目次

表一覧
略号及び用語の定義
2.4　非臨床試験の概括評価
2.4.1　非臨床試験計画概略
2.4.2　薬理試験
2.4.2.1　効力を裏付ける試験
2.4.2.1.1　In vitro での効力を裏付ける試験
2.4.2.1.2　In vivo での効力を裏付ける試験
2.4.2.2　副次的薬理試験
2.4.2.3　安全性薬理試験
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験
2.4.3　薬物動態試験
2.4.3.1　分析法及びバリデーション報告書
2.4.3.2　吸収
2.4.3.3　分布
2.4.3.4　代謝
2.4.3.5　排泄
2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用
2.4.4　毒性試験
2.4.4.1　単回投与毒性試験
2.4.4.2　反復投与毒性試験
2.4.4.2.1　マウス
2.4.4.2.2　ラット
2.4.4.2.3　イヌ
2.4.4.3　遺伝毒性試験
2.4.4.3.1　In vitro
2.4.4.3.2　In vivo
2.4.4.4　がん原性試験
2.4.4.5　生殖発生毒性試験
2.4.4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験
2.4.4.5.2　胚・胎児発生に関する試験
2.4.4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験
2.4.4.5.4　新生児（幼若動物）を用いた試験
2.4.4.6　局所刺激性試験
2.4.4.7　その他の毒性試験
2.4.4.7.1　抗原性／免疫原性試験
2.4.4.7.2　免疫毒性試験

2.4.4.7.3　作用機序
2.4.4.7.4　依存性
2.4.4.7.5　代謝物
2.4.4.7.6　不純物
2.4.4.7.7　その他の毒性試験
2.4.5　総括及び結論
2.4.6　参考文献

表一覧

表 2.4-1　MK-6482の不純物及びその用量比

表 2.4-2　MK-6482の曝露量比

略号及び用語の定義

略号	定義	
ADME	Absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	アリール炭化水素受容体核内輸送体
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC0-24	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours	投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC0-tau	Area under the plasma concentration-time curve from time over one dose interval	投与間隔の血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast Cancer Resistant Protein	乳癌耐性蛋白
BCS	Biopharmaceutics Classification System	—
BID	Twice daily	1 日 2 回
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma	淡明細胞型腎細胞癌
CL_p	Plasma clearance	血漿クリアランス
Cmax	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
FOB	Functional Observational Battery	機能観察総合評価
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
hERG	Human ether-á-go-go related gene	ヒト ether-á-go-go 関連遺伝子
HIF	Hypoxia-inducible factor	低酸素誘導因子
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1 alpha	低酸素誘導因子 1α
HIF-2α	Hypoxia-inducible factor-2 alpha	低酸素誘導因子 2α
HPMCAS-HF	Hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate-HF	ヒドロキシプロピルメチルセルロース酢酸エステルコハク酸エステル-HF
HRE	Hypoxia-response element	低酸素応答配列
HRMS	High resolution mass spectrometry	高分解能質量分析
IC_{50}	Half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IKr	Rapid delayed rectifier (channel)	急速活性型遅延整流カリウムチャネル電流
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析
LSC	Liquid scintillation counting	液体シンチレーションカウンター
MATE	Multidrug and toxin extrusion protein	多剤・毒素化合物排出蛋白質
MC	Methylcellulose	メチルセルロース
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	メッセンジャーRNA
MS/MS	Tandem mass spectrometry	タンデム質量分析
NOAEL	No-observed-adverse-effect level	無毒性量
OAT	Organic Anion Transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic Cation Transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構

略号	定義	
PAS	Per-ARNT-Sim	—
PBPK	Physiologically based pharmacokinetic (modeling)	生理学的薬物速度論（モデル）
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
PT3317	Glucuronide Conjugate of MK-6482	MK-6482 のグルクロン酸抱合体
QD	Once daily	1 日 1 回
RT-qPCR	Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SD	Sprague Dawley	—
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
TRIS	Tromethamine	トリスヒドロキシメチルアミノメタン
UGT	Uridine 5'-diphosphoglucuronosyl transferase	ウリジン 5'-二リン酸グルクロン酸転移酵素
Vd_{ss}	Distribution volume at steady state	定常状態時の分布容積
VEGF	Vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
VEGFa	Vascular endothelial growth factor A	血管内皮細胞増殖因子 A
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A gene	血管内皮細胞増殖因子 A 遺伝子
VHL	von Hippel-Lindau	フォン・ヒッペル・リンドウ
VHL	von Hippel-Lindau gene	フォン・ヒッペル・リンドウ遺伝子
w/v	Weight/volume	重量／体積比

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　　非臨床試験計画概略

MK-6482（別名：PT2977、一般名：ベルズチファン）は低酸素誘導因子2α（HIF-2α）に結合し、その機能を直接抑制する。

HIF-1α 及び HIF-2α は腫瘍の低酸素応答経路で中心的な役割を果たす転写因子である。HIF-2α は ARNT（別名 HIF-1β）とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の低酸素応答配列（HRE）と結合する。標的遺伝子の誘導に必要な HIF-2α 及び ARNT のサブユニットの二量体化には、HIF の PAS ドメインが必須である。HIF-2α の PAS-B ドメインには固有のリガンド結合ポケットがあることが報告されている[4.3: 059L97]。

癌抑制因子である von Hippel-Lindau（VHL）蛋白質は特定の水酸化プロリン残基に結合し、E3 ユビキチンリガーゼ複合体の会合により HIF-2α 蛋白質のプロテアソームによる分解を誘導する。*VHL* 欠損を有する腫瘍では HIF-2α の安定化及び活性化が共通して認められることから、HIF-2α が VHL 病の病態の主要な要因であると考えられる。

MK-6482の選択性及び作用について、種々の in vitro 及び in vivo の薬理試験を実施した。HIF-2α に対する MK-6482の特異性及び選択性を in vitro にて確認した。MK-6482は *VHL* 欠損腫瘍異種移植マウスモデルで抗腫瘍効果を示し、MK-6482の0.3 mg/kg/回を1日2回、経口投与することにより、増殖した腫瘍がほぼ完全に退縮した。MK-6482は76種類の受容体及び8種類のイオンチャネルに対して10 µM（3.8 µg/mL）又は12.5 µM（4.8 µg/mL）の濃度で作用を示さず、40種類の蛋白質リン酸化酵素及び2種類の蛋白質脱リン酸化酵素に対して10 µM で作用を示さなかった。

重要な器官系への潜在的影響を評価するため、安全性薬理試験を独立した試験又は28日間及び13週間反復投与毒性試験（GLP）の一部として実施した。心筋 IKr チャネルへの潜在的影響を in vitro hERG 試験（GLP）にて評価した。ラットを用いた28日間毒性試験（GLP）では、中枢神経系への影響を評価するための FOB 及び呼吸機能評価のためのプレチスモグラフィ測定を実施した。In vivo での心電図及び血圧に対する潜在的影響は、イヌを用いた28日間及び13週間毒性試験（GLP）の中で評価した。実施したすべての非臨床薬理試験及び安全性薬理試験は薬理試験概要表[2.6.3.1 項]に示す。

非臨床薬理・安全評価プログラムの裏付けを行うため、マウス、ラット、イヌ及びサルを用いて、MK-6482の ADME を評価した。MK-6482の血漿蛋白結合、血液／血漿濃度比及び代謝についても非臨床動物モデルとヒトとの動物種間で比較し考察する。MK-6482が種々の薬物代謝酵素及び薬物トランスポーターの基質、阻害剤又は誘導剤である可能性について薬物相互作用の観点から考察する。実施した非臨床試験の一覧を薬物動態概要表に示す[2.6.5.1項]。

MK-6482の非臨床毒性試験として反復経口投与毒性試験（ラット及びイヌ、最長13週間）、in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験、ラット胚・胎児発生毒性予備試験、非妊娠ウサギ忍容性試験、並びにラット光毒性試験を実施した。また、げっ歯類のがん原性試験の試験デザイン及び用量設定のた

め、種々の MK-6482の処方を評価する探索的ラット TK 試験及びげっ歯類を用いた毒性試験を実施した。さらに、潜在的な不純物を含む MK-6482の毒性及び TK プロファイルの予備的評価のため、SD ラットを用いた13週間経口投与不純物評価試験を実施した。MK-6482の毒性試験プログラムの概要を[2.6.7.1 項]に示す。なお、げっ歯類を用いたがん原性試験成績は、MK-6482の承認取得後に提出予定である。重要な反復投与毒性試験（GLP 原則に準拠）は[redacted]（[redacted], Canada）、[redacted]（[redacted], USA）及び[redacted], Canada）、遺伝毒性試験（非 GLP 及び GLP）は[redacted], USA）及び[redacted], Canada）、生殖発生毒性試験（非 GLP）は Merck Research Laboratories（West Point, Pennsylvania, USA）、光毒性試験（GLP）は[redacted]（[redacted], USA）にて実施した。米国及びカナダは OECD 加盟国であるため、OECD データ相互受け入れ制度が適用される。GLP 遵守の陳述書はすべての GLP 試験報告書に含まれている。すべての重要な試験は、同試験内又は同一投与液を用いて同一の用量を投与し本試験と同じ条件下で実施された MK-6482の TK 評価によって支持された[2.6.7.2 項][2.6.7.3 項]。非臨床試験で使用した被験物質のバッチは[2.6.7.4 項]に示した。

ラット及びイヌは現在の臨床試験実施のためのガイダンス［ICH M3（R2）医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス］で認められている動物種である。ラット及びイヌにおいて MK-6482の PK 及び代謝物プロファイルの結果が良好であったため、毒性評価に用いる主要なげっ歯類及び非げっ歯類として両動物種を選択した。さらに、HIF 経路を介した酸素感知の仕組みは進化の過程で種を超えて保存されており[4.3: 05FQDJ]、HIF-2α のアミノ酸配列はヒトとラット又はイヌの間で高度に保存されている（85%を上回る相同性、PubMed Protein Blast Analysis より）[4.3: 05M5ZR]。

経口投与毒性試験は動物種に応じて異なる2種の投与レジメン［SD ラットは BID（12時間間隔）、イヌは QD 投与］で実施した。ラットではイヌに比べて MK-6482（[redacted]処方）の半減期が短く、またバイオアベイラビリティも低いことから[2.6.4.3.2 項][2.6.4.3.3 項]、SD ラットの試験では BID 投与が選択された。

毒性試験の高用量選択は、使用媒体（0.5%MC / 0.5%Tween 80水溶液）での MK-6482（[redacted]処方）の調製可能な最高濃度（20 mg/mL）、雄 SD ラット探索的毒性試験[2.6.7.6 項]及びイヌ PK 試験[2.6.4.3.3.1 項]の結果に基づいて決定した。雄 SD ラットを用いた探索的反復経口投与試験（非 GLP）では3、10、30及び100 mg/kg BID（6、20、60及び200 mg/kg/日）の用量を28日間投与し、その後65日間の回復期間を設けた。本試験の用量での MK-6482の SD ラットにおける忍容性は良好であったが、200 mg/kg/日群では有害で回復性のない精巣毒性が認められた。また、60及び200 mg/kg/日の用量間で全身曝露は用量比を下回る増加であった（用量は3.3倍の増加に対し、AUC0-24は約1.5倍の増加）。これらの結果から SD ラット28日間反復経口投与毒性試験（GLP）の高用量群として200 mg/kg/日を選択した。イヌでの MK-6482の全身曝露は30及び100 mg/kg/日の用量間で用量比を下回る増加であり、用量では3.3倍の増加に対し、100 mg/kg/日の AUC0-24は

30 mg/kg/日と比較して約1.3倍の増加であったことから、30 mg/kg/日以上の用量では意味のある全身曝露の増加は認められなかった。そのため、イヌを用いた28日間反復経口投与毒性試験（GLP）の高用量群として30 mg/kg/日を選択した。SD ラット及びイヌでみられた MK-6482の用量比を下回る曝露は、非線形の吸収及び BCS クラスIIの化合物（低溶解性及び高膜透過性）として分類される MK-6482の溶解性によるものと考えられた[2.7.1.1.3.1 項]。また、その後のげっ歯類のがん原性試験のため、ラット及びマウスを用いた異なる処方の MK-6482と種々の媒体の組合せを評価する試験を新たに実施した。SD 及び Wistar Han ラットを用いた単回経口投与 TK 試験の結果から[2.6.7.17 A 項]、0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH 7.2）を用いて調製した[redacted]処方の MK-6482がラットで最も高い曝露量を示したことから、以降のげっ歯類（Wistar Han ラット及び rasH2 Tg マウス）を用いた毒性試験（TT #[redacted]-1033、TT #[redacted]-9012、TT #[redacted]-1032及び TT #[redacted]-9011）ではこの処方を使用した。また、実施中の Wistar Han ラット及び rasH2 Tg マウスを用いたがん原性試験においても同じ処方を用いている。

原薬及び製剤の規格値は[3.2.S.4.1 項]及び[3.2.P.5.1 項]にそれぞれ示す。すべての不純物及び分解生成物は毒性試験において評価されたか、又は ICH Q3A（R2）及び ICH Q3B（R2）の安全性確認の必要な閾値未満であった。また ICH M7ガイドラインに従い変異原性の評価も実施した。

MK-6482を用いた非臨床毒性試験の詳細は以降に示す。結論として、MK-6482の毒性プロファイルから MK-6482の臨床用量での安全な使用が支持された。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

MK-6482は in vitro 及び in vivo で選択的な阻害作用を示し、細胞内で ARNT とのヘテロ二量体化を阻害することにより、HIF-2α の機能を抑制する。MK-6482の in vitro 及び in vivo での効力を裏付ける試験を実施した。

2.4.2.1.1　In vitro での効力を裏付ける試験

MK-6482は HIF-2α の PAS-B ドメインに結合し、放射標識プローブを置換することがシンチレーション近接法により示され、そのときの IC_{50}値は<0.005～0.015 µM（<1.9～5.8 ng/mL）の範囲であった。MK-6482のグルクロン酸抱合体代謝物である PT3317は、試験した最高濃度の100 µM での置換が50%未満であることから、HIF-2α の PAS-B ポケットに結合し難いことが確認された。

MK-6482による HIF-2α の阻害作用、選択性、作用機序及び遺伝子発現に及ぼす影響を、細胞を用いて検討した。MK-6482は786-O 細胞での低酸素応答配列（HRE）によるルシフェラーゼの発現及び血管内皮細胞増殖因子 A（VEGFa）の産生を低濃度で阻害し、そのときの IC_{50}値はそれぞれ0.015及び0.018 µM（5.8及び6.9 ng/mL）であった。さらに、MK-6482は786-O 細胞での定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）で測定した HIF-2α の標的遺伝子サイクリン D1遺伝子

（*CCND1*）、プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1遺伝子（*SERPINE1*）、*VEGFA* 及びグルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1遺伝子（*SLC2A1*）の転写を阻害した。MK-6482は Hep3B 細胞で HIF-2α による低酸素誘導遺伝子の転写を阻害したが、HIF-1α による転写には影響を及ぼさなかったことから、HIF-2α に対する選択性が示された。786-O 及び Hep3B 細胞での HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に対する MK-6482の作用を検討することにより、その作用機序を評価した。いずれの細胞株でも、MK-6482は濃度依存的にヘテロ二量体化を阻害した。また、MK-6482は Hep3B 細胞での HIF-1α と ARNT のヘテロ二量化には影響を及ぼさなかったことから、MK-6482の選択性が裏付けられた。

2.4.2.1.2　In vivo での効力を裏付ける試験

淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）由来786-O 細胞を用いた *VHL* 欠損腫瘍異種移植マウスモデルで、MK-6482の抗腫瘍効果を検討した。MK-6482は HIF-1α 及び HIF-2α の両蛋白質を発現する *VHL* 欠損 ccRCC 腫瘍に対して、用量依存的な抗腫瘍効果を示した。腫瘍の増殖抑制とともに、担癌マウスでの腫瘍由来血中 VEGFa 濃度及び腫瘍組織での HIF-2α の標的遺伝子の発現が減少した。また、MK-6482の投与により細胞増殖及び血管新生のマーカーの発現が減少し、アポトーシスのマーカーの発現が増加した。免疫不全マウスで継代した患者由来 ccRCC の異種移植マウスモデルで MK-6482の抗腫瘍効果を検討した。この腫瘍モデルでは、以前に VEGF 受容体キナーゼ活性阻害薬であり、ccRCC の標準治療薬であるスニチニブによる治療は無効であることが確認されている。これらの患者由来腫瘍に対して、MK-6482の投与によりほぼ完全な増殖抑制が認められた。いずれのマウスモデルでも全身状態の悪化、死亡及び体重減少は認められず、MK-6482は良好な忍容性を示した。これらの成績から、MK-6482による HIF-2α の阻害により、*VHL* 欠損 ccRCC 腫瘍マウスモデルでの治療効果が確認された。

ccRCC 由来 UMRC2細胞を用いた *VHL* 欠損腫瘍異種移植マウスモデルで、MK-6482とレンバチニブ又はカボザンチニブとの併用により、MK-6482の単独投与と比較し高い抗腫瘍効果が認められた。

患者由来の20種類の非小細胞肺癌、2種類の膀胱癌及び2種類の胆管癌を用いた異種移植マウスモデルで、MK-6482の投与による HIF-2α の阻害により、非小細胞肺癌1種類を除き統計学的に有意な抗腫瘍効果は認められなかった。

2.4.2.2　副次的薬理試験

MK-6482の選択性及びオフターゲット作用を評価する試験を実施した。76種類の受容体及び8種類のイオンチャネルに対する作用を検討した結果、MK-6482は10 µM（3.8 µg/mL）又は12.5 µM（4.8 µg/mL）の濃度で作用を示さなかった。また、40種類の蛋白質リン酸化酵素及び2種類の蛋白質脱リン酸化酵素に対する作用を検討した結果、MK-6482は10 µM の濃度で作用を示さなかった。

2.4.2.3　安全性薬理試験

重要な器官系に対する潜在的な影響を評価するため、安全性薬理試験を独立した試験又は28日間及び13週間反復投与毒性試験（GLP）の一部として実施した。心血管系への影響は、in vitro hERG試験（GLP）及びイヌを用いた反復投与毒性試験（28日間及び13週間、GLP）における心電図及び血圧測定により評価した。ラットを用いた28日間毒性試験（GLP）では、中枢神経系への影響を評価するための FOB 及び呼吸機能への影響を評価するためのプレチスモグラフィ測定を実施した。In vivo における評価では、評価した最高用量まで MK-6482に関連した影響はみられず、曝露量は臨床推奨用量（120 mg QD）を投与した際のヒト AUC0-24と同程度であった。In vitro hERG 試験から推定される IC_{50}は50 μM 超であり、がん患者に臨床推奨用量（120 mg QD）を投与した際の定常状態における非結合型 Cmax（3.63 μM、母集団薬物動態解析）から算出される in vitro 安全域は13.8倍超であった。

2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用試験

MK-6482はラット及びイヌの心血管系及び呼吸系、並びにラットでの一般症状及び行動に影響を及ぼさなかったため、薬力学的薬物相互作用試験を実施しなかった。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　分析法及びバリデーション報告書

In vitro において、LC-MS/MS 法を用いて、非臨床動物種の血漿中、尿中、組織ホモジネート中及びヒト生体試料中の MK-6482濃度並びに必要に応じて PT3317濃度を測定した。GLP 適用試験では、バリデートされた生体試料中薬物濃度分析法を用いた[2.6.4.2項]。

血漿中、尿中、糞中及び胆汁中に排泄された総放射能は LSC 法を用いて測定した。MK-6482及びその代謝物は HRMS 法及び放射能検出器により測定した。代謝物は、精密質量及び MS/MS によるフラグメンテーションのパターンに基づいて同定した[2.6.4.2項]。

2.4.3.2　吸収

非臨床動物種（マウス、ラット、イヌ及びサル）に MK-6482を経口投与した際、MK-6482は概して速やかに吸収された。経口バイオアベイラビリティはラット（10 mg/kg）では低く（18%）、イヌ及びサル（5 mg/kg）では中程度（それぞれ33%及び53%）、マウス（10 mg/kg）では高かった（約100%）。MK-6482の CL_p は、イヌ及びサルでは低く（それぞれ1.35及び3.7 mL/min/kg）、マウス及びラットでは中程度であった（それぞれ21.05及び36.2 mL/min/kg）。CL_p 及び肝抽出比から、ラット、イヌ及びサルでは完全に吸収されていないことが示唆される。MK-6482の半減期は、ラットでは短く（1.1時間）、マウス、イヌ及びサルでは中程度であった（それぞれ4.0、9.65及び10.4時間）。ラットにおける MK-6482の曝露量は30 mg/kg までは用量に比例して増加したものの、30

～300 mg/kg の用量範囲では用量比を下回った。また、イヌにおける MK-6482の曝露量は1～100 mg/kg の用量範囲で用量比を下回った。毒性試験で用いたラット及びイヌのいずれにおいても、MK-6482の曝露量に性差は認められなかった。

2.4.3.3　分布

MK-6482を静脈内投与した際の Vd_{ss} は、マウス、ラット、イヌ及びサルでそれぞれ4.94、2.09、1.81及び2.93 L/kg であり、動物種間で中程度であった。ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィー試験において、[^{14}C]-MK-6482由来放射能は、経口投与後速やかに吸収され、ほとんどの組織に速やかに広範に分布した。

有色及びアルビノラットのいずれにおいても、[^{14}C]-MK-6482由来放射能は組織へ可逆的に分布した。有色及び非有色皮膚組織への分布及び貯留は類似しており、メラニン結合はほとんど認められないことが示唆された。In vivo でラットにおいて脳への移行は中程度であったことから（脳／血漿濃度比0.36～0.53）、P-gp により MK-6482の脳への移行は限定的であることが示唆された。なお、MK-6482はラット P-gp の基質であり、ヒト P-gp の弱い基質である。MK-6482の血漿蛋白結合率は動物種間では類似しており、39%～55%（ヒト血漿中では55%）と中程度であった。MK-6482は赤血球と血漿でほぼ同様に分布し、血液／血漿濃度比は0.86～1.06（ヒトでは0.88）であった。

2.4.3.4　代謝

無処置及び胆管カニューレを施したラットに[^{14}C]-MK-6482を経口投与した際の代謝を検討した。MK-6482は様々な代謝を受け、主要な代謝経路は、酸化及び酸化的脱フッ素化、並びに二次的なグルクロン酸抱合化及びグルタチオン抱合化であった。放射能は主に胆汁中及び糞中に排泄された[2.6.4.5項]。肝細胞、肝組織調製試料及び遺伝子組換え酵素を用いた試験では、MK-6482は主にグルクロン酸抱合化及び酸化により代謝されることが示された。ヒトでは、グルクロン酸抱合化にはUGT2B17、酸化的代謝にはCYP2C19、一部CYP3A4も関与することが示唆された。UGT2B17及び CYP2C19は遺伝子多型を有する酵素であることより、遺伝子多型が MK-6482の消失に及ぼす影響及び MK-6482の消失に対する UGT2B17及び CYP2C19の相対的な寄与を検討する目的でゲノム薬理学解析を実施した。その結果、主な消失経路は UGT2B17であり、CYP2C19の寄与は小さいことが示唆された。In vitro において、肝臓試料中に検出されたすべてのヒトの代謝物は、非臨床動物種においても認められた。MK-6482のグルクロン酸抱合体である PT3317はヒトにおける主要な代謝物であり、血漿中における総放射能に対する割合は約9%であった[2.4.4.7.5 項]。PT3317は HIF-2α に対して活性を示さなかった。

2.4.3.5　排泄

ラットでは、MK-6482に由来する放射能は主に胆汁中及び糞中に排泄された。MK-6482の腎ク

リアランスはラット、イヌ及びサルで低かった。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

In vitro で、MK-6482の薬物代謝酵素又は薬物トランスポーターに対する阻害作用を検討した。その結果、MK-6482は主要な CYP 酵素（CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6及び3A4/5）又は UGT 酵素（UGT1A1、1A4、1A6、1A9、2B7及び2B17）を阻害する可能性は低いことが示された。薬物トランスポーター（P-gp、BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及び MATE2-K）に対する阻害作用を検討した結果、MATE2-K を除き、これらを阻害する可能性は低いことが示された。MATE2-K の基質は MATE1及び OCT2の基質となり得ること、MK-6482がこれらの他のトランスポーターに対して阻害作用を示さないこと、ヒト腎臓において MATE1及び OCT2と比べて MATE2-K の蛋白質の量が相対的に少ないことから、MATE2-K 阻害の臨床的な影響は小さいと考えられる。

MK-6482は CYP1A2及び2B6の誘導剤ではない。MK-6482の投与により、CYP3A4の mRNA 発現量は、30 µM まで濃度依存的に増加した。PBPK モデル解析の結果より、MK-6482は中程度の CYP3A4の誘導作用が示唆され、MK-6482を併用する場合は CYP3A4の基質の全身曝露量が低下する可能性がある。

2.4.4　毒性試験

MK-6482の非臨床毒性試験として反復経口投与毒性試験（ラット及びイヌ、最長13週間）、in vitro及び in vivo 遺伝毒性試験、ラット胚・胎児発生毒性予備試験、非妊娠ウサギ忍容性試験並びにラット光毒性試験を実施した。また、げっ歯類のがん原性試験の試験デザイン及び用量設定のため、種々の MK-6482の処方を評価する探索的ラット TK 試験及びげっ歯類を用いた毒性試験を実施した。MK-6482の毒性試験プログラムの概要を[2.6.7.1 項]に示す。

MK-6482のヒトに対する非臨床曝露量比は、第III相試験の母集団薬物動態解析（臨床用量120 mg/kg QD を日本人患者に投与した際の全身曝露量：AUC0-24 39.9 µg•hr/mL、Cmax 2.53 µg/mL）に基づいて算出した。

2.4.4.1　単回投与毒性試験

独立した急性毒性試験は行わなかったが、マウス（30～600 mg/kg/日）、ラット（2～300 mg/kg/日）及びイヌ（1～30 mg/kg/日）を用いた反復投与毒性試験において単回投与後の評価を実施した（[2.6.6.3 項]参照）。いずれの動物種でも、急性毒性を示唆する変化は認められなかった。

2.4.4.2　反復投与毒性試験

非臨床毒性試験の結果から、MK-6482のマウス（rasH2 Tg）、ラット（Wistar Han 及び SD）及びイヌ（ビーグル）を用いた28日間及び／又は13週間試験（GLP）における良好な忍容性が確認された。MK-6482に関連した赤血球量への影響はいずれの動物種でも一貫して認められた。影響の程度は、反復投与により赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値が約30～50%減少する程度で安定した。赤血球系への影響は、用量依存的かつ可逆的であり、MK-6482の薬理作用である腎臓でのエリスロポエチン発現に関わる HIF-2α 阻害に関連したものと考えられた[4.3: 05BTDF]。

2.4.4.2.1　マウス

MK-6482のマウス TK 試験（TT #[redacted]-1033、[2.6.7.17.A 項]）で得られた曝露量に基づいて、rasH2 Tg マウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験（GLP、TT #[redacted]-9012、[2.6.7.7.A 項]）を実施し、[redacted]処方の MK-6482［0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH 7.2）を用いて調製］を30、60、150及び600 mg/kg/日で投与した際の毒性及び TK 評価を実施した。[redacted]処方の MK-6482はすべての用量で良好な忍容性を示し、新たな毒性は認められなかった。MK-6482に関連した病理組織学的所見は、150 mg/kg/日以上の群の精巣（ごく軽度の精細管変性）でみられ、臓器重量の変化は60 mg/kg/日以上の群の精巣（減少）、600 mg/kg/日群（雌雄）の心臓（増加）及び600 mg/kg/日群（雌のみ）の肝臓（増加）で認められた。さらに、MK-6482に関連した血液学パラメータへの影響が30 mg/kg/日以上の群（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値及び平均赤血球ヘモグロビン量の減少、雌雄）及び600 mg/kg/日群（網状赤血球数の減少、雄のみ）でみられた。また、MK-6482に関連した血液生化学パラメータへの影響が600 mg/kg/日群［アルカリフォスファターゼ活性の増加（雌雄）、リン濃度の増加（雌のみ）］で認められた。

以上の結果から、NOAEL は雄で60 mg/kg/日、雌で600 mg/kg/日以上であった。

2.4.4.2.2　ラット

MK-6482の毒性評価のために、SD ラットを用いた探索的28日間反復経口投与毒性試験（非 GLP）、28日間及び13週間反復経口投与毒性試験（GLP）を実施した。いずれの試験も所見の可逆性評価のための回復期間を設けた。これらの試験では0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液を用いて調製した MK-6482（[redacted]処方）を使用した。すべてのラットの試験で類似又は共通した所見が認められた。

探索的毒性試験（TT #[redacted]-7823、[2.6.7.6 項]）では雄 SD ラットに MK-6482を3、10、30及び100 mg/kg BID（6、20、60及び200 mg/kg/日）の用量で28日間投与し、その後65日間の回復期間を設けた。MK-6482の忍容性はすべての用量で良好であったが、200 mg/kg/日群で有害な非可逆性の精巣毒性が認められた。

GLP 試験では MK-6482を SD ラットに28日（TT #[redacted]-7820、[2.6.7.7.B 項]）及び13週間（TT #[redacted]-7809、[2.6.7.7.C 項]）経口投与した際の毒性及び TK 評価を行い、その後最長26週間の回復期間を

設け回復性を評価した。

MK-6482（[redacted]処方）及び媒体（0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液）を BID（12時間±30分間隔）投与し、用量は28日間試験では3、10及び100 mg/kg BID（6、20及び200 mg/kg/日）、13週間試験では1（雄のみ）、3、10及び100 mg/kg BID（2、6、20及び200 mg/kg/日）であった。SD ラットを用いた両方の GLP 試験において、MK-6482の忍容性は良好であり、MK-6482に関連した変化として、可逆的な赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値）の減少（最大-37%）が認められ、MK-6482の薬理作用と一致していた。ラットでの赤血球パラメータへの影響は、影響がみられた動物で一般状態変化、骨髄及び脾臓などの造血組織での病理組織学的所見は認められなかったことから、本試験条件下では有害ではないと考えられた。ラット28日間毒性試験では対照群と比較して高用量群の雌でごく軽度の平均骨髄球系／赤芽球系比率の高値がみられた。この変化は赤血球前駆細胞及び平均リンパ球比率のごく軽度の低下によるものであり、有害ではないと考えられた。

急性低酸素症モデルのノックアウトマウスにおいて肺内皮 HIF-2α の関与が報告されていることから[4.3: 05F9Z5]、両 GLP 試験（28日間及び13週間）では通常では検査しない血液生化学パラメータとして血清重炭酸塩濃度を評価し、また28日間試験では頸動脈小体の病理組織学的検査も実施した。MK-6482に関連した軽度かつ可逆的な平均血清重炭酸塩濃度の上昇がすべての投与群でみられた。通常の血液生化学パラメータでは、主に200 mg/kg/日群の雌で軽度な血清トリグリセリド平均値の低下が両試験で認められた。これらの影響はごく軽度かつ可逆的なものであったため、有害ではないと考えられた。また、SD ラットを用いた28日間試験において MK-6482に関連した頸動脈小体への影響はみられなかった。

SD ラットを用いた28日間及び13週間試験における MK-6482に関連した毒性は雄生殖器（精巣及び精巣上体）にみられた（詳細は[2.6.6.3.4 項]及び[2.6.6.3.5 項]参照）。両方の試験での精巣及び精巣上体における変性性の変化は顕著であり、最長26週間の回復期間後も回復性がみられなかった。一方で、MK-6482の全身曝露は雌雄で同等であったにも関わらず、28日間及び13週間試験の雌ラットでは毒性及び病理組織学的所見はみられなかった。6 mg/kg/日以上の群でみられた精巣及び精巣上体の変性性の変化に基づき、SD ラットの13週間試験での雄の NOAEL は2 mg/kg/日（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24の約0.04倍）であった。SD ラットの13週間試験での雌の NOAEL は200 mg/kg/日（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24の約0.4倍）以上であった。

新しい媒体で MK-6482[redacted]処方を投与した際の SD 及び Wistar Han ラットの曝露を比較した試験（TT#[redacted]-1023、[2.6.7.17.A 項]）でより高い曝露量が得られたことから、この新しい処方及び媒体の MK-6482［[redacted]処方を0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH 7.2）を用いて調製］で Wistar Han ラットを用いた追加の探索的28日間毒性試験（TT#[redacted]-1032、[2.6.7.6 項]）及び13週間試験（GLP、TT#[redacted]-9011、[2.6.7.7.D 項]）を実施した。これらの試験結果に基づき、Wistar Han ラットを用いた後の2年間がん原性試験の用量を選択した。

[redacted]処方の MK-6482及び媒体［0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS

水溶液］を Wistar Han ラットに100及び300 mg/kg/日（探索的28日間試験）並びに30、100及び300 mg/kg/日（13週間試験）の用量で経口投与した際の MK-6482の毒性及び TK 評価を実施した。探索的28日間試験では、MK-6482に関連した計画外の死亡は認められなかった。本試験では初期の SD ラットを用いた GLP 試験で得られた曝露量と比較して約12倍高い全身曝露が得られたが、新たな毒性は確認されなかった。Wistar Han ラットでの MK-6482に関連した生前検査所見として、100及び300 mg/kg/日群の雄のみで平均体重増加量の減少（投与4週、同時対照群と比較して最大-14%）が認められた。さらに、臨床検査値（血液学及び血液生化学）の変化として、両群の雄及び／又は雌で、時に赤血球大小不同及び／又は小赤血球を伴う赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値及び網状赤血球数）の減少（最大-38%）及び血小板数の増加（最大+36%）、並びに100 mg/kg/日以上の群でのカリウム（最大+33%）、300 mg/kg/日群でのカルシウム（+9%）及びリン濃度（+30%）の増加が認められた。臨床検査パラメータの変化は一般状態又は病理検査所見と関連するものではなく、毒性学的意義は乏しいと考えられた。被験物質に関連した病理検査所見は、初期の SD ラットを用いた GLP 反復毒性試験でみられたように、両群のすべての雄で病理組織学的変化として認められた精巣の精細管変性に限られ、300 mg/kg/日群ではより程度が重かった。以上の結果から、Wistar Han ラットを用いた探索的28日間試験での NOAEL は雄で100 mg/kg/日未満、雌で300 mg/kg/日以上であった。

Wistar Han ラットを用いた13週間試験（GLP）では、[redacted]処方の MK-6482の忍容性はすべての用量において良好であり、ヒトに関連した新たな毒性所見は認められなかった。試験22日及び／又は92日において MK-6482に関連した用量依存性のある赤血球量及び網状赤血球数の減少（30 mg/kg/日以上の群）、血小板数の増加（100 mg/kg/日以上の群の雄及び30 mg/kg/日以上の群の雌）、並びにクロールの減少（100 mg/kg/日以上の群）が認められた。これらの変化は一般状態の変化及び病理組織学的所見は伴わなかった。投与期間終了時の MK-6482に関連した病理組織学的所見は、30 mg/kg/日以上の群の精巣（精細管変性）、精巣上体（精子減少）及びハーダー腺（単細胞壊死）に認められた。精巣及び精巣上体の変化は剖検所見（小型化）及び臓器重量の変化（減少）と関連していた。100 mg/kg/日以上の群では心臓重量の増加がみられ、300 mg/kg/日群では剖検又は病理組織学的所見を伴わない肝臓重量の増加がみられた。以上の結果から、Wistar Han ラットを用いた13週間試験（GLP）における NOAEL は雄で30 mg/kg/日未満、雌で300 mg/kg/日以上であった。

2.4.4.2.3　イヌ

性成熟したビーグル犬に28日間（TT #[redacted]-7821、[2.6.7.7.E 項]）又は13週間（TT #[redacted]-7808、[2.6.7.7.F 項]）経口投与した際の MK-6482の毒性及び TK、並びに回復期間（最長90日間）後の所見の回復性を評価するため、GLP 試験を実施した。両試験では心血管系（心電図及び血圧）に対する潜在的影響も評価した。

28日間及び13週間の反復投与毒性試験では MK-6482 ([redacted]処方）を1、5及び30 mg/kg/日（QD）

の用量で経口投与した。

イヌを用いたいずれの GLP 試験においても MK-6482の忍容性は良好であり、MK-6482に関連した変化として可逆的な赤血球パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット値）の減少が認められた。赤血球パラメータ（赤血球数及び網状赤血球数）は最大50%減少し、減少は顕著であったが、影響のみられた動物で赤血球パラメータの減少に関連した一般状態所見及び骨髄に持続的な病理組織学的変化は認められなかった。しかしながら、有害な一般状態所見がみられなかったことは、毒性試験の限られた環境で身体活動が制限されることに起因すると考えられた。以上の結果より、試験でみられた赤血球系の変化は有害ではないと結論づけられた。ラット毒性試験（GLP）と同様に、28日間及び13週間の両方の試験で血清重炭酸塩濃度を測定し、頸動脈小体の病理組織学的検査を28日間試験で実施した。13週間試験のすべての用量で可逆的な血清重炭酸塩の軽度の増加がみられたが、有害ではないと考えられた。28日間及び13週間の両方の試験で病理組織学的所見は認められなかった。赤血球量への影響が可逆的であり、明らかな毒性学的意義のある所見は認められなかったことから、両試験の NOAEL は30 mg/kg/日（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24と同程度）以上であった。

2.4.4.3　遺伝毒性試験

2.4.4.3.1　In vitro

MK-6482は非GLP又はGLPに準拠して実施したin vitroの微生物を用いた変異原性試験（TT #[redacted]-7842及び TT #[redacted]-7825、[2.6.7.8.B 項]）及び in vitro 小核試験（TT #[redacted]-7843、[2.6.7.8.A 項]及び TT #[redacted]-7826、[2.6.7.8.C 項]）において陰性であった。また、代謝活性化系の存在下及び非存在下に関わらず陰性であった。GLP 試験は ICH S2（R1）ガイダンスに従い実施した。これらの試験で用いた最高濃度は、限界濃度又は最大溶解濃度であった。

2.4.4.3.2　In vivo

ICH S2（R1）ガイダンスに従い実施したラットを用いた in vivo 小核試験（TT #[redacted]-9018、[2.6.7.9.A 項]）において、MK-6482は陰性であった。最高用量は選択した媒体での投与可能な最大用量であった。

2.4.4.4　がん原性試験

MK-6482は VHL 関連腫瘍患者に対してがんの再発リスクを低減することを目的として長期間投与される可能性があるため、医薬品[redacted]（#[redacted]）において非臨床試験パッケージに関する相談を実施し、MK-6482のげっ歯類を用いたがん原性試験成績を本邦におけるMK-6482の承認取得後に提出することで機構と合意した。現在、rasH2 Tg マウスを用いた6ヵ月間がん原性試験及びラットを用いた2年間がん原性試験をそれぞれ実施中である。

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

一般毒性試験及びラットを用いた胚・胎児発生毒性予備試験の結果に基づき、MK-6482の統合的な生殖発生毒性評価を行った。ラット（最大300 mg/kg/日まで投与）及びイヌ（最大30 mg/kg/日まで投与）を用いた毒性試験では、いずれの試験（28日間及び13週間）においても生殖器の病理組織学的検査に基づく雌生殖器に対する影響は認められなかった。同様に、いずれの試験においても雄イヌの生殖器に対する影響（精子検査及び病理組織学的検査を含む）は認められなかった。一方で、雄ラットでは低精子形成、精上皮変性及び多核巨細胞（精巣）、並びに精子減少（精巣上体）を含む精巣及び精巣上体への影響がみられ、6 mg/kg/日以上の群（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24の約0.1倍）でみられた精子運動性及び精子数の低下並びに異常精子数の増加と関連していた。

2.4.4.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は実施しなかった。28日及び13週間のラット及びイヌを用いた毒性試験の生殖器の病理組織学的検査において、雌生殖器に影響は認められなかった。しかしながら、ラットを用いた反復投与毒性試験では精巣毒性とそれに伴う精子検査での変化が認められたことから、MK-6482は雄ラットの受胎能に影響を与える可能性が示唆された。

2.4.4.5.2　胚・胎児発生に関する試験

SD ラットを用いた胚・胎児発生毒性予備試験（TT#[redacted]-7004、[2.6.7.13.A 項]）では妊娠6～17日の妊娠ラットに3、30及び100 mg/kg BID（6、60及び200 mg/kg/日）の用量で MK-6482（[redacted]処方）を投与した。発生毒性はすべての用量でみられ、60 mg/kg/日以上の群で胚・胎児致死の増加（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24の約0.4倍）、6及び60 mg/kg/日群で胎児体重の減少、骨化減少、及び奇形が認められた（200 mg/kg/日群では100%の胚・胎児致死により検査可能な胎児は得られなかった）。さらに、ラットに反復投与した一般毒性試験の結果から想定されたとおり、60及び200 mg/kg/日群で赤血球量の減少（同時対照群の平均値と比較してヘモグロビン及びヘマトクリット値で最大約-23%）がみられた。発生毒性に関する NOAEL は特定できなかった。非妊娠ウサギ忍容性試験（TT#[redacted]-7003、[2.6.7.11 項]）では、MK-6482の忍容性は良好であった。ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験で特定されたリスクに基づき、ウサギを用いたさらなる試験は実施しなかった。

2.4.4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

MK-6482を投与したラットにおいて胚・胎児致死がみられたことから、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施しなかった。

2.4.4.5.4　　新生児（幼若動物）を用いた試験

MK-6482の小児への投与は予定されていないため、新生児（幼若動物）を用いた非臨床試験は実施しなかった。

2.4.4.6　　局所刺激性試験

MK-6482は経口投与製剤であるため、独立した局所刺激性試験は行わなかったが、口腔及び消化管における局所刺激性をラット及びイヌを用いた28日間反復投与毒性試験（GLP）の中で評価した。局所刺激性を示唆する肉眼所見及び病理組織学的所見はみられなかった。

これに加えて、労働安全衛生プログラムをサポートするための局所刺激性試験を実施した。ウシ摘出角膜の混濁度及び透過性試験（TT#[redacted]-7811、[2.6.7.16 項])、並びに MatTek EpiDerm™ MTT 皮膚刺激性試験（TT#[redacted]-7812、[2.6.7.16 項])］では、それぞれ MK-6482の眼及び皮膚に対する刺激性を評価した。MK-6482は非刺激性物質に分類された。

2.4.4.7　　その他の毒性試験

2.4.4.7.1　　抗原性／免疫原性試験

通常の反復投与毒性試験において、MK-6482による抗原性に起因すると考えられる所見又は変化は認められなかった。したがって、抗原性／免疫原性試験は実施しなかった。

2.4.4.7.2　　免疫毒性試験

通常の反復投与毒性試験において、MK-6482による免疫毒性を示唆する所見は認められなかった[2.6.6.3 項]。したがって、ICH S8（医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン）に従い、追加の免疫毒性試験は実施しなかった。各動物種における反復投与毒性試験の結果から、自己免疫若しくは有害な炎症反応、又はリンパ組織における有害な反応はみられなかった。これらの試験の臓器重量、剖検及び病理組織学的検査を統合した証拠の重み付け評価から、MK-6482が免疫毒性を引き起こす可能性は低いと考えられた。

さらに、マウス局所リンパ節試験を労働安全衛生プログラムのサポートとして実施した（[2.6.6.8.2.1 項]参照）。本試験では、MK-6482は皮膚感作性物質ではないと考えられた。

2.4.4.7.3　　作用機序

作用機序は主要な薬理試験の一部として評価した[2.6.2 項]。作用機序を検討するための追加試験は実施していない。

2.4.4.7.4　依存性

MK-6482は血液脳関門を通過する薬剤であるが[2.6.4.4 項]、MK-6482及びヒト主要代謝物であるPT3317に薬物乱用傾向を示唆する薬理学的プロファイルはみられていない。さらに、中枢神経系の安全性薬理試験及び通常の反復投与毒性試験では向精神作用（鎮静又は覚醒作用）は認められなかった。したがって、動物を用いた依存性試験は実施しなかった。

2.4.4.7.5　代謝物

In vitro 試験で肝臓試料中に認められたすべてのヒト代謝物は、非臨床安全性試験に用いた動物種にも認められた[2.6.4.5 項]。MK-6482のO-グルクロン酸抱合体であるPT3317は臨床試験で定量され、血漿中における総放射能に対する割合は約9%であった。したがって、PT3317はヒトでの主要代謝物と考えられる[2.7.2.3.2.2.3 項]。O-グルクロン酸抱合体のような第II相代謝物は一般に毒性学的な懸念はないと考えられているが[4.3: 05M8TF]、反復投与毒性試験の一部として代謝物PT3317の毒性を評価するとともに、PT3317の血漿中濃度測定も実施した[2.6.6.3 項]。PT3317の最大曝露量はラット及びイヌでそれぞれ3及び35%（MK-6482比）であった。イヌを用いた3ヵ月間反復投与毒性試験においてPT3317の最も高い曝露（AUC0-24：11.7 µg•hr/mL）がみられ、ヒトにおけるPT3317曝露（AUC0-24：6.5 µg•hr/mL）を超えていた[2.7.2.1.1.1 項]。したがって、PT3317の安全性はイヌで十分に評価されている。ラットを用いた胚・胎児発生毒性予備試験[2.6.6.6.2.1 項]では、MK-6482に起因した胚・胎児致死及び催奇形性がみられたため、PT3317の毒性を評価する必要はなかった。

2.4.4.7.6　不純物

ICH Q3A（R2）及びICH Q3B（R2）ガイドラインに従い、安全性確認の必要な閾値を超えるMK-6482のすべての特定された不純物及び分解生成物について、イヌ13週間毒性試験で用いられたロットにより評価を行った。また、潜在的な不純物の安全性を予備的に確認するため、SDラットを用いた13週間反復投与不純物評価試験を実施した[2.6.7.17.C 項]。安全性確認の必要な閾値を超えるMK-6482に関連した各不純物及び分解生成物を[表 2.4-1]に示す。安全域はMK-6482のヒト1日投与量120 mgに含まれる不純物量に対する各不純物又は分解生成物の用量比で示した。

さらに、出発物質、中間体及び原薬／製剤の各段階で特定された不純物を含む潜在的及び実際の不純物について、ICH M7ガイドラインに基づいて変異原性の評価を行い、その結果を[3.2.S.3.2 項]（原薬）及び[3.2.P.5.5 項]（製剤）に示す。また、ICH M7ガイドラインの注釈1に従い、ヒトにおける不純物の量がいずれも1 mg/日未満であったことから、さらなる変異原性及び遺伝毒性の評価は実施しなかった。

表 2.4-1 MK-6482 の不純物及びその用量比

Impurity	Toxicology Study Content (%) [a]	NOAEL [a] (mg/kg/day)	Qualified Level (%) [b, c]	Specification Limits (%)	Margin [d]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	30	[redacted]	[redacted]	[redacted]

ICH = International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use;
NOAEL = No-observed-adverse-effect level
a　TT #[redacted]-7808: A 13-Week Oral Gavage Toxicity Study Followed by a 28-Day Recovery Period in Beagle Dogs [Sec. 2.6.7.7.F], nonclinical Batch/Lot #[redacted]/[redacted].
b　Based on a clinical dose of 120 mg/day.
c　Qualified level = [% impurity in toxicology study x non-clinical NOAEL dose (mg/kg/day)] / [body surface area conversion factor (i.e.2 for dogs) x 2.4 mg/kg/day clinical dose (e.g., 120 mg/day / 50 kg clinical body weight)]. Based on ICH impurity-related guidelines (e.g., Q3C and Q3D).
d　Margin = Qualified Level/ Specification Limits.

2.4.4.7.7　その他の毒性試験

2.4.4.7.7.1　光毒性試験

MK-6482の UV 及び可視光の吸光を評価したところ、290 nm でのモル吸光係数は2,375 L mol^{-1} cm^{-1}であり、他の波長でのモル吸光係数は低値を示した（閾値1,000未満）。この結果に基づき MK-6482を in vivo 光毒性試験で評価した。雌の Long-Evans ラットに MK-6482を0及び100 mg/kg BID（0及び200 mg/kg/日）の用量で3日間連続（12時間間隔）で経口投与した後、紫外線照射した際の光毒性を評価した（TT #[redacted]-9011、[2.6.7.17.B 項]）。200 mg/kg/日群（100 mg/kg BID）において光毒性を示唆する皮膚反応は認められなかった。

2.4.4.7.7.2　予備 TK 試験

初期のラット反復投与毒性試験で用いられた媒体（[redacted]処方を0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液を用いて調製）と比較して、異なる処方及び媒体が全身曝露量の増加に寄与するかどうかを検証するため、SD 及び Wistar Han ラットを用い、MK-6482の[redacted]又は[redacted]処方を100及び300 mg/kg/日の用量で投与する単回経口投与 TK 試験を実施した（TT#[redacted]-1023、[2.6.7.17.A 項]）。MK-6482の[redacted]又は[redacted]処方を3種類の媒体［媒体1：0.5%MC/0.5%Tween 80水溶液、媒体2：10% Tween 80水溶液、媒体3：0.5%（w/v）MC/0.1%（w/v）HPMCAS-HF/20 mM TRIS 水溶液（pH 7.2）］を用いて調製した。動物の評価は生死の確認のみを実施した。また、単回投与後の

血漿中被験物質濃度を測定した。動物はすべて試験終了時まで生存した。本試験の結果から、媒体3を用いて調製した[redacted]処方の MK-6482がラットにおいて最も高い全身曝露を示したことから、以降の試験［ラットを用いた探索的28日間経口投与毒性試験（TT #[redacted]-1032、[2.6.7.6 項]）及び13週間経口投与毒性試験（GLP、TT #[redacted]-9011、[2.6.7.7.D 項]）、並びにマウスを用いた探索的単回投与 TK 試験（TT#[redacted]-1033、[2.6.7.17.A 項]）及び28日間経口投与毒性試験（TT#[redacted]-9012、[2.6.7.7.A 項]）］ではこの処方を使用した。また、実施中の Wistar Han ラット及び rasH2 Tg マウスを用いたがん原性試験においても同じ処方を用いている。

Crl:CD1（ICR）マウスを用い600 mg/kg/日の用量まで経口投与した探索的単回投与 TK 試験（TT#[redacted]-1033、[2.6.7.17.A 項])においても、[redacted]処方の MK-6482は良好な忍容性を示した。動物の評価は生死の確認のみを実施し、動物はすべて試験終了時まで生存した。

2.4.5　総括及び結論

MK-6482は in vitro 及び in vivo で選択的な阻害作用を示し、細胞内で ARNT とのヘテロ二量体化を阻害することにより、HIF-2α の機能を抑制する。

HIF-2α の活性化がみられる腫瘍細胞では、MK-6482は *CCND1*、*VEGFA*、*SLC2A1*等の発癌に関与する各種遺伝子の転写を阻害する。MK-6482は *VHL* 欠損 ccRCC 腫瘍異種移植マウスモデルで、0.3～3 mg/kg を1日2回、28日間の経口投与により抗腫瘍効果を示し、腫瘍の増殖抑制又は退縮が認められた。MK-6482の投与により、腫瘍での HIF-1α ではなく HIF-2α の標的遺伝子の発現が用量依存的に減少した。また、MK-6482の投与により細胞増殖及び血管新生のマーカーの発現が減少し、アポトーシスのマーカーの発現が増加した。MK-6482は選択性が高く、各種受容体、イオンチャネル及びリン酸化酵素に対して10 µM（3.8 µg/mL）又は12.5 µM（4.8 µg/mL）の濃度で作用を示さなかった。

重要な器官系に対する潜在的な影響を評価するため、安全性薬理試験を独立した試験又は28日間及び13週間反復投与毒性試験（GLP）の一部として実施した。心血管系への影響は、in vitro hERG 試験（GLP）及びイヌを用いた反復投与毒性試験（28日間及び13週間、GLP）における心電図及び血圧測定により評価した。ラットを用いた28日間反復投与毒性試験（GLP）では、中枢神経系への影響を評価するための FOB 及び呼吸機能への影響を評価するためのプレチスモグラフィ測定を実施した。In vivo における評価では、評価した最高用量まで MK-6482に関連した影響はみられず、曝露量は臨床推奨用量（120 mg QD）を投与した際のヒト AUC0-24と同程度であった。In vitro hERG 試験から推定される IC_{50}は50 µM 超であり、がん患者に臨床推奨用量（120 mg QD）を投与した際の定常状態における非結合型 Cmax（3.63 µM、母集団薬物動態解析）から算出される in vitro 安全域は13.8倍超であった。

In vitro 及び in vivo により、MK-6482の ADME を評価した。MK-6482は主に代謝により消失し、ヒトで検出された代謝物はラット及びイヌでも認められた。非活性代謝物である PT3317はヒト血

漿中の主要な代謝物であると考えられる。PT3317は、*O*-グルクロン酸抱合体であるため、毒性学的な懸念はないと考えられる。また、イヌにおける NOAEL での PT3317の曝露量は、臨床用量におけるヒトでの曝露量を上回っており、その特性は十分に明らかにされている。これらのデータから、MK-6482の非臨床安全性評価に、げっ歯類及び非げっ歯類として、それぞれラット及びイヌを用いることが支持された。

非臨床試験の結果から、MK-6482のマウス、ラット及びイヌを用いた28日間及び／又は13週間試験（GLP）における良好な忍容性が確認された。MK-6482に関連した赤血球量への影響はマウス、ラット及びイヌを用いた毒性試験で一貫して認められた。影響の程度は、反復投与により赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット値が約30%～50%減少する程度で安定した。赤血球系への影響は有害ではなく、用量依存的かつ可逆的であり、MK-6482の薬理作用である腎臓でのエリスロポエチン発現に関わる HIF-2α 阻害に関連したものと考えられた[4.3: 05BTDF]。

ラットでは、MK-6482に関連した有害な毒性が雄生殖器に認められた。肉眼所見として精巣の小型化／軟化、重量低下がみられ、病理組織学的検査では精子減少、精原細胞変性、多核巨細胞（精巣）及び低精子形成（精巣上体）を伴っており、26週間の回復期間後も回復はみられなかった。これらの所見は精子運動性及び精子数の減少、並びに異常精子数の増加と関連していた。一部の動物では、精子の所見は28日間の回復期間終了時の剖検において部分的な回復がみられた。病理組織学的検査における雄生殖器の変性性所見に基づき、SD ラットの28日間及び13週間試験における雄の NOAEL はそれぞれ6 mg/kg/日及び2 mg/kg/日であった。雌の NOAEL は28日間及び13週間試験の両方で高用量の200 mg/kg/日であった。

ビーグル犬では、MK-6482に関連した有害な毒性は確認されず、28日間及び13週間試験のいずれにおいても、精子検査及び精巣／精巣上体の病理組織学的検査への影響は認められなかった。イヌでの NOAEL は30 mg/kg/日以上であった。

In vitro の微生物を用いた変異原性試験並びに in vitro 及び in vivo 小核試験において、MK-6482は遺伝毒性を示さなかった。MK-6482は光毒性を示さず、労働安全衛生プログラムに準じて実施した評価において、非刺激性物質及び非皮膚感作性物質に分類された。

SD ラットを用いた胚・胎児発生毒性予備試験では、妊娠6～17日の妊娠ラットに6、60及び200 mg/kg/日の用量で MK-6482（[redacted]処方）を投与した。発生毒性はすべての用量でみられ、60 mg/kg/日以上の群で胚・胎児致死の増加（120 mg QD を投与した際のヒト AUC0-24の約0.4倍）、6及び60 mg/kg/日群で胎児体重の減少、骨化減少、及び奇形が認められた（200 mg/kg/日群では100%の胚・胎児致死により検査可能な胎児は得られなかった）。さらに、ラットに反復投与した一般毒性試験の結果から想定されたとおり、60及び200 mg/kg/日群で赤血球量の減少（同時対照群の平均値と比較してヘモグロビン及びヘマトクリット値で最大約-23%）がみられた。ラットにおける発生毒性に関する NOAEL は特定できなかった。HIF-2α 遺伝子ノックアウトマウスの胚では心血管系障害及び胚致死が報告されていることから[4.3: 05FRRV][4.3: 05FRS2]、ラットの試験で認められた胚・胎児毒性は MK-6482の作用機序に関連している可能性が示唆された。非妊娠ウサギ忍容

性試験では、MK-6482の忍容性は良好であった。ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験で特定されたリスクに基づき、ウサギを用いたさらなる試験は実施しなかった。

新しい処方の MK-6482を用いたラットの試験では、初期のラットの試験で得られた曝露量と比較して約12倍高い全身曝露量が得られたが、新たな毒性は確認されなかった。ラットにおけるMK-6482の毒性プロファイルに変化はみられず、雌雄の赤血球量に対する影響及び雄生殖器に対する影響が認められた。

動物とヒトの曝露量比較を[表 2.4-2]に示す。

表 2.4-2　　MK-6482 の曝露量比

Species	Study Duration	Dose Levels (mg/kg/day)	$AUC_{0\text{-}24\ hr}$ (μg*hr/mL) [a]	Exposure Multiple [b]
Repeat-Dose Toxicity				
Mouse	28-Day [c] (TT #[redacted]-9012)	30	102	2.6
		60 (male NOAEL)	186	4.7
		150	250	6.3
		600 (female NOAEL)	573	14.4
Rat	28 Day [d] (TT #[redacted]-7820)	6 (male NOAEL)	3.82	0.1
		20	8.92	0.2
		200 (female NOAEL)	35.4	0.9
	13 Week [d] (TT #[redacted]-7809)	2 (male NOAEL)	1.64	0.04
		6	3.16	0.1
		20	8.08	0.2
		200 (female NOAEL)	17.8	0.4
	13-Week [c] (TT #[redacted]-9011)	30 (male NOAEL)	66.3	1.7
		100	215	5.4
		300 (female NOAEL)	466	11.7
Dog	28 Day [d] (TT #[redacted]-7821)	1	7.37	0.2
		5	19.8	0.5
		30 (NOAEL)	38.1	1
	13 Week [d] (TT #[redacted]-7808)	1	6.94	0.2
		5	18.3	0.5
		30 (NOAEL)	29.6	0.7
Reproductive and Developmental Toxicity				
Rat	Embryo-fetal development [d] (TT #[redacted]-7004)	6	2.60	0.1
		60	14.9	0.4
		200	28.2	0.7

AUC0-24hr = area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours; NOAEL = No-observed-adverse-effect level; QD = Once daily

a　AUC0-24hr = 2*AUC0-tau for rat (twice daily dosing) in TT #[redacted]-7820, TT #[redacted]-7809, TT #[redacted]-7004; AUC0-24hr = AUC0-tau for other studies of mouse, dog and rat (once daily dosing)

b　Exposure multiples are based on geometric mean exposures as determined by PopPK analysis, AUC0-24 hr of 39.9 μg*hr/mL (clinical exposure at 120 mg QD in Japanese advanced renal cell carcinoma patients), details of which can be found in the summary of clinical pharmacology studies [Sec. 2.7.2.4]

c　[redacted] form was used for each dose level in 0.5% (w/v) methylcellulose/0.1% HPMCAS-HF with 20 mM tromethamine in deionized water, pH 7.2 ± 0.1.

d　[redacted] form was used for each dose level in a vehicle: 0.5% (w/v) Tween 80/0.5% (w/v) methylcellulose in deionized water

これらの非臨床薬理、薬物動態及び毒性試験により、HIF-2α シグナルの制御異常を有する腫瘍患者の治療として MK-6482（120 mg QD）の安全な使用を担保する成績が得られている。

2.4.6　参考文献

参考文献を[1.12 項]の「4.3参考文献」に示した。