	2	8	7	7	1	0
Mild	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	7	4
Moderate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Tongue			(0)	(0)	(0)	(0)						
Mineralisation												
Mild	0	0					0	0	0	0	2	0
Moderate	0	0					0	0	0	1	0	0

M male, F female.

terminated on Day 30

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked.

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$. Body weight, water consumption and organ weight data analysed using Dunnett's test; haematology and serum chemistry data using Dunn's test. Statistical analysis was not performed on organ weight data for animals terminated on Day 30.

[a] No selumetinib or its metabolites N-desmethyl selumetinib and selumetinib amide were detected in control animals.

[b] 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).

[c] The predominant clinical signs noted were skin lesions and / or scabs which were observed in females at all dose levels and in males at 5 mg/kg/day and above. Ungroomed and/or erected fur, thin fur cover and sporadic incidences of increased vocalisation, irregular respiration rate, ploughing and salivation were also noted at all dose levels.

[d] Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Displayed figures are for the absolute organ weight effects. Actual mean organ weights shown for animals terminated on Day 30.

Report title AZD6244: Two Year Oral (Gavage) Carcinogenicity Study in the Rat

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain: Rat / Han Wistar Crl:WI(Han)

Duration of dosing: 104 Weeks

Study number: 501094

Age at start of dosing: Approximately 7 to 9 weeks

Duration of post-dose: N/A

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Testing Facility: [redacted], UK.

Basis for high-dose selection: The high dose level was selected to provide corresponding safety margins of 11.75 fold for males and 5.96 fold for females in respect of the clinical dose of 75 mg (BD daily dose).

Vehicle / Formulation: 10% ethanol, 30% PEG 400 and 60% Phosal 50

Special features: An additional control group (Milli-Q water) was used in this study as Group 1.

Conclusion: Administration of selumetinib (formerly known as AZD6244) by oral gavage once daily for up to 104 weeks to male rats at doses of 0.25, 0.8 and 2.5 mg/kg/day and female rats at 0.1, 0.3 and 1 mg/kg/day was well tolerated. Selumetinib was not associated with any increase in the incidence of palpable masses or neoplastic or pre-neoplastic findings. The only histopathology findings were erosions/ulcers in the skin at 0.8 mg/kg/day or above in males and females and in the mesenteric lymph node (erythrophagocytosis/erythrocytosis) at 2.5 mg/kg/day in males.

Daily dose (mg/kg/day)[a]	0 (Milli-Q Water)		0 (Vehicle)		0.25/0.1		0.8/0.3		2.5/1	
Number of Animals	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50	M: 50	F: 50
Toxicokinetics (Week 52)[b]:										
Mean $AUC_{(0\text{-}t)}$ (µmol.h/L)					15.1	7.80	48.5	28.8	175	135
Mean C_{max} (µmol/L)					0.952	0.643	4.10	2.31	14.3	9.43
Noteworthy Findings										
Premature Kill[c]	18	12	20	14	15	11	17	12	15	14
Body Weight Gain (Day 1- 729)[d]	472.2	216.6	459.9	221.9	-2.9	-5.8	-3.2	-5.8	5.5	-4.6
Clinical Observations[e]	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Haematology (Week 105-106)[d]										
Absolute Reticulocytes (10^9/L)	190.07	191.67	202.69	183.33	0.94*	1.06	0.94***	1.04	0.79***	0.98
Reticulocytes (%)	2.20	2.56	2.36	2.40	1.10*	1.05	1.09***	1.04	0.81***	0.99
Histopathology										
Skin (No. examined)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Erosion/ulcer	0	0	2	3	0	2	4	3	6	4
Minimal	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
Mild	0	0	0	1	0	0	2	1	4	1
Moderate	0	0	2	1	0	1	2	2	1	1
Marked	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Erythrophagocytosis/ Erythrocytosis	9	2	14	5	15	7	12	10	21	5
Minimal	3	2	8	3	12	3	7	7	12	2
Mild	2	0	5	0	3	0	5	3	4	0
Moderate	4	0	1	2	0	3	0	0	4	3
Marked	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0

M = male, F = female, - No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked, * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$

Body weight data was analysed using Dunnett's Test. Haematology data was analysed using a Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA, pairwise comparisons, against group 2 only, were made using Dunn's test

[a] The male dose levels were 0.25, 0.8 or 2.5 mg/kg/day and the female dose levels were 0.1, 0.3 or 1 mg/kg/day.

[b] n is 10 for male and female groups (5 animals per sex per timepoint); one composite TK profile/sex/dose.

[c] There were no statistically significant differences (Kaplan-Meier) in mortality between any of the groups and the vehicle control for males or females.

[d] For controls, group means are shown. There was no difference between control groups, so for the selumetinib groups the percentage difference from vehicle control is shown.
[e] Selumetinib-related clinical observations were limited to skin scabs and fur staining (yellow) in males and females at all dose levels, however with higher incidences in males at 2.5 mg/kg/day and females at 0.3 or 1 mg/kg/day.

Report Title: AZD6244: A 6-month Oral Carcinogenicity Study in CByB6F1/Tg rasH2 Hemizygous Mice

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Species / Strain: Mouse / CByC6F1/Tg rasH2 Hemizygous

Duration of dosing: 6 months

Study number: 20086561

Age at start of dosing: 8 weeks

Method of administration: Oral (gavage), BID

GLP compliance: Yes

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Vehicle / Formulation: 10% ethanol, 30% PEG 400, and 60% Phosal 50 PG

Testing Facility: [redacted], Inc., [redacted], [redacted], United States

Basis for high-dose selection: For males, based on lower urinary tract effects observed in a CD-1 six month mouse study that have the possibility to translate to the CByB6F1-Tg(HRAS)2Jic Hemizygous mouse. For females, based on gastrointestinal tract pathology and effects on body weight. The dose levels were approved by the FDA's Carcinogenicity Assessment Committee

Treatment of controls: Reverse osmosis deionized water or 10% ethanol, 30% PEG 400, and 60% Phosal 50 PG

Special features: A positive control group consisting of 15 males and 15 females was dosed intraperitoneally with 7.5 mg/mL N-Nitrosomethylurea (NMU) in citrate-buffered saline on Day 1 only.

Conclusion: Twice daily oral dosing (approximately 12 hours apart) of selumetinib (formerly known as AZD6244) at 25 mg/kg (50 mg/kg/day) or 8 mg/kg (16 mg/kg/day) and to CByB6F1/Tg rasH2 hemizygous mice caused death/early termination of some animals due to adverse clinical signs and/or body weight losses. Due to unexpected toxicity consisting of mortality and body weight losses at 25 mg/kg BID (50 mg/kg/day), the dose level was reduced to 15 mg/kg BID (30 mg/kg/day) for the high dose beginning on Day 130 (Week 19). There were no selumetinib-related gross pathology or neoplastic histological findings in premature decedents or at scheduled termination, after 6 months dosing twice daily at 3, 8, or 25/15 mg/kg (6, 16, 50/30 mg/kg/day). Therefore, selumetinib was not carcinogenic in CByB6F1/Tg rasH2 hemizygous mice. The results for the positive control group (N-methyl-N-nitrosourea [NMU] in acidified saline) indicate that the assay was robust. Non-neoplastic microscopic findings related to selumetinib were noted in the cecum (crypt hyperplasia in males and females administered ≥ 8 mg/kg BID); colon (crypt hyperplasia in males administered ≥ 3 mg/kg BID and females administered 25/15 mg/kg BID and diverticulum in males and females administered 25/15 mg/kg BID); and spleen (increased pigmented macrophages females administered ≥ 3 mg/kg BID).

Daily dose (mg/kg BID)	0 (Water)		0 (Vehicle)		3		8		25/15 [a]	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals: At start main study (TK)	25 (12)	25 (12)	25 (12)	25 (12)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)
Toxicokinetics: [b] Selumetinib Day 1 $AUC_{(0-t)}$ (µmol.h/L) C_{max} (µmol/L) Day 176 $AUC_{(0-t)}$ (µmol.h/L) C_{max} (µmol/L) N-desmethyl selumetinib Day 1 $AUC_{(0-t)}$ (µmol.h/L) C_{max} (µmol/L) Day 176 $AUC_{(0-t)}$ (µmol.h/L) C_{max} (µmol/L)					 18.5 5.34 12.5 3.99 5.66 1.53 3.17 0.929	 26.0 6.63 23.7 5.30 4.08 0.807 4.17 0.711	 43.5 16.2 31.9 10.8 14.1 4.03 6.52 2.35	 68.7 19.8 83.9 22.7 10.7 2.62 8.44 1.67	 147 42.4 102 26.2 38.7 9.42 12.0 3.59	 244 61.0 155 25.4 29.9 6.37 11.3 1.97
Noteworthy Findings										
Died/sacrificed moribund [c]: Main TK	 1 (AD) 0	 0 0	 0 0	 0 1 (FD)	 0 0	 0 2 (FD)	 0 4	 1 0	 3 4 (UE,FD)	 0 1 (UE)
Terminal sacrifice (Main)	24	25	25	25	25	25	25	24	22	25
Survival (%): Kaplan-Meier Analysis	100	100	100	100	100	100	100	96	88	100
Body Weight Gain (%) [d]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food consumption (%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations [e]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Number of animals with neoplastic lesions (not test related): Brain Astrocytoma [M]	 1	 0	 0	 0	 0	 0	 0	 0	 0	 0

Daily dose (mg/kg BID)	0 (Water)		0 (Vehicle)		3		8		25/15 [a]	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals: At start main study (TK)	25 (12)	25 (12)	25 (12)	25 (12)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)
Harderian gland Adenoma [B]	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0
Lung Bronchioloalveolar Adenoma [B]	5	4	4	5	0	0	0	0	0	0
Spleen Hemangiosarcoma [M]	1	1	2	0	0	0	1	0	0	0
Stomach Papilloma, squamous cell [B]	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
Tongue Papilloma, squamous cell [B]	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Thymus Thymoma [B] Thymoma [M]	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	1 0	1	0 0	0 0	0 0
Noteworthy findings: Gross pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology - non-neoplastic lesions Large intestine, cecum Hyerplasia, crypt Minimal Mild	 0 0	 1 0	 0 0	 1 0	 0 0	 0 0	 1 0	 1 1	 2 0	 1 0
Large intestine, colon Hyerplasia, crypt Minimal Mild Moderate Diverticulum, atypical, cystic Minimal Mild	 0 0 0 0 0	 0 0 0 0 0	 0 0 0 0 0	 0 0 0 0 0	 0 1 0 0 0	 0 0 0 0 0	 1 2 0 0 0	 0 0 0 0 0	 3 3 1 0 2	 1 6 0 3 3

Daily dose (mg/kg BID)	0 (Water)		0 (Vehicle)		3		8		25/15 [a]	
Gender	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
Number of animals: At start main study (TK)	25 (12)	25 (12)	25 (12)	25 (12)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)	25 (18)
Spleen Increased cellularity pigmented macrophages Minimal Mild	 0 0	 0 0	 2 0	 5 0	 0 2	 11 0	 2 0	 17 4	 3 2	 11 4

M male; F female; BID = twice daily 12 hours apart; TK = toxicokinetic. AD: accidental death, UE: unscheduled euthenia, FD: found dead

Lesions:

B: Benign; M: Malignant

- No noteworthy findings;

Body weight gain and food consumption data were analysed using T-test or Wilcoxon: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

[a] Due to mortality, the dose level was reduced from 25 mg/kg BID to 15 mg/kg BID beginning on Week 19, Day 130.

[b] An additional 18 males and 18 females were assigned to each selumetinib dosed group, and an additional 12 males and 12 females were assigned to each control group, for toxicokinetic analyses on Day 1 and Week 26 (Day 176). No selumetinib was detected in control animals.

[c] Three main study 25 mg/kg BID males and 1 main study 8 mg/kg BID female were killed (Day 89 or 90) due to clinical observations (decreased activity, hunched posture, tremors, and/or cold to touch). There was additional mortality in 3 TK 25 mg/kg BID males and 1 TK 25 mg/kg BID female indicating this dose was not tolerated. Mortality also occurred in 4 TK 8 mg/kg BID males; clinical signs in 2 of these 4 TK animals were similar to main study animals. Other morality in TK animals unrelated to selumetinib included a perforation of the esophagus in one 25 mg/kg BID male, complications due to blood collection in 1 vehicle control and one 3 mg/kg BID female, and an undetermined cause of death in one 3 mg/kg BID female. The death of 1 main study water control male was considered accidental (abnormal gait/apparent injury; hemorrhage, sublumbar muscle).

[d] There were no apparent selumetinib-related differences in mean body weights for main study mice. For the TK animals administered 25/15 mg/kg BID, mean body weight gain was lower beginning on Day 85 (Week 13) for males and females with another notable decrease from Days 106 to 113 as compared to controls. Following a dosing holiday from Days 114 or 116 to 130, there was a notable increase in mean body weight gain (from Days 113 to 120 continuing through Day 134) indicating at least a partial recovery prior to resuming dose administration for the TK animals on Day 130.

[e] There were no apparent selumetinib-related clinical observations in animals surviving to study termination.

2.6.7.11　　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Dosing period	Daily Doses (mg/kg) [a]	Number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Mouse / Alpk:APfCD-1	Oral (gavage) / Water containing 30% Sulfobutyl ether-β-cyclodextrin, Captisol®, adjusted to approximately pH 2.5 as required.	Day 6 to 16 post-coitum	0 5 25 75 150	10F	Administration of selumetinib (formerly referred to as AZD6244) to pregnant mice during the period of major embryonic organogenesis at doses of 0, 2.5, 12.5, 37.5 or 75.0 mg/kg BID resulted in 100% embryolethality in 8/9 litters at 75.0 mg/kg BID and an increase in post implantation loss and reduced fetal weight at 12.5 and 37.5 mg/kg BID. Selumetinib, when administered at dosages of 12.5 to 75.0 mg/kg BID, was associated with the occurrence of fetuses with open eye, with all fetuses affected at 37.5 and 75mg/kg BID (only one live fetus at 75 mg/kg BID) in the absence of overt maternal toxicity.　The no effect dose level for embryonic or fetal survival and development was 2.5 mg/kg BID selumetinib. A dose of 37.5 mg/kg BID would be suitable as the high dose for an embryo-fetal development study in the mouse.	AstraZeneca, UK	0430RM

Species / Strain	Method of administration (Vehicle / Formulation)	Dosing period	Daily Doses (mg/kg) [a]	Number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Mouse / Crl:CD1 (ICR)	Oral (gavage) (Suspension in 10% ethanol, 30% PEG 400, and 60% Phosal 50 PG)	From Day 6 of gestation to Day 15 of lactation From Day 16 of gestation to Day 15 of lactation	0 10 25 50 80 150 150	8F	Administration of selumetinib by oral gavage to pregnant CD-1 mice twice daily, from Day 6 of gestation through to Day 15 of lactation at doses of 0, 5, 12.5, 25, 40, or 75 mg/kg BID or from Day 16 of gestation through to Day 15 of lactation at a dose of 75 mg/kg BID resulted in maternal effects consisting of decreased body weight and/or body weight gain and body weight losses at doses ≥5 mg/kg BID during the gestation and/or lactation period, clinical signs at 40 and 75 mg/kg BID (dosed from Day 6 of gestation) late in the gestation period, and a lower gestation index at ≥25 mg/kg BID. At doses ≥12.5 mg/kg BID, F1 generation viability and pups weights were decreased and clinical signs (including malformations) were increased.	[redacted] USA	20082138

Study 0430RM contains a GLP statement.
Study 20082138 does not claim GLP compliance.
F　female.
[a]　Dosed twice daily (BID), 12 hours apart.

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

Report Title: AZD6244: Oral Fertility and Early Embryonic Development Study in the Female Mouse with an Assessment of Recovery

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Design similar to ICH 4.1.1? Yes

Duration of dosing:
21 days (14 days prior to and during pairing and continued until Day 6 post-coitum)

Study number: 0496GM

Species / Strain: Mouse / Alpk:APfCD-1

Day of mating: Day 0

GLP compliance: Yes

Initial age:
Main test: 61-68 days at start of dosing
Recovery: 75 days at start of dosing

Day of C-section: Day 12 or 14 post-coitum

Testing Facility: AstraZeneca, UK

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Special features: Recovery animals were allowed 21 days recovery prior to assessment of fertility.

Vehicle / Formulation: 30% w/v Captisol in water adjusted to pH 2.5 as required

No Observed Adverse-Effect Level:

F_0 Females:	2x 2.5mg/kg/dose
F_1 Litters:	2x 2.5mg/kg/dose

Conclusion: Administration of Selumetinib (formerly referred to as AZD6244), to female mice twice daily for 14 days prior to pairing, through pairing, and until Day 6 post-coitum, resulted in minimal maternal toxicity evident as patchy hair loss and transient changes in body weight at the 2x 12.5 and 2x 37.5 mg/kg dose levels. Reproductive performance in terms of pre-coital interval, mating and fertility indices was not adversely affected by Selumetinib administration, however there was a slight decrease in the number of live embryos at both the 2x 12.5 and 2x 37.5 mg/kg dose levels. Following a three week compound withdrawal period, there were no effects on post-implantation loss or embryonic survival that could be related to administration of Selumetinib.

The No Adverse Effect Dose Level for both maternal toxicity and reproductive performance was 2x 2.5 mg/kg/dose (approximately equivalent to 2x 5.0 μmol /kg/dose) Selumetinib.

Daily dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	5	25	75
Number of Females Main Recovery	 22 12	 22	 22	 22 12
Toxicokinetics:[a] AUC_{0-12} (μmol.h/L) C_{max} (μmol/L)		 22.6 4.74	 143 38.2	 681 81.3
Number evaluated	21	22	22	22
Number died or sacrificed moribund[b]	1	0	0	0
Clinical observations[c]	+	+	+	++
Necropsy observations	-	-	-	-
Pre-mating body weight (%)[d]	(g)			
Day 12	38.6	-3.1	-4.7*	-5.4*
Gestation body weight gain(%)[d]	(g)			
Day 9-12	6.7	0.0	-3.0	+7.5
Number with oestrous cycles of regular pattern and duration[e]				
Mean number of days prior to mating	2.3	2.7	2.0	2.5
Number of females sperm positive/plug	16	18	17	18
Number of pregnant females	15	18	19	20
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Mean number of implantations	14	14	12	12
Mean number of live conceptuses	13	13	11**	12*
Number of resorptions	0	1	1	1
Number dead conceptuses	0	0	0	0
Mean % post-implantation loss	3.3	5.6	9.0	4.7
Recovery Phase Animals				
Mean number of days prior to mating	2.5			3.2
Number of females sperm positive/plug	12			11
Number of pregnant females	11			11
Number aborted or with total resorption of litter	0			0
Mean number of implantations	13			13
Mean number of live conceptuses	13			12

Daily dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	5	25	75
Mean number of resorptions	0			1**
Number dead conceptuses	0			0
Mean % post-implantation loss	1.2			7.3**

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate; +++ Marked

*p<0.05; ** p<0.01; Maternal body weights and body weight gain were analysed using William's test. Implantations, intrauterine deaths, live embryos and post-implantation losses were analysed using Shirley's test.

[a] Day 16 mean data shown from study number 0430RM; AZD6244: Oral Dose Range Finding Embryofetal Development Study in the Mouse. (3/sex/group/time point). All samples from control group animals were below limit of quantification.

[b] Female 12, main test control, was removed from the study on day 8 of the study due to poor food consumption and weight gain as a consequence of misaligned teeth.

[c] Clinical observations included slight, patchy hair loss in a number of night dose animals, both main test and recovery phase.

[d] 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] An accurate assessment of oestrus cycle regularity could not be made as all animals, including both control groups, had highly irregular cycles with extended periods of di-oestrus.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

Report Title: AZD6244: Oral Embryofetal Development Study in the Mouse **Test Article: Selumetinib hyd-sulfate**

Design similar to ICH 4.1.3? Yes

Duration of dosing: Twice daily for 11 days (days 6 to 16 post-coitum)

Study number: 0480TM

Species / Strain: Mouse / Alpk:APfCD-1

Day of mating: Day 0

GLP compliance: Yes

Initial age: 61 to 67 days

Day of C-section: Day 18 post-coitum

Testing Facility: AstraZeneca, UK

Date of first dose: [redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Special features: None.

Vehicle / Formulation: 30% w/v aqueous Captisol adjusted to approximately pH 2.5

No Observed Adverse-Effect Level:

F_0 Females:	5 mg/kg/day
F_1 Litters:	5 mg/kg/day

Conclusion: Administration of Selumetinib (formerly referred to as AZD6244) to female mice during the period of major embryonic organogenesis at doses of 5 (2x 2.5) or 75 (2x 37.5) mg/kg/day resulted in open eye in all fetuses of dams dosed with 2x 37.5 mg/kg Selumetinib together with an increased incidence of cleft palate. Open eye was also observed in a number of fetuses from the 2x 2.5 mg/kg/dose, however, these findings were considered to be associated with erroneous administration of 2x 37.5 mg/kg/dose on Day 16 post-coitum of the respective animals.
A small number of minor skeletal anomalies were recorded at both 2x 2.5 and 2x 37.5 mg/kg dose Selumetinib. These findings were considered to be transient in nature and not detrimental to normal skeletal development of the fetus. The “no observed adverse effect” dose level for maternal toxicity and for fetal abnormalities and variants was 5 (2x 2.5) mg/kg/day.

Daily dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	5	75
Dams/does:			
Toxicokinetics:[a]			
$AUC_{(0-12)}$ (μmol/h/L)		22.6	681
C_{max} (μmol/L)		4.74	81.3
Number pregnant	22	21	21
Number died or sacrificed moribund	0	0	0
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	1
Clinical observation	-	-	-
Necropsy observations[b]	-	+	+
Gestation body weight gain (%)[c]	(g)		
Day 11 – 12	2.7	-14.8	-37.0***
Day 16 - 18	7.7	-6.5	-50.6***
Gestation food consumption (%)[c]	(g/animal/day)		
Day 16 - 18	8.7	0.0	-6.9*
Mean number of implantations	15	14	14
Mean post-implantation loss	1	1	5***
Litters:			
Number of litters evaluated	22	21	21
Mean number of live fetuses	14	13	9***
Number of resorptions	14	24	125
Number of litters with dead fetuses	0	0	0
Mean % post-implantation loss	4.3	8.0	36.8***
Mean litter weight (g)	19.1	17.6	9.8***
Mean fetal body weight (g)	1.4	1.4	1.0***
Fetal sex ratios (% Males)	52.1	51.5	56.7
Fetal anomalies:			
Gross external			
Head: open eye (major)[d]			
% fetuses (% litters)	0 (0)	10***(4.0)	193***(100.0)***
no fetuses (no litters		3 (14.3)	21 ***(100.0)

Daily dose (mg/kg)	0 (Vehicle)	5	75
Oral Cavity: cleft palate (major)			
% fetuses (% litters)	4 (1.3)	5 (1.9)	25***(15.6)***
no fetuses (no litters)	4 (18.2)	3 (14.3)	14** (66.7)
Soft tissue anomalies: Bouins			
Eye lens: variation in consistency (minor)			
% fetuses (% litters)	0 (0)	0 (0)	36***(32.1)***
no fetuses (no litters)			11***(52.4)
Eye: folded retina, slight (minor)			
% fetuses (% litters)	0 (0)	0 (0)	35***(32.2)***
no fetuses (no litters)			16***(76.2)
Eye: folded retina, severe (major)			
% fetuses (% litters)	0 (0)	0 (0)	23***(24.8)***
no fetuses (no litters)			9 *** (42.9)
Skeletal anomalies[e]	-	-	-

- No noteworthy findings; + Mild.

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001. Body weights (maternal and fetal), maternal body weight gain, litter weights (obtained from individual fetal weights), gravid uterus weight, and food consumption were analysed using William's test. Shirley's test was used for group mean values calculated for numbers of implantations, intrauterine deaths, dead fetuses, live fetuses and post implantation losses Post-implantation losses, intrauterine deaths, dead and live fetuses calculated as mean of litter percentages The mean number of live fetuses (males, females and combined) and percentage of male fetuses per litter calculated for each group.

[a] Toxicokinetics not conducted. Day 16 data shown from the dose range finding study 0430RM.

[b] Two females from the 2x 2.5 mg/kg and four from the 2x 37.5 mg/kg dose groups were observed to have focal discolouration of one or more liver lobes.

[c] 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] Since eyelid closure occurs between Day 15.5 and Day 16.5 post coitum, the occurrence of open eye in foetuses from three litters at the 2x 2.5 mg/kg dose level was considered to be related to the erroneous administration of the higher dose of selmetinib on Day 16.

[e] A small number of minor skeletal anomalies were recorded at both 2x 2.5 and 2x 37.5 mg/kg dose Selumetinib. These findings were considered to be transient in nature and not detrimental to normal skeletal development of the fetus.

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

Report Title: AZD6244: A Twice Daily Oral (Gavage) Developmental and Perinatal/Postnatal Reproduction Study in the Mouse, Including a Postnatal Behavioral/Functional Evaluation

Test Article: Selumetinib hyd-sulfate

Design similar to ICH 4.1.2? Yes

Duration of dosing: Gestation Day (GD) 6 to Lactation Day (LD) 20

Study number: 20082140

Species / Strain: Mouse / Crl:CD-1(ICR)

Day of mating: GD 0

GLP compliance: Yes

Initial age at start of study: Approximately 63 days

Day of C-section: Not applicable

Testing Facility: [redacted], Inc, [redacted], [redacted], USA

Date of first dose: [redacted] 20[redacted]

Method of administration: Oral (gavage)

Special features: BID dosing (12 hours apart); F_0 and F_1 bioanalysis

Vehicle / Formulation: 10% ethanol, 30% PEG 400, and 60% Phosal 50 PG

Litters culled/not culled: Culled

No Observed Adverse-Effect Level:

F_0 females:	15 mg/kg/day
F_1 males:	Not established
F_1 females:	Not established

Conclusion: Selumetinib (formerly known as AZD6244) administration by oral gavage to pregnant CD-1 mice twice daily, from Day 6 of gestation through to Day 20 of lactation at total daily doses of 0, 1, 4, or 15 mg/kg/day (0, 0.5, 2, and 7.5 mg/kg/dose, respectively) did not result in maternal effects during the gestation or lactation periods. There were no effects on maternal (F_0) reproductive function, therefore, the reproductive NOAEL is 15 mg/kg/day. Decreased F_1 generation pups weights were noted from Day 7 postpartum and fewer pups met the criterion for pupil constriction on Day 21 postpartum at 15 mg/kg/day, while the incidence of malformations (prematurely open eyes and cleft palate) were increased at 1, 4, and/or 15 mg/kg/day. There were no selumetinib-related effects on body weight gain, sexual maturation, or neurobehavioral or reproductive function in the F_1 generation mice at any dose during the postweaning period. The developmental NOAEL could not be established based on the low incidence of open eyes noted at the low dose of 1 mg/kg/day.

Daily dose (mg/kg/day) BID dosing, 12 hours apart	0 (Vehicle)	1	4	15
F_o females:				
Toxicokinetics (LD 4, Prior to first daily dose)				
Mean selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	BLQ	BLQ	0.160
Mean N-Desmethyl selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	BLQ	0.0227	0.140
Toxicokinetics (LD 4, 2 hrs post first daily dose)				
Mean selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	0.989	2.51	9.12
Mean N-Desmethyl selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	0.319	0.880	3.26
Plasma levels in pups (PND 4, Prior to first daily dose)				
Mean selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	BLQ	0.156	0.716
Mean N-Desmethyl selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	0.0149	0.0635	0.279
Plasma levels in pups (PND 4, 2 hrs post first daily dose)				
Mean selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	BLQ	0.157	0.775
Mean N-Desmethyl selumetinib plasma concentration (µmol/L)	BLQ	0.0153	0.0674	0.255
Number pregnant	23	24	24	25
Number died or sacrificed moribund	0	1	1	0
Number aborted or with total resorption of litter	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Gestation body weight gain (%)	-	-	-	-
Lactation body weight gain (%)	-	-	-	-
Lactation food consumption (%)	-	-	-	-
Mean duration of gestation (days)	19.7	19.2*	19.4	19.3
Abnormal parturition	0	0	0	0

Daily dose (mg/kg/day) BID dosing, 12 hours apart	0 (Vehicle)	1	4	15
F_1 litters (pre-weaning):				
Number litters evaluated	22	24	22	25
Mean number of implantations	13.9	14.0	13.5	14.3
Mean number pups /litter	13.1	12.8	12.3	13.4
Mean number liveborn pups /litter	13.0	12.8	12.1	13.4
Number of litters with stillborn pups	1	0	0	0
Post-natal survival to Day 4 (%)	98.6	97.4	98.9	97.6
Post-natal survival to weaning (%)	100.0	100.0	98.7	99.0
Number of total litter losses	1	0	1	0
Mean pup body weights (g)				
Day 7 postpartum	4.5	4.4	4.5	4.1*
Day 14 postpartum	7.8	8.0	8.0	7.1**
Day 18 postpartum	9.2	9.7	9.9	8.4
Day 21 postpartum	12.3	12.6	13.0	11.3*
Pup sex ratios (% males)	-	-	-	-
Pup clinical signs[a]	-	+	+	++
Reflex and physical development[b]				
Acoustic startle (initiated on Day 12 postpartum)	-	-	-	-
Eye opening (initiated on Day 13 postpartum)	-	+	++	++
Pupil constriction (Day 21 postpartum)	-	-	-	+*
Pup necropsy observations	-	-	-	-
F_1 males (post-weaning):				
Number evaluated post-weaning per litter	25	25	25	25
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Opthalamic examinations	-	-	-	-

Daily dose (mg/kg/day) BID dosing, 12 hours apart	0 (Vehicle)	1	4	15
Necropsy observations	-	-	-	-
Reproductive organ weights	-	-	-	-
Body weight [c] (g)				
Day 22 postpartum	13.9	-2.2	1.4	-11.5**
Day 29 postpartum	24.1	-2.9	1.7	-9.1**
Day 36 postpartum	28.2	-1.1	3.5	-4.6*
Day 43 postpartum	30.9	-1.6	2.3	-5.2*
Day 50 postpartum	33.0	-2.4	1.2	-5.8*
Day 57 postpartum	34.2	-2.3	1.5	-5.8*
Day 64 postpartum	35.7	-3.4	0.3	-6.2*
Day 71 postpartum	36.5	-3.6	0.5	-7.1**
Day 78 postpartum	37.3	-2.9	0.0	-8.0**
Day 85 postpartum	37.4	-3.2	0.3	-6.4*
Day 92 postpartum	38.5	-3.6	-0.3	-6.8*
Day 99 postpartum	38.2	-3.9	0.3	-6.3*
Day 106 postpartum	38.8	-4.4	0.3	-7.0*
Day 113 postpartum	39.7	-4.8	0.0	-7.1*
Body weight change [c] (g)				
Days 22 to 29 postpartum	10.2	-3.9	+1.9	-5.9
Preputial separation	27.4	27.1	26.8	27.8
Passive Avoidance	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Mean number of days prior to mating	3.3	2.7	3.2	2.0

Daily dose (mg/kg/day) BID dosing, 12 hours apart	0 (Vehicle)	1	4	15
Number of males that mated	24	25	25	25
Number of fertile males	22	25	24	24
F_1 female (post-weaning):				
Number evaluated	25	25	25	25
Number died or sacrificed moribund	0	0	0	0
Clinical observations	-	-	-	-
Opthalamic examinations	-	-	-	-
Necropsy observations	-	-	-	-
Pre-mating body weight [c,d] (g)				
Day 22 postpartum	12.5	6.4	6.4	-4.8
Day 29 postpartum	19.4	1.5	2.1	-8.2**
Day 36 postpartum	22.8	-0.4	3.1	-6.6**
Day 43 postpartum	24.6	0.4	2.0	-7.3**
Day 50 postpartum	26	0.0	-0.8	-7.7**
Day 57 postpartum	26.8	1.5	0.0	-7.1**
Day 64 postpartum	27.6	-0.4	-0.4	-7.6**
Day 71 postpartum	28.1	-0.7	0.4	-6.4**
Day 78 postpartum	29	-1.4	-1.0	-6.9**
Day 85 postpartum	29.5	-2.0	-2.4	-10.2**
Day 92 postpartum	30.4	-0.3	-1.3	-8.9**
Pre-mating body weight change [c,d] (g)				
Days 22 to 29 postpartum	6.9	-7.2	-5.8	-13.0**
Days 78 to 85 postpartum	0.5	-20.0	-100	-200**
Days 22 to 92 postpartum	17.9	-5.0	-6.7	-11.2**
Gestation body weights [c] (g)				
GD 0	31.0	-1.2	-3.2	-11.9**

Daily dose (mg/kg/day) BID dosing, 12 hours apart	0 (Vehicle)	1	4	15
GD 7	35.1	-1.7	-0.8	-10.8**
GD 10	38.0	-0.5	+0.3	-9.7**
GD 13	44.5	-0.2	0	-8.8**
Gestation body weight change (g)	-	-	-	-
Mean age of vaginal patency (days)	27.8	26.1*	26.4	28.6
Passive Avoidance	-	-	-	-
Motor activity	-	-	-	-
Learning and memory	-	-	-	-
Mean number days prior to mating	3.3	2.7	3.2	2.0
Number of females sperm positive	22	25	24	24
Number of pregnant females	22	25	24	24
Mean number corpora lutea	14.7	15.0	15.1	13.8
Mean number implantations	14.0	14.0	14.4	12.9
Mean pre-implantation loss (%)	4.8	6.1	4.5	6.5
Mean number nonviable embryos	3.0	1.5	2.0	0.9
Mean post-implantation loss (%)	24.5	11.4	17.7	9.5

- No noteworthy findings; + Mild; ++ Moderate

* $p<0.05$; ** $p<0.01$. Continuous data analysed using Bartlett's Test of Homogeneity of Variances and the Analysis of Variance. If the Analysis of Variance was significant, Dunnett's Test was used to identity the statistical significance of the individual groups. If the Analysis of Variance was not appropriate, the Kruskal-Wallis Test was used. In cases where the Kruskal-Wallis Test was statistically significant, Dunn's Method of Multiple Comparisons was used to identify the statistical significance of the individual groups.

[a] The main clinical signs present in the F_1 generation pups during the preweaning period were prematurely open eyes and cleft palate. Prematurely open eyes (1 or both) were observed in no more than 2, 4, and 13 pups from 1, 2, and 6 litters in the 1, 4, and 15 mg/kg/day dose groups, respectively, on one or more occasions between Days 1 and 11 postpartum. Cleft palate was observed in 1 male and 2 females in the 4 and 15 mg/kg/day dose groups, respectively, on Day 1 postpartum.

[b] There were no selumetinib-related effects on acoustic startle at any dose level or pupil constriction at 1 or 4 mg/kg/day. On the first day of eye opening evaluations (Day 13 postpartum), the mean number of pups with open eyes was higher than controls in the 1, 4, and 15 mg/kg/day dose groups (mean of 3.3, 6.5, and 9.0, respectively, compared with a mean of 1.1 in controls). This finding was consistent with the increased number of pups with open eyes noted after birth. The mean day postpartum that at least 50% of the pups in each litter, including vehicle controls, met the criterion for eye opening ranged from 14.3 to 14.8 days postpartum, and 100% of the pups in each litter had met the criterion by Day 17 postpartum. Pupil constriction was evaluated once on Day 21 postpartum, but only 93.5% of the pups (statistically significant at $p \leq 0.01$) in the 15 mg/kg/day dose group met the criterion compared with 100% in the vehicle control group. In the 15 mg/kg/day, there were 6 out of 25 litters that had 1 or more pups (50% to 87.5% passed) that did not meet the criterion for pupil constriction on Day 21 postpartum.

[c] For controls, group means are shown; for treated groups, percent difference from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences).

[d] From weaning to mating.

BLQ Below the limit of quantification for parent selumetinib (<0.0100umol/L)

BLQ Below the limit of quantification for metabolite N-Desmethyl selumetinib < 0.100 μmol/L

2.6.7.15　　新生児を用いた試験

該当なし

2.6.7.16　局所刺激性試験

該当なし

2.6.7.17　その他の毒性試験

2.6.7.17.1　代謝物の毒性試験

AZ12442942: Genetic Toxicity Evaluation using a Bacterial Reverse Mutation Test

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.	**Number of independent assays:** 2	**Study number:** 0750BV
Strains: *S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E coli* (*uvrA*/pKM101)	**Number of replicate cultures:** 3	**GLP compliance:** Yes
Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9, 10%	**Number of cells analysed/culture:** Not applicable	**Testing Facility:** AstraZeneca, UK
Vehicles: For Test Article: DMSO	**For positive controls:** DMSO (2-nitrofluorene, 2-aminoanthracene) and Water (sodium azide, 9-aminoacridine HCl, potassium dichromate)	

Treatment: **Date of treatment:** [redacted] 20[redacted]

Assay 1 (-/+ S9), plate incorporation for 72 hours.
Assay 2 (-/+ S9), pre-incubation (60 minutes) followed by 72 hours plate incubation.

Cytotoxic effects: Cytotoxicity was seen in the pre-incubation test.　The minimum dose showing evidence of cytotoxicity ranged from 50 to 160 µg per plate. The maximum dose level scored for revertant colonies was 5000 µg per plate in both tests.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: 0750BV Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*/ pKM101
Without activation	DMSO	100 μL/plate	17 (3)	11 (4)	31 (5)	110 (13)	221 (16)
	AZ12442942	16	18 (3)	8 (5)	27 (3)	99 (5)	213 (12)
		50	14 (1)	12 (4)	23 (5)	114 (6)	212 (4)
		160	16 (4)	15 (4)	27 (2)	99 (15)	216 (15)
		500	15 (1)	12 (2)	21 (6)	109 (25)	214 (10)
		1600 [P]	13 (3)	12 (3)	28 (1)	109 (11)	199 (32)
		5000 [PL]	12 (3)	8 (0)	19 (5)	110 (16)	160 (1)
	Sodium Azide	0.5	410 (7)			603 (3)	
	9-Aminoacridine	50		151 (37)			
	2-Nitrofluorene	0.5			335 (22)		
	Potassium dichromate	25					1141 (66)
With activation	DMSO	100 μL/plate	13 (4)	16 (1)	38 (3)	115 (13)	183 (15)
	AZ12442942	16	13 (2)	17 (1)	39 (2)	100 (13)	207 (12)
		50	13 (1)	15 (1)	35 (8)	105 (4)	218 (10)
		160	11 (4)	14 (4)	29 (1)	102 (8)	217 (13)
		500	15 (1)	19 (3)	32 (6)	126 (7)	221 (15)
		1600[P]	12 (3)	10 (1)	29 (1)	139 (6)	176 (12)
		5000[PL]	11 (3)	17 (4)	27 (13)	124 (11)	219 (31)
	2-Aminoanthracene	2	197 (3)	133 (9)	1082 (4)	1786 (83)	
		20					2353 (108)

[P] Precipitate formed on the plate.

[L] Lawn obscured by precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: 0750BV Assay 2: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA1535	TA1537	TA98	TA100	WP2 *uvrA*/ pKM101
Without activation	DMSO	50 μL/plate	19 (4)	12 (2)	27 (6)	121 (8)	192 (12)
	AZ12442942	16	16 (5)	14 (4)	25 (7)	123 (2)	195 (14)
		50	16 (4)	7 (3)	26 (10) S	104 (12) S	199 (9)
		160 P	17 (4) S	12 (5) S	22 (3) R	119 (17) R	206 (22) S
		500 P	14 (2) R	9 (2) R	24 (2) R	107 (8) V	193 (9) R
		1600 P	12 (4) V	11 (1) L	24 (3) L	87 (14) L	178 (1) L
		5000 PL	17 (1)	9 (3)	19 (8)	59 (6)	124 (18)
	Sodium Azide	0.5	1660 (25)			505 (91)	
	9-Aminoacridine	50		178 (45)			
	2-Nitrofluorene	0.5			256 (22)		
	Potassium dichromate	25					1416 (181)
With activation	DMSO	50 μL/plate	14 (3)	20 (4)	31 (5)	116 (13)	215 (27)
	AZ12442942	16	11 (3)	17 (3)	35 (4)	106 (13)	179 (35)
		50	14 (2)	18 (8)	29 (3)	125 (8)	191 (5)
		160 P	12 (4) S	14 (8) S	26 (8) R	128 (10) S	221 (8) S
		500 P	11 (4) R	15 (4) R	25 (7) V	121 (10) R	234 (11) R
		1600 P	13 (2) V	15 (5) V	27 (7) L	102 (15) V	203 (3) V
		5000 PL	14 (1)	14 (3)	31 (5)	100 (2)	74 (20)
	2-Aminoanthracene	2	177 (12)	134 (18)	1509 (213)	1626 (40)	
		20					1747 (127)

S　Slightly reduced lawn.
P　Precipitate formed on the plate.
R　Reduced lawn.
V　Very reduced lawn.
L　Lawn obscured by precipitate.

AZ12442942: Genetic Toxicity Evaluation using the Mouse Lymphoma Cell Thymidine Kinase Locus Assay

Test for induction of: Gene mutation and chromosome aberrations.	**Number of independent assays:** 2	**Study number:** 0751MV
Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	**Number of replicate cultures:** 4 (solvent control) 2 (test article and positive controls)	**GLP compliance:** Yes
Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9, 4%	**Number of cells analysed/culture:** 1 x 10^7 (3 hour treatment) 4 x 10^6 (24 hour treatment)	**Testing Facility:** AstraZeneca, UK

Vehicles: **For Test Article:** DSMO **For positive controls:** DMSO

Treatment: 3 hours in the presence of S9, 3 and 24 hours in the absence of S9 **Date of treatment:** [redacted] to [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: Concentrations limited by solubility in tissue culture medium. Highest concentrations tested gave 53% survival in the presence of S9, 23% survival in the absence of S9 3 hour exposure and 8% survival in the absence of S9 24 hour exposure.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Study number: 0751MV Assay 1: 3 hour exposure			
			Cloning efficiency (%)	Mean[1] Relative Total Growth (% control)	Mean1 Mutant Frequency (x 10^{-6})	Small colony (%)
Without activation	DMSO	10 µL/mL	88.3	100	90	53
	AZ12442942	14	88.5	103	80	54
		28	96.5	112	73	48
		56	97	83	79	52
		111[P]	92.5	38	88	44
		167[P]	80.5	23	153	48
	4-nitroquinoline-1-oxide	0.001 mmol/L	38	19	1604	43
With activation	DMSO	10 µL/mL	81.8	100	102	51
	AZ12442942	14	88	125	79	54
		28	90	130	89	55
		56	132.5	155	71	53
		111[P]	88.5	32	105	46
		167[P]	85	53	111	53
	Cyclophosphamide	0.01 mmol/L	58	67	935	55

[1] Dose value calculated from pooled replicate counts, not the arithmetic mean of replicate values.

[P] Precipitate seen at the end of the treatment period.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Study number: 0751MV Assay 2: 24 hour exposure			
			Cloning efficiency (%)	Mean[1] Relative Total Growth (% control)	Mean1 Mutant Frequency (x 10^{-6})	Small colony (%)
Without activation	DMSO	10 µL/mL	86.8	100	67	52
	AZ12442942	14	83	45	53	38
		28	84.5	37	80	46
		56	94.5	25	54	65
		83	81	12	102	57
		111 [P]	72	8	104	62
	4-nitroquinoline-1-oxide	0.00033 mmol/L	70.5	41	904	40

[1] Dose value calculated from pooled replicate counts, not the arithmetic mean of replicate values.

[P] Precipitate seen at the end of the treatment period.

2.6.7.17.2　不純物の毒性試験

不純物E* **Bacterial Mutation Assay In S.Typhimurium And E Coli**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.	**Number of independent assays:** 4	**Study number:** YV7434
Strains: *S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E.coli* (WP2P, WP2P *uvrA*)	**Number of replicate cultures:** 3 for Test Article and positive controls 5 for vehicle control	**GLP compliance:** Yes
Metabolising system: Phenobarbital and β-naphthoflavone-induced rat liver S9, 10%	**Number of cells analysed/culture:** Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], [redacted] Ltd, UK

Vehicles: **For Test Article:** DMSO

For positive controls: DMSO (2-aminoanthracene, acridine mutagen ICR191, benzo[a]pyrene, daunomycin HCl, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) and water (mitomycin C, sodium azide)

Treatment: Assay 1 (-/+S9), plate incorporation for 72 hours. Assays 2 and 3 (-S9), plate incorporation for 72 hours; (+S9), pre-incubation (60 minutes) followed by 72 hours plate incubation. Assay 4 (+S9), pre-incubation (60 minutes) followed by 72 hours plate incubation.

Date of treatment: [redacted] to [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: Evidence of cytotoxicity (reduced colony numbers and/or sparse/incomplete background lawn) was observed at 5000 µg/plate.

Genotoxic effects: Under the conditions of this assay, 不純物E* gave a positive, i.e. mutagenic, response in *S.typhimurium* strain TA1535 in the presence of S9-mix using both the plate incorporation and pre incubation protocols.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7434 Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
Without activation	DMSO	100 μL/plate	88.4 (8.9)	8.8 (2.7)	7.6 (2.9)	32.8 (5.6)	53.0 (7.6)	151.6 (13.8)
	不純物E*	100	92.0 (9.5)	8.3 (3.1)	6.7 (2.1)	32.0 (2.6)	65.3 (10.7)	150.3 (13.0)
		200	70.7 (5.5)	6.7 (2.1)	8.3 (1.2)	32.0 (3.5)	62.0 (12.5)	134.0 (14.7)
		500	92.3 (10.4)	8.3 (3.1)	5.7 (4.2)	27.7 (5.7)	49.3 (6.5)	113.0 (3.5)
		1000	87.7 (10.1)	11.0 (4.6)	1.3 (0.6)	24.3 (5.7)	29.0 (4.4)	116.3 (12.7)
		2500	66.0 (6.0)	11.3 (5.1)	0.7 (1.2)	23.0 (1.7)	0.0 (0) [S]	18.7 (13.6) [S]
		5000	6.7 (1.5) [S]	4.7 (2.5)	1.0 (1.0)	14.3 (6.7)	0.0 (0) [S]	0.0 (0) [S]
	Sodium Azide	2	912.7 (51.9)	756.0 (32.1)				
	ICR191	2			1144.3 (126.0)			
	Daunomycin HCl	1				350.0 (9.5)		
	Mitomycin C	1					506.7 (20.6)	
	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	1						627.0 (33.0)

No statistical analysis was conducted.

[S] Sparse/incomplete lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7434 Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
With activation	DMSO	100 μL/plate	119.4 (7.3)	9.8 (1.1)	12.6 (5.0)	42.2 (5.7)	95.0 (12.9)	203.2 (23.2)
	不純物E*	100	116.0 (10.1)	11.7 (3.1)	11.0 (2.6)	37.7 (1.5)	78.7 (15.3)	187.0 (10.6)
		200	100.7 (18.0)	11.0 (0.0)	11.0 (3.5)	34.3 (3.2)	80.0 (10.6)	173.7 (1.2)
		500	103.7 (16.0)	13.7 (2.9)	9.0 (3.6)	30.7 (1.5)	72.3 (0.6)	183.0 (8.9)
		1000	96.7 (8.1)	14.7 (3.2)	7.7 (2.9)	31.7 (3.5)	33.3 (3.2)	167.3 (14.2)
		2500	94.3 (10.1)	24.0 (1.7)	3.7 (1.5)	30.0 (6.9)	0.7 (1.2) [S]	36.7 (11.0)
		5000	81.0 (15.9)	17.3 (0.6)	0.0 (0)	17.7 (3.1)	0.0 (0) [S]	4.0 (3.6) [S]
	2-Aminoanthracene	1	567.7 (33.0)			847.3 (34.4)		
		2		202.7 (14.6)	113.7 (22.4)			
		20					277.3 (14.6)	
	Benzo[a]pyrene	5						1134.0 (14.5)

No statistical analysis was conducted.

[S] Sparse/incomplete lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7434 Assay 2: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
Without activation	DMSO	100 μL/plate	76.6 (1.5)	6.8 (2.0)	6.0 (2.9)	21.8 (5.2)	58.6 (9.4)	125.6 (10.6)
	不純物E*	50					58.0 (3.6)	136.7 (16.2)
		100	68.7 (2.5)	7.0 (2.6)	5.0 (1.0)	14.3 (5.1)	54.0 (6.6)	129.0 (7.2)
		200	66.0 (7.9)	8.0 (2.0)	3.3 (2.1)	23.3 (3.5)	58.0 (8.9)	142.0 (10.1)
		500	57.7 (10.4)	7.0 (1.7)	1.7 (2.1)	20.3 (2.5)	48.7 (9.3)	96.0 (13.7)
		1000	80.7 (7.6)	7.0 (3.5)	2.7 (2.3)	19.7 (1.5)	43.3 (7.5)	113.3 (13.1)
		2500	56.7 (5.1)	8.0 (2.0)	0.3 (0.6)	12.0 (1.7)	3.3 (2.9) [S]	78.3 (2.3)
		5000	36.7 (8.1)	6.7 (6.0)	0.3 (0.6)	9.7 (1.2)		
	Sodium Azide	2	790.3 (34.5)	693.7 (5.9)				
	ICR191	2			946.0 (58.5)			
	Daunomycin HCl	1				170.0 (22.1)		
	Mitomycin C	1					506.7 (24.8)	
	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	1						435.7 (35.2)

No statistical analysis was conducted.
[S] Sparse/incomplete lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7434 Assay 2: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
With activation	DMSO	20 μL/plate	125.2 (13.2)	10.8 (2.2)	11.4 (3.4)	40.4 (5.0)	76.2 (13.1)	237.2 (33.5)
	不純物E*	50					84.7 (15.5)	213.0 (7.5)
		100	93.3 (16.5)	11.7 (3.2)	12.7 (3.5)	41.0 (3.0)	91.0 (15.1)	220.7 (8.5)
		200	94.3 (3.5)	12.7 (4.7)	13.3 (2.5)	39.3 (6.0)	88.7 (5.0)	174.0 (12.2)
		500	84.0 (6.9)	15.7 (4.2)	8.7 (1.2)	26.0 (3.6)	40.7 (4.6)	175.3 (19.1)
		1000	84.3 (9.2)	22.0 (7.8)	3.3 (4.0)	31.7 (4.5)	26.7 (6.4)	144.0 (9.8)
		2500	96.7 (15.1)	27.0 (7.0)	0.7 (0.6)	25.3 (1.5)	0.7 (1.2) [S]	75.0 (11.4)
		5000	97.7 (12.5)	23.0 (7.0)	0.3 (0.6) [S]	13.0 (6.6)		
	2-Aminoanthracene	1	366.0 (69.3)			699.0 (129.2)		
		2		99.7 (10.7)	81.3 (10.2)			
		20					128.0 (5.3)	
	Benzo[a]pyrene	5						1063.3 (88.3)

No statistical analysis was conducted.
[S] Sparse/incomplete lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7434 Assay 3: Revertant colony counts, mean (SD)					
					TA1537		WP2 pKM101	
Without activation	DMSO	100 μL/plate			5.8 (1.8)			
	不純物E*	100			6.3 (0.6)			
		200			5.3 (3.5)			
		500			4.0 (3.5)			
		1000			3.0 (2.6)			
		2500			1.3 (1.2)			
		5000			0.3 (0.6)			
	ICR191	2			1482.0 (65.5)			
With activation	DMSO	20 μL/plate					56.0 (3.8)	
	不純物E*	50					78.3 (11.2)	
		100					62.7 (3.8)	
		200					49.3 (9.0)	
		500					21.0 (5.6)	
		1000					5.7 (2.1) S	
		2500					0.0 (0)	
	2-Aminoanthracene	20					91.3 (9.0)	

No statistical analysis was conducted.
S　Sparse/incomplete lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7434 Assay 4: Revertant colony counts, mean (SD)					
							WP2 pKM101	
With activation	DMSO	20 μL/plate					78.4 (3.6)	
	不純物E*	50					98.0 (7.8)	
		100					84.0 (10.1)	
		200					60.7 (9.0)	
		500					34.0 (2.6)	
		1000					10.0 (2.6) [s]	
		2500					11.3 (3.1) [s]	
	2-Aminoanthracene	20					102.0 (17.7)	

Control data from concurrent plate incorporation study (YV7451 Phase 3):

With activation	DMSO	100 μL/plate					56.4 (5.5)	
	2-Aminoanthracene	20					157.3 (82.9)	

No statistical analysis was conducted.

[s] Sparse/incomplete lawn.

不純物E* **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA1535, TA1535NR and YG7127**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells	**Number of independent assays:** 2	**Study number:** 8316541
Strains: *S. typhimurium* (TA1535, TA1535NR, YG7127)	**Number of replicate cultures:** 5 for vehicle 3 for Test Article and positive controls	**GLP compliance:** Yes
Metabolising system: Aroclor-induced rat liver S-9, 10%	**Number of cells analysed/culture:** Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], UK

Vehicles: **For Test Article:** DMSO **For positive controls:** DMSO (2-Aminoanthracene, Nitrofurazone) and water (Sodium azide)

Treatment: Assay 1 and 2 (-/+ S9), plate incorporation for ~72 hours. **Date of treatment:** [redacted] and [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: Following Mutation Experiment 1 treatments, evidence of toxicity was observed at 5000 µg/plate in strains TA1535 and TA1535NR in the absence and presence of S-9. Following Mutation Experiment 2 treatments, evidence of toxicity was observed at 1600 and/or 5000 µg/plate in strain YG7127 in the absence and presence of S-9.

Genotoxic effects: It was concluded that 不純物E* induced mutation in two histidine-requiring strains of *Salmonella typhimurium* (TA1535 and TA1535NR) when tested under the conditions of this study. These conditions included treatments at concentrations up to 5000 µg/plate (the maximum recommended concentration according to current regulatory guidelines) in the absence (TA1535 and TA1535NR) and in the presence (TA1535NR) of a rat liver metabolic activation system (S-9).

不純物E* did not induce mutation in one histidine-requiring strain of *Salmonella typhimurium* (YG7127) when tested under the conditions of this study. These conditions included treatments at concentrations up to 5000 µg/plate in the absence and in the presence of S-9. The negative result observed with strain YG7127 with one of the nitroreductase genes deleted, may be indicative of nitroreductase involvement in the positive responses observed with strains TA1535 and TA1535NR.

Metabolic Activation	Test Article	Concentration, μg/plate	Study number: 8316541 Assay 1: Revertant Colony Counts, Mean ± Standard Deviation	
			TA1535	TA1535NR
Without Activation	DMSO	100 μL/plate	11 ± 5	13 ± 2
	不純物E*	5	17 ± 3	12 ± 3
		16	12 ± 3	14 ± 3
		50	14 ± 6	8 ± 2
		160	13 ± 4	11 ± 0
		500	28 ± 7	27 ± 8
		1600	39 ± 6	55 ± 3
		5000	- [T]	38 ± 10 [S]
	Sodium Azide	2	683 ± 31	613 ± 53
	Nitrofurazone	10	78 ± 9	30 ± 3
With Activation	DMSO	100 μL/plate	20 ± 4	19 ± 6
	不純物E*	5	21 ± 7	13 ± 7
		16	19 ± 2	12 ± 4
		50	19 ± 2	14 ± 7
		160	17 ± 3	15 ± 1
		500	15 ± 8	28 ± 7
		1600	55 ± 15	66 ± 2
		5000	- [T]	17 ± 2 [S]
	2-Aminoanthracene	5	339 ± 7	455 ± 48

[S] Slightly thinning of background bacterial lawn.

[T] Toxic, no revertant colonies.

Metabolic Activation	Test Article	Concentration, μg/plate	Study number: 8316541 Assay2: Revertant Colony Counts, Mean ± Standard Deviation
			YG7127
Without Activation	DMSO	100 μL/plate	17 ± 5
	不純物E*	5	16 ± 3
		16	15 ± 1
		50	22 ± 2
		160	23 ± 4
		500	36 ± 12
		1600	21 ± 4 [S]
		5000	1 ± 1 [V]
	Sodium Azide	2	593 ± 14
	Nitrofurazone	5	50 ± 7
		10	61 ± 8
With Activation	DMSO	100 μL/plate	15 ± 4
	不純物E*	5	11 ± 1
		16	11 ± 6
		50	9 ± 2
		160	9 ± 3
		500	21 ± 2
		1600	23 ± 3
		5000	4 ± 3 [V]
	2-Aminoanthracene	5	272 ± 46

[S] Slightly thinning of background bacterial lawn.
[V] Very thin background bacterial lawn.

不純物E* **: In Vitro L5178Y Mouse Lymphoma Cell Micronucleus Assay**

Test for induction of: Micronuclei.

Number of independent assays: 1

Study number: 8314208

Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c

Number of replicate cultures:
2 for solvent control,
1 for Test Article and positive controls

GLP compliance: No

Metabolising system: Aroclor induced rat liver S9, 2%

Number of cells analysed/concentration:
2000 per replicate

Testing Facility: [redacted] Ltd., UK

Vehicles: **For Test Article:** DMSO

For positive controls: DMSO (Cyclophosphamide and noscapine) and water (mitomycin C)

Treatment: 3+21 hour treatment in the presence of S9, and 24+24 hour treatment in the absence of S9.

Date of treatment: [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: Cytotoxicity at the highest concentration, 1 mM, in the presence and absence of S9 was 37% and 6% respectively.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Study number: 8314208 Micronucleus Experiment (3+21 hour treatments)		
			Cytotoxicity (%)	Mean MNMOM Cell Frequency (%)	Statistical Significance †
With activation	DMSO	10 µL/mL	-	0.13	-
	不純物E*	10.65	33	0.10	
		20.80	11	0.35	*
		79.36	4	0.15	
		155.0	37	0.15	
	Cyclophosphamide	2.00	46	3.00#	***

† Analysis conducted using Fisher's Exact Test; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.
# Exceeded historical negative control range

Metabolic activation	Test Article	Concentration (µg/mL)	Study number: 8314208 Micronucleus Experiment (24+24 hour treatments)		
			Cytotoxicity (%)	Mean MNMOM Cell Frequency (%)	Statistical Significance †
Without activation	DMSO	10 µL/mL	-	0.15	-
	不純物E*	10.65	0	0.15	
		26.00	0	0.15	
		79.36	0	0.10	
		155.0	6	0.25	
	Mitomycin C	0.05	47	17.20#	***
	Noscapine	35.0	37	0.65#	**

† Analysis conducted using Fisher's Exact Test; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.
# Exceeded historical negative control range.

不純物E* **: Genetic Toxicity Evaluation Using The Mouse Lymphoma Cell Thymidine Kinase Locus Assay**

Test for induction of: Gene mutation and chromosome aberrations.	**Number of independent assays:** 2	**Study number:** 8316542
Strains: L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma 3.7.2.c	**Number of replicate cultures:** 2 (vehicle control), 2 (test article)	**GLP compliance:** Yes
Metabolising system: Aroclor-induced rat liver S-9, 2%	**Number of cells tested/culture:** 1 x 10^7 (3 hour treatment) 4 x 10^6 (24 hour treatment)	**Testing Facility:** [redacted], UK
Vehicles: **For Test Article:** DMSO	**For positive controls:** DMSO	
Treatment: Mutation Experiment 1 - 3 hour exposure in the absence and presence of S-9 and 24 hour exposure in the absence of S-9. Mutation Experiment 2, 24 hour exposure in the absence of S-9.		**Date of treatment:** [redacted] 20[redacted] (Mutation Experiment 1) [redacted] 20[redacted] (Mutation Experiment 2)

Cytotoxic effects: In Mutation Experiment 1, Relative Total Growth (RTG) reduced to 82% and 86% at 375 µg/mL [2.43 mmol/L] following 3 hour treatments in the absence and presence of S-9, respectively and to 17% at 375 µg/mL [2.43 mmol/L] following 24 hour treatment in the absence of S-9. In Mutation Experiment 2, RTG reduced to 14% at 350 µg/mL [2.27 mmol/L] following 24 hour treatment in the absence of S-9.

Genotoxic effects: 不純物E* (a sidechain impurity of selumetinib) induced mutation at the tk locus of L5178Y mouse lymphoma cells when tested for 24 hours in the absence of a rat liver metabolic activation system (S-9), in two independent experiments, but only at toxic concentrations above 2 mM (more than twice the regulatory maximum concentration as recommended in the ICH S2(R1) guideline.

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL) [mmol/L]	Study number: 8316542 Mutation Experiment 1 (3 hours)			
			Suspension Growth	Relative 2 Day Viability (%)	Relative Total Growth (%)	Mutant Frequency (x 10^{-6})
Without Activation	DMSO	0	19.99	100.00	100.00	72.86
	不純物E*	9.638 [0.063]	19.85	139.96	138.98	48.16
		19.28 [0.13]	15.25	105.58	80.53	64.58
		38.55 [0.25]	20.42	104.06	106.28	64.78
		77.10 [0.50]	20.13	92.06	92.71	72.39
		154.2 [1.00]	20.54	89.82	92.30	65.65
		250.0 [1.62]	17.91	100.79	90.31	69.19
		375.0 [2.43]	18.51	88.49	81.95	76.18
	Methyl methane sulphonate	15	18.16	74.85	68.01	615.19
		20	16.22	62.24	50.51	1004.42
With Activation	DMSO	0	22.23	100.00	100.00	75.06
	不純物E*	9.638 [0.063]	19.17	94.20	81.21	77.89
		19.28 [0.13]	19.78	108.84	96.84	66.64
		38.55 [0.25]	17.75	113.07	90.28	65.64
		77.10 [0.50]	18.17	113.26	92.54	61.82
		154.2 [1.00]	19.50	103.88	91.13	64.18
		250.0 [1.62]	19.20	97.77	84.43	78.50
		375.0 [2.43]	17.59	108.66	85.97	71.42
	Benzo[a]pyrene	2	13.62	82.65	50.64	580.97
		3	9.99	92.82	41.69	692.28

Analysis conducted using Linear Trend test; in the absence of S9 p-value = 0.1447 (Not Significant), in the presence of S9 p-value = 0.3894 (Not Significant).

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL) [mmol/L]	Study number: 8316542 Mutation Experiment 1 (24 hours)			
			Suspension Growth	Relative 2 Day Viability (%)	Relative Total Growth (%)	Mutant Frequency (x 10^{-6})
Without Activation	DMSO	0	101.08	100.00	100.00	71.12
	不純物E*	9.638 [0.063]	99.24	111.58	109.56	67.75
		19.28 [0.13]	94.21	103.34	96.32	69.54
		38.55 [0.25]	91.50	101.65	92.02	82.55
		77.10 [0.50]	104.40	100.82	104.13	74.98
		154.2 [1.00]	87.94	98.40	85.61	89.94
		250.0 [1.62]	30.75	96.07	29.23	129.48
		375.0 [2.43]	17.00	100.00	16.81	205.09 #
	Methyl methanesulphonate	5	71.72	83.06	58.94	786.68
		7.5	59.33	74.97	44.00	1049.98

Analysis conducted using Linear Trend test; in the absence of S9 p-value = 0.001 ($p<0.01$)

The Mutant Frequency of the test concentration exceeds the sum of the mean control MF plus GEF.

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (µg/mL) [mmol/L]	Study number: 8316542 Mutation Experiment 2 (24 hours)			
			Suspension Growth	Relative 2 Day Viability (%)	Relative Total Growth (%)	Mutant Frequency (x 10^{-6})
Without Activation	DMSO	0	58.42	100.00	100.00	68.64
	不純物E*	150 [0.973]	43.87	95.78	71.93	72.66
		200 [1.30]	20.26	80.76	28.01	99.26
		250 [1.62]	12.54	83.08	17.83	135.93
		300 [1.95]	9.44	97.16	15.71	140.78
		325 [2.11]	9.97	87.93	15.00	195 #
		350 [2.27]	9.52	83.08	13.53	206.37 #
	Methyl methanesulphonate	5.0	55.44	54.54	51.76	862.59
		7.5	53.27	34.03	31.03	1510.08

Analysis conducted using Linear Trend test; in the absence of S-9 p-value = <0.001 (p<0.001)

The Mutant Frequency of the test concentration exceeds the sum of the mean control MF plus GEF.

不純物F* **Bacterial Mutation Assay In S.Typhimurium And E Coli**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.

Number of independent assays: 4

Study number: YV7433

Strains: *S.typhimurium* (TA1535, TA1537, TA98, TA100) and *E.coli* (WP2P, WP2P *uvrA*)

Number of replicate cultures:
3 for Test Article and positive controls
5 for vehicle control

GLP compliance: Yes

Metabolising system: Phenobarbital and β-naphthoflavone-induced rat liver S9, 10%

Number of cells analysed/culture: Not applicable

Testing Facility: [redacted] Ltd, UK

Vehicles: **For Test Article:** DMSO

For positive controls: DMSO (2-aminoanthracene, acridine mutagen ICR191, benzo[a]pyrene, daunomycin HCl, N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) and water (mitomycin C, sodium azide)

Treatment: Assay 1: (-/+S9), plate incorporation for 72 hours. Assay 2: (-S9), plate incorporation for 72 hours; (+S9), pre-incubation (60 minutes) followed by 72 hours plate incubation. Assays 3 and 4: (+S9), pre-incubation (60 minutes) followed by 72 hours plate incubation.

Date of treatment: [redacted] to [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: None.

Genotoxic effects: Under the conditions of this assay, 不純物F* gave a positive, i.e. mutagenic, response in *S.typhimurium* strain TA98 in the presence of S9-mix using a preincubation protocol.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7433 Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
Without activation	DMSO	100 μL/plate	107.8 (7.2)	7.2 (2.8)	12.2 (4.1)	30.8 (7.3)	54.0 (4.0)	117.6 (13.7)
	不純物F*	100	108.0 (10.1)	10.0 (1.0)	11.7 (1.2)	34.0 (5.3)	68.0 (9.8)	135.0 (10.5)
		200	96.0 (23.9)	9.7 (3.5)	11.7 (1.2)	36.7 (6.1)	56.7 (4.7)	133.0 (11.8)
		500	102.7 (4.0)	9.7 (4.2)	15.0 (2.0)	38.0 (1.0)	59.7 (7.1)	111.7 (20.3)
		1000	111.7 (7.5)	8.0 (4.4)	11.7 (3.5) [P]	37.3 (4.2) [P]	48.3 (4.0)	108.0 (20.3)
		2500 [P]	92.7 (18.0)	8.3 (0.6)	9.3 (2.1)	35.3 (2.1)	43.0 (1.0)	141.0 (5.0)
		5000 [P]	105.7 (11.6)	5.7 (4.0)	5.7 (3.1)	35.0 (3.5)	47.3 (4.0)	117.0 (27.5)
	Sodium Azide	2	817.0 (4.4)	643.7 (64.1)				
	ICR191	2			1327.3 (52.9)			
	Daunomycin HCl	1				378.3 (49.8)		
	Mitomycin C	1					472.7 (61.8)	
	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	1						398.7 (21.2)

No statistical analysis was conducted.
[P] Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7433 Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
With activation	DMSO	100 μL/plate	129.6 (12.7)	8.4 (1.8)	12.6 (3.0)	40.6 (5.3)	83.6 (11.9)	169.0 (17.9)
	不純物F*	100	125.0 (30.2)	11.3 (2.1)	11.3 (1.2)	51.7 (4.0)	81.7 (20.6)	156.7 (11.2)
		200	125.3 (27.8)	6.3 (3.2)	18.7 (1.5)	55.7 (5.1)	91.7 (2.9)	197.0 (7.5)
		500	116.7 (8.7)	11.0 (3.6)	18.3 (3.5)	62.0 (4.6)	92.3 (11.2)	203.0 (13.1)
		1000	133.3 (8.1)	9.0 (2.6) [P]	14.0 (3.0) [P]	60.7 (12.1)	79.3 (5.9)	193.0 (20.3)
		2500 [P]	134.7 (2.5)	8.0 (1.0)	14.0 (5.3)	65.3 (9.5)	58.7 (5.0)	154.7 (28.7)
		5000 [P]	149.3 (25.0)	9.0 (3.5)	13.3 (0.6)	70.7 (20.5)	63.7 (11.1)	193.0 (18.0)
	2-Aminoanthracene	1	554.3 (62.8)			750.3 (141.8)		
		2		132.3 (11.7)	76.3 (7.8)			
		20					272.3 (47.5)	
	Benzo[a]pyrene	5						1024.3 (75.2)

No statistical analysis was conducted.
[P] Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7433 Assay 2: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98	WP2 pKM101	WP2 *uvrA* / pKM101
Without activation	DMSO	100 μL/plate	86.4 (5.1)	6.4 (0.9)	6.6 (1.9)	28.2 (5.2)	53.4 (10.2)	154.2 (16.7)
	不純物F*	100	81.3 (9.5)	8.7 (2.3)	3.7 (2.5)	28.7 (9.1)	51.7 (8.4)	116.0. (9.8)
		200	95.3 (8.4)	7.7 (1.5)	9.3 (1.4)	29.7 (5.9)	66.0 (7.8)	116.3 (10.0)
		500	89.0 (10.4)	4.3 (1.2)	4.0 (1.0)	29.3 (2.5)	65.0 (4.4)	140.3 (15.1)
		1000	82.7 (1.5)	7.7 (1.5)	6.0 (0.0)	27.7 (2.5)	60.0 (8.9)	123.7 (10.8)
		2500	81.0 (6.2) [P]	9.0 (1.0)	4.7 (1.5) [P]	32.0 (4.4) [P]	53.7 (6.0) [P]	126.0 (20.1)
		5000 [P]	72.3 (5.7)	7.3 (2.1)	6.0 (1.7)	33.3 (12.1)	57.0 (3.6)	122.7 (5.1)
	Sodium Azide	2	812.0 (45.2)	771.3 (16.2)				
	ICR191	2			1137.7 (154.4)			
	Daunomycin HCl	1				274.7 (31.3)		
	Mitomycin C	1					520.7 (24.5)	
	N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	1						419.7 (20.6)

No statistical analysis was conducted.
[P] Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7433 Assay 2: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100	TA1535	TA1537	TA98		WP2 *uvrA* / pKM101
With activation	DMSO	20 μL/plate	107.2 (6.1)	10.4 (3.8)	12.0 (2.0)	43.0 (3.5)		252.6 (5.1)
	不純物F*	100	97.7 (5.5)	6.3 (2.5)	14.0 (3.6)	113.0 (15.6)		231.7 (24.9)
		200	131.7 (6.7)	9.3 (3.5)	13.0 (2.0)	129.7 (18.8)		210.3 (23.5)
		500	107.7 (5.5)	11.7 (3.2)	9.7 (1.5)	148.7 (21.0)		217.3 (22.3)
		1000	100.7 (11.4) [P]	11.7 (3.1)	10.7 (3.1) [P]	84.0 (9.5) [P]		177.3 (23.9)
		2500 [P]	119.7 (15.0)	8.3 (4.9)	11.7 (6.5)	98.3 (13.7)		212.0 (26.2)
		5000 [P]	112.3 (11.2)	10.7 (3.2)	11.3 (3.1)	124.3 (28.7)		208.7 (26.3)
	2-Aminoanthracene	1	488.0 (131.1)			1557.0 (480.1)		
		2		201.7 (23.7)	112.7 (31.7)			
	Benzo[a]pyrene	5						979.0 (71.9)

No statistical analysis was conducted.
[P] Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7433 Assay 3: Revertant colony counts, mean (SD)					
						TA98		
With activation	DMSO	20 μL/plate				39.4 (3.6)		
	不純物F*	100				103.0 (11.4)		
		200				124.7 (23.9)		
		500				137.3 (23.9)		
		1000 [P]				95.0 (25.2)		
		2500 [P]				81.3 (5.0)		
		5000 [P]				103.7 (32.1)		
	2-Aminoanthracene	1				1946.7 (698.3)		

No statistical analysis was conducted.
[P] Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7433 Assay 4: Revertant colony counts, mean (SD)					
							WP2 pKM101	
With activation	DMSO	20 μL/plate					78.4 (3.6)	
	不純物F*	100					89.7 (11.0)	
		200					81.3 (16.0)	
		500					95.7 (13.1)	
		1000					82.7 (21.4)	
		2500 P					44.0 (7.2)	
		5000 P					36.0 (8.7)	
	2-Aminoanthracene	20					102.0 (17.7)	

Control data from concurrent plate incorporation study (YV7451 Phase 3):

With activation	DMSO	100 μL/plate					56.4 (5.5)	
	2-Aminoanthracene	20					157.3 (82.9)	

No statistical analysis was conducted.
P　Precipitate.

不純物I* **: Bacterial Mutation Assay In S.Typhimurium**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.

Number of independent assays: 3

Study number: YV7145

Strains: *S.typhimurium* (TA98, TA100)

Number of replicate cultures:
3 for Test Article and positive controls
5 for vehicle control

GLP compliance: No

Metabolising system: Phenobarbital and β-naphthoflavone-induced rat liver S9, 10%

Number of cells analysed/culture: Not applicable

Testing Facility: [redacted], [redacted] Ltd, UK

Vehicles: **For Test Article:** DMSO

For positive controls: DMSO (2-aminoanthracene, daunomycin HCl) and water (sodium azide)

Treatment: Assay 1: (-/+S9), plate incorporation for 72 hours. Assays 2 and 3: (+S9), pre-incubation (60 minutes) followed by 72 hours plate incubation.

Date of treatment: [redacted] to [redacted] [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: None.

Genotoxic effects: Under the specific conditions of this assay, 不純物I* gave a negative, i.e. non-mutagenic, response in both the presence and absence of S9-mix.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7145 Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100			TA98		
Without activation	DMSO	100 μL/plate	96.0 (11.2)			16.8 (5.3)		
	不純物I*	100	94.7 (19.6)			22.0 (5.6)		
		200	89.7 (15.0)			23.0 (11.8)		
		500	82.0 (6.2)			24.7 (4.2) P		
		1000 P	68.7 (8.6)			19.7 (4.7)		
		2500 P	58.0 (1.0)			11.7 (4.2)		
		5000 P	63.7 (8.6)			12.3 (4.5)		
	Sodium Azide	2	710.3 (36.5)					
	Daunomycin HCl	1				310.3 (39.1)		
With activation	DMSO	100 μL/plate	132.4 (9.0)			36.6 (3.8)		
	不純物I*	100	115.0 (8.2)			39.7 (2.5)		
		200	128.3 (10.5)			45.3 (9.1)		
		500	114.0 (12.3)			29.7 (9.0)		
		1000 P	99.3 (12.6)			33.7 (3.1)		
		2500 P	95.7 (20.6)			28.0 (5.3)		
		5000 P	65.7 (9.3)			29.0 (8.5)		
	2-Aminoanthracene	1	788.3 (98.3)			1553.3 (762.7)		

No statistical analysis was conducted.

P　Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7145 Assay 2: Revertant colony counts, mean (SD)					
			TA100			TA98		
With activation	DMSO	20 μL/plate	153.0 (18.6)			49.0 (8.1)		
	不純物I*	100	183.7 (1.5)			25.0 (2.0)		
		200	155.3 (11.6)			37.0 (9.8) P		
		500 P	160.3 (4.9)			26.3 (6.4)		
		1000 P	128.3 (16.7)			29.3 (9.1)		
		2500 P	91.7 (13.5)			32.3 (9.1)		
		5000 P	102.3 (11.1)			25.7 (12.5)		
	2-Aminoanthracene	1	939.7 (216.6)			1986.3 (469.5)		

No statistical analysis was conducted.
P　Precipitate.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Study number: YV7145 Assay 3: Revertant colony counts, mean (SD)					
						TA98		
With activation	DMSO	20 μL/plate				22.2 (6.2)		
	不純物I*	100				27.3 (12.1)		
		200 P				25.0 (6.6)		
		500 P				40.0 (4.0)		
		1000 P				29.0 (6.1)		
		2500 P				24.0 (4.0)		
		5000 P				24.7 (2.5)		
	2-Aminoanthracene	1				2332.0 (689.7)		

No statistical analysis was conducted.
P　Precipitate.

不純物G* **: Genetic Toxicity Evaluation Using the Bacterial Reverse Mutation Test in Salmonella typhimurium TA98, TA100, TA1535 and TA1537 and Escherichia coli WP2 uvrA (pKM101)**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.

Number of independent assays: 1

Study number: 8466469

Strains:
S.typhimurium (TA98, TA100, TA1535, TA1537), *E.coli* (WP2*uvrA*(pKM101))

Number of replicate cultures:
3 for vehicle
3 for Test Article and positive controls

GLP compliance: Yes

Metabolizing system:
β-Naphthoflavone/Phenobarbital induced rat liver S-9, 10%

Number of cells analysed/culture: Not applicable

Testing Facility: [redacted], UK

Vehicles:
For Test Article: anhydrous analytical grade dimethyl sulphoxide (DMSO)

For positive controls: DMSO (2-nitrofluorene, 9-aminoacridine, 2-aminoanthracene, benzo[a]pyrene, 4-nitroquinoline 1-oxide) and water (sodium azide)

Treatment: Assay 1 (-/+S9), plate incorporation for 72 hours.

Date of treatment: [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: Evidence of toxicity was observed at 1600 µg/plate and above in all strains in the absence and presence of S-9.

Genotoxic effects: None.

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant Colony Counts, Mean ± SD				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvrA* (pKM101)
Without activation	DMSO	100 μL/plate	36 ± 7	135 ± 4	18 ± 4	16 ± 6	143 ± 5
	不純物G*	5	36 ± 5	114 ± 10	14 ± 3	18 ± 7	184 ± 56
		16	44 ± 2	135 ± 8	8 ± 3	10 ± 1	154 ± 6
		50	36 ± 9	123 ± 5	11 ± 5	17 ± 2	150 ± 16
		160	39 ± 1 C M	127 ± 10	12 ± 4	15 ± 5	173 ± 22
		500	33 ± 8	133 ± 13	12 ± 6	12 ± 5	174 ± 3
		1600	- T	69 ± 7 S	8 ± 3 S M	5 ± 4 S B M	48 ± 13 S
		5000	- T	- T	- T	- T	- T
	2-Nitrofluorene	5	1236 ± 45				
	Sodium Azide	2		1017 ± 49	900 ± 48		
	9-Aminoacridine	50				723 ± 46	
	4-Nitroquinoline 1-oxide	2					2006 ± 138

No statistical analysis was conducted.
Means and Standard Deviation values are generated from unrounded values exported directly from data capture software, and so may appear to vary from those presented to 1 decimal place in the study report.

M　Plate scored manually.
C　Contaminated plate.
B　Bubbles or Split in agar.
S　Slightly reduced lawn.
T　Toxic, no revertant colonies.

Metabolic Activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant Colony Counts, Mean ± SD				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvrA* (pKM101)
With activation	DMSO	100 μL/plate	52 ± 2	153 ± 14	15 ± 5	25 ± 6	218 ± 16
	不純物G*	5	80 ± 43	128 ± 30	14 ± 4	32 ± 5	196 ± 38
		16	47 ± 6	133 ± 11	14 ± 3	31 ± 6	195 ± 4
		50	53 ± 5	161 ± 8	13 ± 2	23 ± 6	218 ± 14
		160	49 ± 3	154 ± 23	14 ± 4	32 ± 4	183 ± 9
		500	78 ± 12	124 ± 23	10 ± 1	16 ± 4	179 ± 14
		1600	18 ± 4 B S M	79 ± 15 S	10 ± 4 S	5 ± 2 S B M	80 ± 17 S
		5000	- T	- T	- T	- T	- T
	Benzo[a]pyrene	10	206 ± 137				
	2-Aminoanthracene	5		3449 ± 185	238 ± 25	349 ± 12	
		10					1066 ± 49

No statistical analysis was conducted.
Means and Standard Deviation values are generated from unrounded values exported directly from data capture software, and so may appear to vary from those presented to 1 decimal place in the study report.

M　Plate scored manually.

B　Bubbles or Split in agar.

S　Slightly reduced lawn.

T　Toxic, no revertant colonies.

不純物H* **: Genetic Toxicity Evaluation using a Bacterial Reverse Mutation Test with Salmonella typhimurium LT2 Strains TA1535, TA1537, TA98 and TA100, and Escherichia coli WP2 Strain uvrA/pKM101**

Test for induction of: Reverse mutation in bacterial cells.	**Number of independent assays:** 1	**Study number:** AME01418
Strains: *S.typhimurium* (TA98, TA100, TA1535, TA1537), *E.coli* (WP2*uvrA*(pKM101))	**Number of replicate cultures:** 3	**GLP compliance:** Yes
Metabolizing system: Aroclor induced rat liver S9, 10% and Aroclor induced hamster liver S9, 10%	**Number of cells analysed/culture:** Not applicable	**Testing Facility:** [redacted], United Kingdom

Vehicles: **For Test Article:** DMF　**For positive controls:** DMSO (2-nitrofluorene, 2-aminoanthracene) and Water (sodium azide, 9-aminoacridine HCl, potassium dichromate)

Treatment: (-S9/+ rat liver S9/+ hamster liver S9), liquid pre-incubation (60 minutes) followed by 3 days plate incubation　**Date of treatment:** [redacted] 20[redacted]

Cytotoxic effects: The minimum dose showing evidence of cytotoxicity ranged from 1600 to 5000 μg/plate depending on strain and S9 condition.

Genotoxic effects: None.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvrA* (pKM101)
Without activation	DMF	100 μL/plate	27 (2.3)	121 (3.8)	13 (1.2)	10 (0.6)	153 (16.3)
	DMSO	100 μL/plate	28 (2.1)	121 (2.3)	13 (0.6)	9 (1.2)	163 (2.5)
	不純物H*	0.5	28 (3.5)	118 (3.8)	12 (1.0)	9 (1.0)	140 (4.6)
		1.6	27 (4.2)	118 (4.5)	12 (0.0)	8 (1.5)	146 (14.9)
		5	27 (3.1)	119 (4.0)	12 (2.0)	8 (0.6)	147 (10.1)
		16	28 (1.2)	116 (7.2)	13 (0.6)	9 (1.5)	143 (13.7)
		50	27 (2.9)	119 (6.4)	11 (1.2)	9 (1.2)	144 (15.0)
		160	25 (1.0)	119 (2.1)	12 (1.0)	8 (1.2)	148 (5.6)
		500	29 (2.0)	108 (6.1)	13 (1.2)	9 (1.2)	147 (12.0)
		1600	18 (8.1) [R]	84 (10.7) [R]	8 (2.6) [R]	4 (2.5) [R]	76 (11.8) [R]
		5000	0 (0.0) [F]	0 (0.0) [F]	0 (0.0) [F]	0 (0.0) [F]	0 (0.0) [F]
	2-Nitrofluorene	1	609 (139.8)				
	Sodium Azide	0.5		508 (61.7)	378 (29.1)		
	9-Aminoacridine	50				171 (13.7)	
	Potassium dichromate	25					1008 (20.5)

No statistical analysis was conducted.

[R] Reduced lawn.

[F] Pseudorevertants.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvrA* (pKM101)
With activation Rat Liver S9	DMF	100 μL/plate	35 (4.0)	139 (7.2)	11 (1.2)	10 (0.6)	195 (8.5)
	DMSO	100 μL/plate	33 (3.6)	136 (6.7)	11 (1.2)	10 (2.1)	196 (14.6)
	不純物H*	0.5	34 (5.7)	139 (12.5)	11 (1.5)	11 (1.2)	179 (11.5)
		1.6	32 (2.1)	135 (2.5)	12 (1.5)	11 (0.6)	180 (5.1)
		5	32 (7.2)	144 (3.8)	11 (2.1)	11 (2.1)	193 (17.0)
		16	32 (3.5)	139 (2.6)	11 (1.5)	10 (0.6)	190 (17.7)
		50	37 (2.5)	136 (3.6)	10 (0.0)	10 (1.0)	177 (7.1)
		160	29 (3.2)	145 (2.1)	11 (1.2)	11 (0.6)	198 (12.1)
		500	34 (5.0)	131 (5.3)	10 (0.6)	11 (0.0)	179 (8.4)
		1600	31 (0.6)	137 (4.9)	11 (0.6)	12 (1.5)	180 (14.7)
		5000	27 (0.6) [R]	111 (15.5) [R]	9 (3.0) [R]	8 (2.9) [R]	111 (19.2) [R]
	2-Aminoanthracene	2	1363 (95.0)	1094 (13.0)	135 (17.8)	113 (6.6)	
		20					1741 (146.4)

No statistical analysis was conducted.
[R] Reduced lawn.

Metabolic activation	Test Article	Concentration (μg/plate)	Assay 1: Revertant colony counts, mean (SD)				
			TA98	TA100	TA1535	TA1537	WP2*uvrA* (pKM101)
With activation Hamster Liver S9	DMF	100 μL/plate	37 (4.9)	138 (4.6)	13 (2.1)	11 (1.0)	177 (11.3)
	DMSO	100 μL/plate	28 (2.6)	136 (8.5)	12 (1.2)	10 (1.5)	181 (10.7)
	不純物H*	0.5	37 (2.1)	142 (3.6)	13 (0.6)	10 (0.6)	162 (12.1)
		1.6	29 (1.5)	138 (7.8)	11 (1.5)	11 (0.6)	156 (13.5)
		5	30 (2.6)	132 (5.6)	12 (1.2)	10 (0.0)	166 (9.6)
		16	34 (5.5)	139 (11.5)	13 (1.5)	11 (1.5)	157 (13.9)
		50	35 (3.5)	130 (3.2)	12 (3.2)	12 (1.7)	158 (13.4)
		160	36 (5.0)	139 (7.8)	13 (1.5)	10 (1.2)	168 (6.1)
		500	33 (4.9)	132 (6.0)	11 (1.5)	12 (1.5)	157 (13.3)
		1600	36 (5.0)	146 (9.5)	11 (0.6)	11 (2.6)	148 (6.8)
		5000	28 (2.1) [R]	111 (3.5) [R]	9 (4.2) [R]	9 (1.2) [R]	104 (7.0) [R]
	2-Aminoanthracene	2	1320 (38.7)	1032 (49.4)	143 (4.5)	112 (4.6)	
		20					1022 (51.2)

No statistical analysis was conducted.
[R] Reduced lawn.

2.6.7.17.3　光毒性試験

Species / Strain	Method of administration	Duration of dosing	Doses (μg/mL)	Gender and number per group	Noteworthy findings	Testing Facility	Study number
Balb/c 3T3 fibroblasts	In vitro Evaluation of phototoxicity using the Neutral Red Uptake Assay	Not applicable	0.316 to 1000	Not applicable	Selumetinib (formerly referred to as AZD6244 hyd-sulfate) was positive for induction of phototoxicity when tested up to the maximum recommended concentration, according to the OECD guideline. Calculated PIF values, based on theoretical IC_{50} values, were 5.303 and 5.334 for experiments 1 and 2 respectively.	[redacted], UK	88/459

Study 88/459 contains a GLP statement.