目次

略号及び用語の定義
2.6.1　緒言
2.6.1.1　参考文献

略号及び用語の定義

略号	定義	
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	アリール炭化水素受容体核内輸送体
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma	淡明細胞型腎細胞癌
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
MK-6482	HIF-2α の転写因子としての機能を抑制する低分子化合物（別名 PT2977）	
RCC	Renal cell carcinoma	腎細胞癌
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

2.6.1　緒言

腫瘍内での低酸素状態は癌の進行の要因であり、患者の予後不良、並びに化学療法及び放射線療法に対する抵抗性に密接に関連している。低酸素誘導因子（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り、治療介入の有望な標的である。種々の癌で、HIF-2α の発現と予後不良との間に相関性があることが報告されている[4.3: 05BMZ4]。HIF-2α は腫瘍形成及び腫瘍の進行、並びに *VHL* 発現のエピジェネティックな不活性化に関連すると考えられており、多発性骨髄腫、網膜芽細胞腫、非小細胞肺癌、膵内分泌腫瘍、扁平上皮癌、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、食道扁平上皮癌等の多くの癌で HIF-2α の発現が認められている[4.3: 05BVLF]。淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）と *VHL* 癌抑制遺伝子の変異及びそれに伴う HIF-2α の転写活性化の間には、強い関連が確認されている[4.3: 05BV4N]。90%以上の ccRCC では、欠失、変異、翻訳後修飾による *VHL* 機能の欠損又は抑制が認められている[4.3: 05BTLJ]。この場合、正常酸素条件下でも HIF-2α が蓄積し、ccRCC の進行に関連する種々の遺伝子産物である血管内皮細胞増殖因子 A（VEGFa）、サイクリン D1、並びに腫瘍の成長及び増殖に関与する他の因子の発現が誘導される。

MK-6482（別名：PT2977、一般名：ベルズチファン）は in vitro 及び in vivo で HIF-2α を選択的に阻害し、細胞内での HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体の形成を阻害することによりシグナル伝達を抑制する。非臨床薬理試験で MK-6482の HIF-2α に対する特異性及び選択性を確認した。さらに、MK-6482は ccRCC の異種移植マウスモデルで抗腫瘍作用を示し、0.3 mg/kg/回、1日2回の経口投与により、増殖した腫瘍をほぼ完全に退縮させた。現在、RCC、VHL 病に伴う RCC 及び進行性固形癌患者を対象として、MK-6482の臨床試験を実施している。

MK-6482の開発を裏付ける非臨床薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験の成績を、後述の2.6項で要約した。これらの非臨床試験により、癌治療での MK-6482の臨床使用の安全性を担保する成績が得られている。

2.6.1.1　参考文献

参考文献を[1.12 項]の「4.3参考文献」に示した。

目次

表一覧
図一覧
略号及び用語の定義
2.6.2　薬理試験の概要文
2.6.2.1　まとめ
2.6.2.2　効力を裏付ける試験
2.6.2.2.1　In vitro での効力を裏付ける試験
2.6.2.2.1.1　MK-6482の作用機序
2.6.2.2.1.2　HIF-2α の PAS-B ドメインに対する MK-6482の親和性
2.6.2.2.1.3　低酸素応答配列依存性遺伝子発現に対する MK-6482の阻害
2.6.2.2.1.4　786-O 細胞での VEGFa の産生に対する MK-6482の阻害
2.6.2.2.1.5　786-O 細胞での HIF-2α 依存性遺伝子発現及び HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に対する MK-6482の阻害
2.6.2.2.1.6　MK-6482による HIF-2α の選択的阻害
2.6.2.2.2　In vivo での効力を裏付ける試験
2.6.2.2.2.1　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果
2.6.2.2.2.2　患者由来 ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果
2.6.2.2.2.3　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482の血中濃度及び薬力学的効果
2.6.2.2.2.4　ccRCC 由来 A498細胞異種移植モデルでの MK-6482の血中濃度及び薬力学的効果
2.6.2.2.2.5　他の抗腫瘍薬との併用
2.6.2.2.2.6　他の腫瘍移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果
2.6.2.3　副次的薬理試験
2.6.2.3.1　In vitro での副次的薬理試験
2.6.2.3.1.1　受容体及びイオンチャネル
2.6.2.3.1.2　リン酸化酵素及び脱リン酸化酵素
2.6.2.3.2　In vivo での副次的薬理試験
2.6.2.4　安全性薬理試験
2.6.2.4.1　個別試験の概要
2.6.2.4.1.1　ヒト胎児腎細胞（HEK293）に発現させた hERG カリウムチャネルに対する MK-6482の影響
2.6.2.4.1.2　ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン hERG カリウムチャネルに対する PT2977（MK-6482）の影響
2.6.2.4.1.3　イヌに MK-6482を投与した際の心電図及び血圧評価：ビーグル犬を用いた28日間及び13週間反復経口投与毒性試験［28日間及び90日間（28日間試験のみ）の回復期間を含む］

2.6.2.4.1.4　ラットに MK-6482を投与した際の呼吸機能評価：SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）
2.6.2.4.1.5　ラットに MK-6482を投与した際の FOB：SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験
2.6.2.6　考察及び結論
2.6.2.7　図表
2.6.2.8　参考文献

表一覧

表 2.6.2-1　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482又は媒体を投与した後の腫瘍体積
表 2.6.2-2　MK-6482の最終投与12時間後の血漿中ヒト VEGFa 及び薬物濃度
表 2.6.2-3　MK-6482の最終投与12、24及び36時間後の血漿中薬物濃度
表 2.6.2-4　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの投与開始34日後の媒体群に対する薬物投与群の TGI、並びに試験終了時の PR 及び CR
表 2.6.2-5　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの投与開始34日後の媒体群に対する薬物投与群の TGI、並びに試験終了時の PR 及び CR
表 2.6.2-6　非 RCC 腫瘍異種移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果
表 2.6.2-7　受容体及びイオンチャネルの測定対象
表 2.6.2-8　リン酸化酵素及び脱リン酸化酵素の測定対象
表 2.6.2-9　MK-6482の安全性薬理試験（ICH S7A 及び S7B に準拠）

図一覧

図 2.6.2-1　HIF-2α による遺伝子発現制御機構
図 2.6.2-2　MK-6482による放射標識プローブの置換
図 2.6.2-3　HIF-2α 誘導 HRE 依存性ルシフェラーゼ活性に対する MK-6482の阻害作用
図 2.6.2-4　786-O 細胞からの VEGFa の産生に対する MK-6482の阻害作用
図 2.6.2-5　MK-6482により16時間処理した786-O 細胞での *CCND1*及び *SLC2A1*の発現量
図 2.6.2-6　786-O 細胞での HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に対する MK-6482の阻害
図 2.6.2-7　正常酸素及び低酸素条件下での Hep3B 細胞の *EPO* の発現量に及ぼす MK-6482の影響
図 2.6.2-8　正常酸素及び低酸素条件下での Hep3B 細胞の *PGK1*の発現量に及ぼす MK-6482の影響
図 2.6.2-9　低酸素条件下の Hep3B 細胞での HIF-1α 又は HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に及ぼす MK-6482の影響
図 2.6.2-10　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482又は媒体を投与した際の腫瘍増殖曲線
図 2.6.2-11　患者由来 ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482又は媒体を投与した際の腫瘍増殖曲線
図 2.6.2-12　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482の最終投与12時間後の腫瘍組織でのヒト mRNA の発現量
図 2.6.2-13　ccRCC 由来 A498細胞異種移植モデルでの MK-6482の最終投与12、24及び36時間後の腫瘍重量
図 2.6.2-14　ccRCC 由来 A498細胞異種移植モデルでの MK-6482の最終投与12、24及び36時間後の腫瘍組織でのヒト mRNA の発現量
図 2.6.2-15　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482の単独及びレンバチニブとの併用投与による抗腫瘍効果
図 2.6.2-16　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482の単独及びカボザンチニブとの併用投与による抗腫瘍効果

略号及び用語の定義

略号	定義	
ANOVA	Analysis of variance	分散分析
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	アリール炭化水素受容体核内輸送体
aVF	Augmented vector foot (at the umbilicus)	左足増高単極肢誘導
aVL	Augmented vector left	左手増高単極肢誘導
aVR	Augmented vector right	右手増高単極肢誘導
BID	Twice daily	1 日 2 回
CCND1	Cyclin D1 gene	サイクリン D1 遺伝子
ccRCC	Clear cell renal cell carcinoma	淡明細胞型腎細胞癌
Cmax	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
DFA	Dose formulation analysis	投与液分析
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
EPO	Erythropoietin gene	エリスロポエチン遺伝子
FOB	Functional observation 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
HRE	Hypoxia-response element	低酸素応答配列
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
µg/mL	Microgram per milliliter	－
µM	Micromolar	－
mg/kg	Milligram per kilogram	－
MK-6482	HIF-2α の転写因子としての機能を抑制する低分子化合物（別名 PT2977）	
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーRNA
n	Number	番号
ng/mL	Nanogram per milliliter	－
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
PAS	Per-ARNT-Sim	－
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1 gene	ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 1 遺伝子
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1 gene	ホスホグリセリン酸キナーゼ 1 遺伝子
PHD	Prolyl-hydroxylases	プロリン水酸化酵素
PT2385	MK-6482 のプロトタイプであり構造及び作用類似薬	
PT2977	MK-6482 の別名	

略号	定義	
PT3317	MK-6482 のグルクロン酸抱合体代謝物	
QD	Once daily	1 日 1 回
QTc	Corrected QT interval	補正 QT
RCC	Renal cell carcinoma	腎細胞癌
RNA	Ribonucleic acid	リボ核酸
RT-qPCR	Reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SCID	Severe combined immunodeficiency	重症複合免疫不全
SD	Standard deviation	標準偏差
SEM	Standard error of the mean	平均値の標準誤差
SERPINE1	Plasminogen activator inhibitor type 1 gene; also known as PAI-1 gene	プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1 遺伝子（別名 PAI-1 遺伝子）
SLC2A1	Glucose transporter solute carrier family 2 member 1 gene	グルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1 遺伝子
SPA	Scintillation proximity assay	シンチレーション近接法
TGI	Tumor growth inhibition	腫瘍増殖抑制
USA	United States of America	米国
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

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

MK-6482（別名：PT2977、一般名：ベルズチファン）は、Peloton Therapeutics, Inc.が創製した低分子化合物で、低酸素誘導因子2α（HIF-2α）の転写因子としての機能を抑制することにより、癌細胞での低酸素性シグナル伝達を阻害する。非遺伝性淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）、並びに von Hippel-Lindau（VHL）病に伴う限局性 RCC 及び非 RCC 腫瘍の HIF-2α シグナルの制御異常を有する腫瘍患者の治療を目的として MK-6482を開発中である。

低酸素誘導因子（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。癌抑制因子である 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 が病態の主要な要因であると考えられる。この転写因子の阻害は VHL 病患者及び RCC 患者に対する新たな治療の選択肢となり得る。

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はサイクリン D1（*CCND1*）、血管内皮細胞増殖因子 A（*VEGFA*）、グルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1（*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/回を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、腫瘍組織での HIF-2α の標的遺伝子の発現が減少したが、HIF-1α の標的遺伝子の発現には影響はみられなかった。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（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。

MK-6482の心血管系への影響を評価するため in vitro 及び in vivo 試験を実施した。MK-6482の hERG カリウムチャネルに対する活性を GLP に準拠した電気生理学的試験で評価した。MK-6482の hERG チャネルに対する阻害活性はみられず、IC_{50}は50 µM 超であった。この濃度はがん患者の治療に用いられる臨床推奨用量（120 mg QD）の非結合型 Cmax の13.8倍超であった。イヌを用いた毒性試験（28日間及び13週間、GLP）において in vivo 心血管系評価を実施し、心電図及び血圧に MK-6482の影響は認められなかった。また、その他の安全性薬理評価として、ラットを用いた28日間毒性試験（GLP）において FOB 及び呼吸機能評価を実施し、FOB パラメータ及び呼吸機能に MK-6482の影響はみられなかった。

MK-6482は HIF-2α に対する選択的な阻害薬であることが確認された。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治療効果が認められた。In vitro 及び in vivo 安全性薬理試験結果から、MK-6482の心血管系、呼吸及び中枢神経系への影響はみられなかった。MK-6482の非臨床薬理試験を[2.6.3.1　項]に示す。

以上のとおり、非遺伝性 ccRCC、並びに VHL 病に伴う散発性 RCC 及び RCC 以外の腫瘍の HIF-2α シグナルの制御異常を有する腫瘍患者での MK-6482の臨床使用を支持する、非臨床薬理試験成績が得られた。

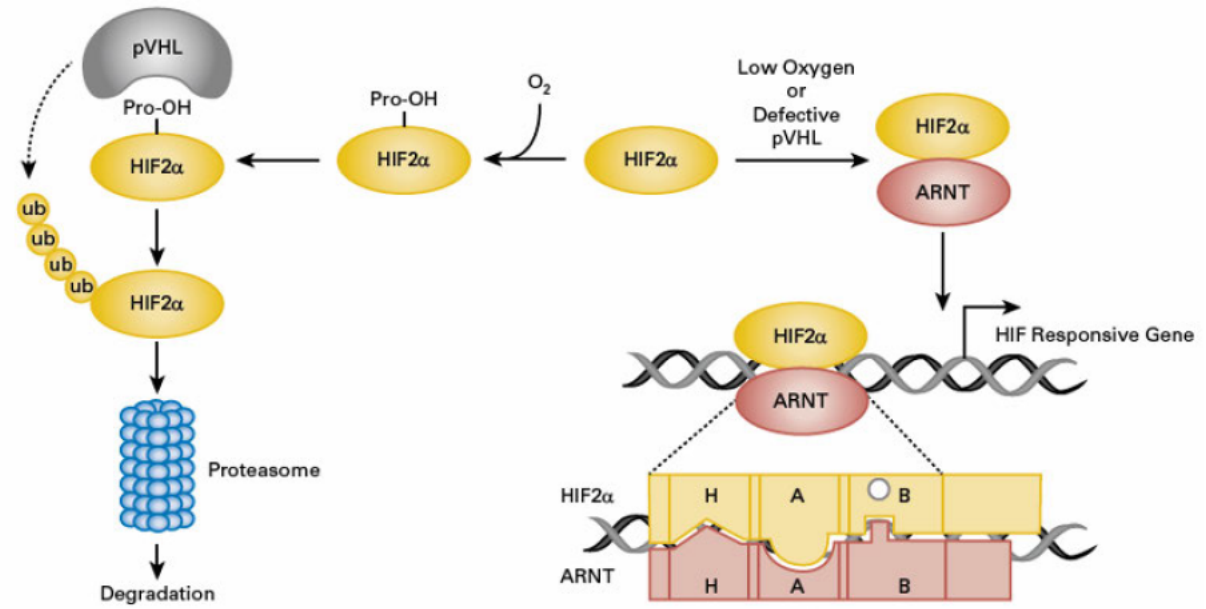
2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　In vitro での効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1.1　MK-6482の作用機序

低酸素誘導因子（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 はヒトでは endothelial PAS protein 1（*EPAS1*）遺伝子にコードされる蛋白質である。HIF-2α 蛋白質の半減期は組織の酸素濃度により厳密に制御されている。HIF-2α による遺伝子発現制御機構を[図 2.6.2-1]に示す。通常酸素下では、HIF-2α 上の特定のプロリン残基がジオキシゲナーゼ HIF 特異的プロリン水酸化酵素（PHD）により水酸化される。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 のプロテアソーム分解を誘導する。PHD は活性化に酸素を必要とするため、低酸素下では HIF-α が蓄積し、核内に取り込まれ遺伝子発現を誘導する。これらの転写因子は、活性化により嫌気的代謝、血管新生、細胞増殖及び生存、細胞外マトリックスのリモデリング、pH 恒常性、アミノ酸及びヌクレオチドの代謝、並びにゲノムの安定性を制御する遺伝子の発現を誘導する[4.3: 05BMZ4]。

図 2.6.2-1　　HIF-2α による遺伝子発現制御機構



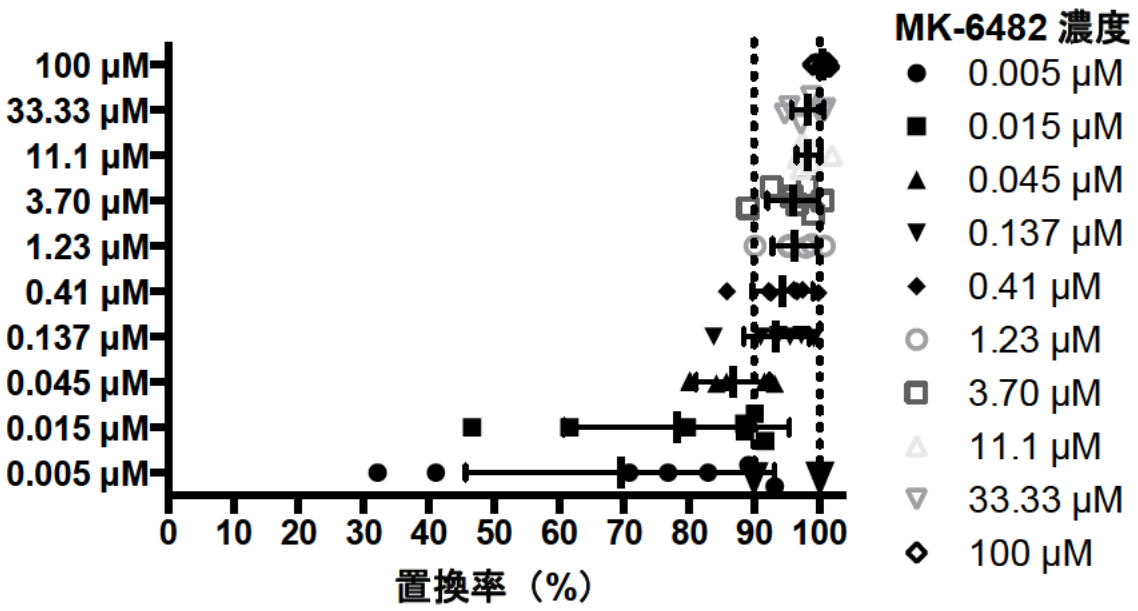
A：PAS-A、ARNT：aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator（別名 HIF-1β）、B：PAS-B、DNA：デオキシリボ核酸、H：basic helix-loop-helix、HIF-2α：低酸素誘導因子2α、O_2：酸素、PAS：Per-ARNT-Sim、Pro-OH：水酸化プロリン残基、pVHL：*VHL* 遺伝子によりコードされる蛋白質、ub：ユビキチン、*VHL*：von Hippel-Lindau
HIF-2転写因子は HIF-2α 及び ARNT からなるヘテロ二量体である。ヘテロ二量体は basic helix-loop-helix（H）、PAS-A ドメイン及び PAS-B ドメインでの結合により形成される。通常酸素下では、HIF-2α は2つのプロリン残基のうちの1つが水酸化され、癌抑制蛋白質である pVHL により認識される。低酸素下又は pVHL が欠損した細胞では、HIF-2α は安定化し、HIF-2α-ARNT ヘテロ二量体として DNA に結合し、低酸素応答配列を有する遺伝子の転写を誘導する。
[4.3: 05L2WT]の Fig 1を変更して示した。

MK-6482は HIF-2α の転写因子としての機能を抑制することにより、癌細胞での低酸素性シグナル伝達を阻害する低分子化合物である。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。その結果、MK-6482は HIF-2α の発現がみられる腫瘍細胞で、サイクリン D1（*CCND1*）、血管内皮細胞増殖因子 A（*VEGFA*）、グルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1（*SLC2A1*）等の発癌に関与する各種遺伝子の転写を阻害する。

2.6.2.2.1.2　　HIF-2α の PAS-B ドメインに対する MK-6482の親和性

SPA 法を用いて、HIF-2α の PAS-B ドメイン内に存在するポケットからの放射標識プローブの置換を測定することにより、MK-6482の親和性を検討した[4.2.1.1.1: PD005]。MK-6482は放射標識プローブを置換し、そのときの50%阻害濃度（IC_{50}値）は<0.005～0.015 μM（<1.9～5.8 ng/mL）の範囲であった[図 2.6.2-2]。これらの成績から、MK-6482は HIF-2α の PAS-B ドメインに高親和性で結合することが示された。MK-6482のグルクロン酸抱合体代謝物である PT3317では、試験した最高濃度の100 μM（38.3 μg/mL）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（[4.2.1.1.1: PD005]の Table 2）。

図 2.6.2-2　　MK-6482 による放射標識プローブの置換

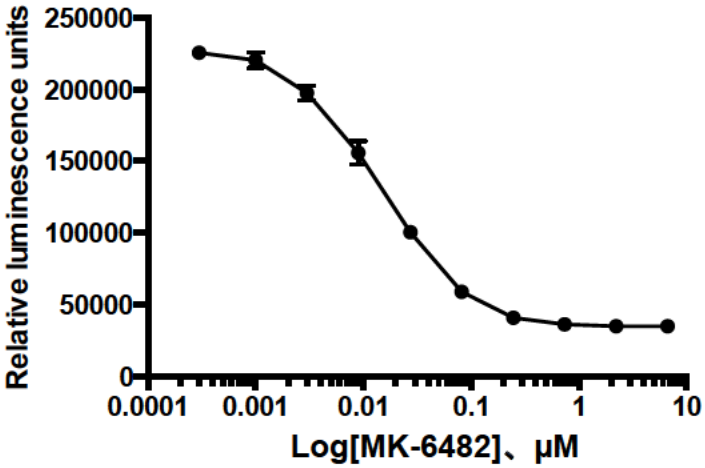


DMSO：ジメチルスルホキシド、IC_{50}：50%阻害濃度、μM：micromolar、nM：nanomolar、SPA：シンチレーション近接法
100 nM の poly-histidine-HIF-2α PAS-B、[^{3}H]標識プローブ、並びに媒体（DMSO）又は0.005～100 μM の MK-6482 を含む Tris 緩衝液中で室温にて1時間インキュベートし、YSi Copper His-tagged SPA ビーズを添加後、2時間インキュベートした。β 線核種の近接による蛍光を測定することにより結合した放射標識プローブ量を定量し、置換率（%）を算出した。図には試験で用いた各ロットの MK-6482による放射標識プローブの平均置換率をプロットした。これらのデータから得られた IC_{50}値は、<0.005～0.015 μM の範囲であった。
[4.2.1.1.1: PD005]の Figure 2を変更して示した。

2.6.2.2.1.3　　低酸素応答配列依存性遺伝子発現に対する MK-6482の阻害

HIF-2α が構成的に活性化し、HIF-1α の機能が欠損した *VHL* 変異淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）細胞株である786-O 細胞を用いて、MK-6482の HIF-2α 誘導 HRE 依存性ルシフェラーゼ活性阻害作用を検討した[4.2.1.1.2: PD001]。細胞に HRE 制御ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、安定な細胞株を樹立した。MK-6482はルシフェラーゼ活性を低下させ、そのときの IC_{50}値は0.015 μM（5.8 ng/mL）であった[図 2.6.2-3]。この成績から、MK-6482は HIF-2α の転写活性を低濃度で阻害することが示された。

図 2.6.2-3　　HIF-2α 誘導 HRE 依存性ルシフェラーゼ活性に対する MK-6482 の阻害作用

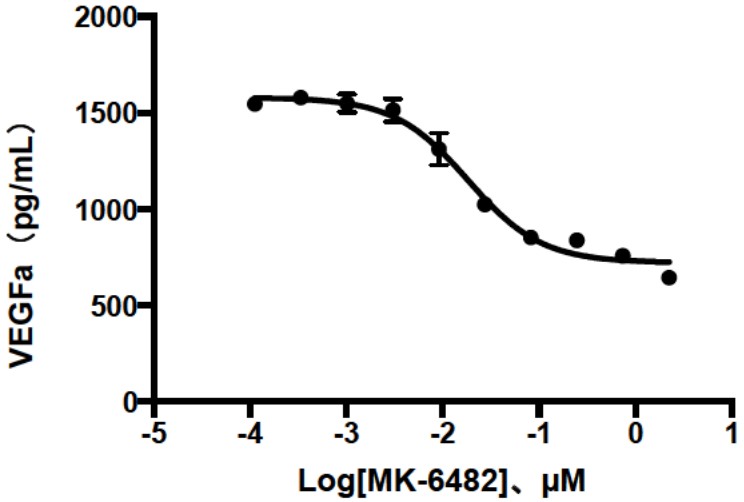


DMSO：ジメチルスルホキシド、HIF-2α：低酸素誘導因子2α、HRE：低酸素応答配列、IC_{50}：50%阻害濃度、μM：micromolar、n：number
786-O-Hif-Luc 細胞（HRE 制御ルシフェラーゼ遺伝子を導入した786-O 細胞）に媒体（DMSO）又は0.0003～6.67 μM の MK-6482を添加し、24時間培養後、HIF-2α 誘導 HRE 依存性ルシフェラーゼ活性を ONE-Glo Luciferase Assay Reagent を用いて測定した（n = 3）。Log[MK-6482]は MK-6482の濃度の対数を示す。IC_{50}値は0.015 μM であった。
[4.2.1.1.2: PD001]の Figure 1を変更して示した。

2.6.2.2.1.4　　786-O 細胞での VEGFa の産生に対する MK-6482の阻害

ccRCC 腫瘍細胞株である786-O 細胞での VEGFa の産生に対する MK-6482の阻害作用を検討した[4.2.1.1.3: PD002]。786-O 細胞での *VEGFA* の転写は HIF-2α の転写活性に依存している。786-O 細胞を MK-6482で処理することにより、ELISA 法で測定した細胞培養液への VEGFa の産生量が減少した[図 2.6.2-4]。MK-6482による VEGFa の産生抑制作用の IC_{50}値は0.018 μM（6.9 ng/mL）であった。この成績から、MK-6482により *VEGFA* の転写が阻害されることが示唆された。MK-6482が HRE 依存性ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現を阻害した成績[2.6.2.2.1.3項] [4.2.1.1.2: PD001]とともに、786-O 細胞での HIF-2α の転写活性に対する MK-6482の阻害作用が確認された。

図 2.6.2-4　　786-O 細胞からの VEGFa の産生に対する MK-6482 の阻害作用

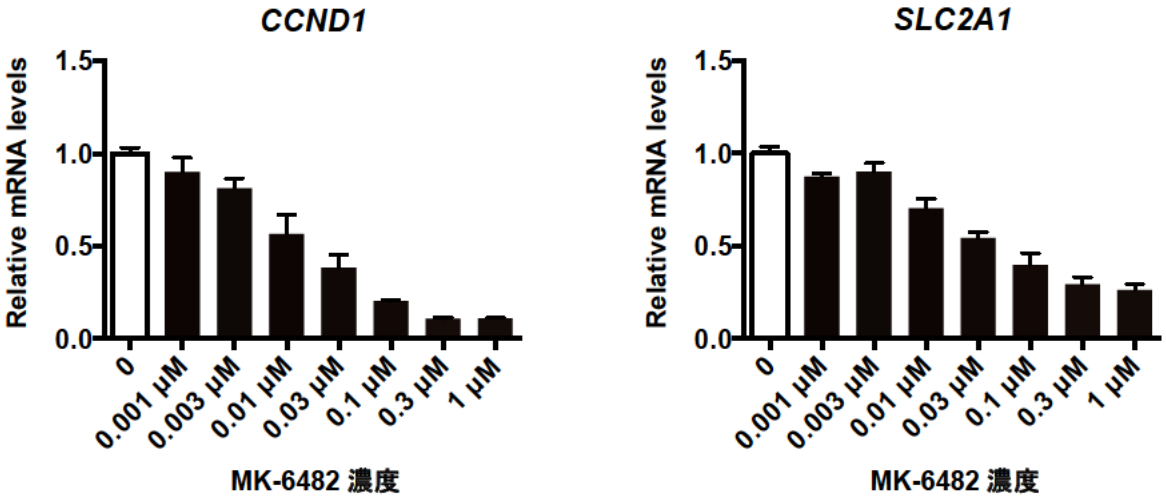


DMSO：ジメチルスルホキシド、ELISA：酵素結合免疫吸着測定法、IC_{50}：50%阻害濃度、μM：micromolar、n：number、pg/mL：picogram per milliliter、VEGFa：血管内皮細胞増殖因子 A
786-O 細胞を媒体（DMSO）又は0.001～20 μM の MK-6482を含む培地で20時間前培養し、MK-6482を含む新鮮培地に交換した。24時間後に培地中に産生された VEGFa を ELISA 法により測定した（n = 2）。MK-6482により培地中の VEGFa 濃度が減少した。IC_{50}値は0.018 μM と算出された。Log[MK-6482]は MK-6482の濃度の対数を示す。
[4.2.1.1.3: PD002]の Figure 1を変更して示した。

2.6.2.2.1.5　786-O 細胞での HIF-2α 依存性遺伝子発現及び HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に対する MK-6482の阻害

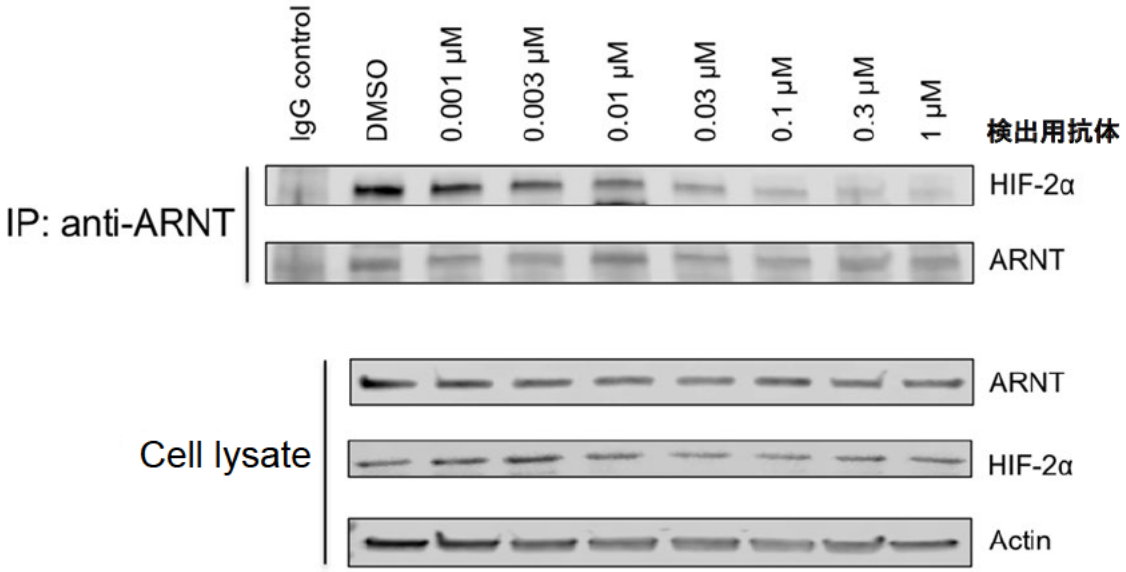
ccRCC 腫瘍細胞株である786-O 細胞を用いて、MK-6482の遺伝子転写阻害作用及びその作用機序を検討した[4.2.1.1.4: PD003]。*CCND1*及び*SLC2A1*に対する成績を[図 2.6.2-5]に示す。細胞を MK-6482で処理することにより、HIF-2α 標的遺伝子である *CCND1*、*SLC2A1*、*SERPINE1*（[4.2.1.1.4: PD003]の Figure 2）及び *VEGFA*（[4.2.1.1.4: PD003]の Figure 3）の mRNA 量が減少した。また、MK-6482は同じ濃度範囲で HIF-2α と ARNT の共免疫沈降を阻害したことから[図 2.6.2-6]、MK-6482は HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体の形成を阻害することにより、HIF-2α の転写活性を阻害するものと考えられた。

図 2.6.2-5　　MK-6482 により 16 時間処理した 786-O 細胞での *CCND1* 及び *SLC2A1* の発現量



CCND1：サイクリン D1遺伝子、cDNA：相補的 DNA、DMSO：ジメチルスルホキシド、DNA：デオキシリボ核酸、μM：micromolar、mRNA：メッセンジャーRNA、n：number、RNA：リボ核酸、RT-qPCR：定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、*SLC2A1*：グルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1遺伝子
786-O 細胞を媒体（DMSO）又は図に示す種々の濃度の MK-6482を含む培地で16時間培養後、回収した。Total RNA を単離し、一本鎖 cDNA に転写した。得られた cDNA より RT-qPCR 法を用いて *CCND1*及び *SLC2A1*の mRNA 量を定量し、内部標準であるサイクロフィリン B の mRNA 量で正規化した（n＝3）。MK-6842は *CCND1* 及び *SLC2A1*の発現量を減少させた。
[4.2.1.1.4: PD003]の Figure 1及び4を変更して示した。

図 2.6.2-6　　786-O 細胞での HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に対する MK-6482 の阻害

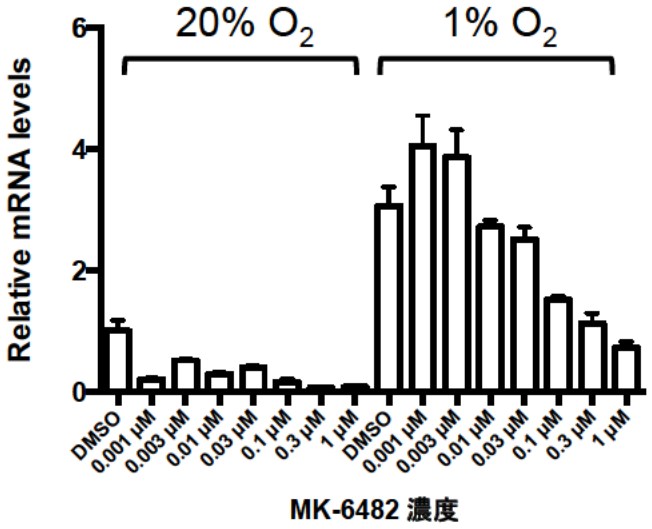


ARNT：aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator、DMSO：ジメチルスルホキシド、HIF-2α：低酸素誘導因子 2α、IgG：免疫グロブリン G、IP：免疫沈降、μM：micromolar、SDS：ドデシル硫酸ナトリウム
[図 2.6.2-5]と同様に MK-6482で培養した786-O 細胞より細胞ライセートを調製した。ARNT に対する抗体を用いて HIF-2α と ARNT の蛋白質複合体を免疫沈降させた。蛋白質複合体及び細胞ライセートを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、HIF-2α 及び ARNT に対する抗体を用いて Western Blot 法により各蛋白質を検出した。MK-6482で処理した細胞では HIF-2α と ARNT の共免疫沈降物が減少した。
[4.2.1.1.4: PD003]の Figure 6を変更して示した。

2.6.2.2.1.6　MK-6482による HIF-2α の選択的阻害

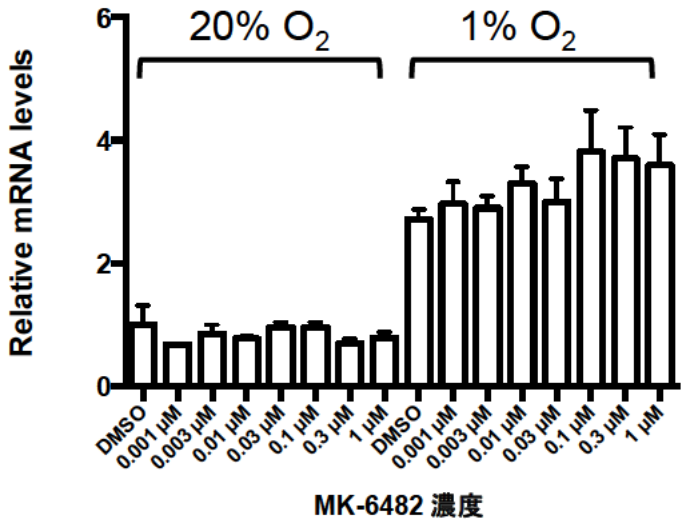
肝細胞癌由来 Hep3B 細胞では低酸素条件下で HIF-1α 及び HIF-2α の両蛋白質が安定化し、その結果低酸素応答遺伝子の活性化が認められる[4.2.1.1.5: PD004]。MK-6482は Hep3B 細胞での低酸素により誘導される HIF-2α の標的遺伝子であるエリスロポエチン（*EPO*）[図 2.6.2-7]及びプラスミノーゲン活性化因子インヒビター1（*SERPINE1*）（[4.2.1.1.5: PD004]の Figure 2）の mRNA 量を減少させた[4.3: 05BNJT] [4.3: 05BY9T] [4.3: 05BY9S] [4.3: 05BY8W] [4.3: 05BMZ4]。HIF-1α により特異的に制御されているホスホグリセリン酸キナーゼ1（*PGK1*）[図 2.6.2-8]及びピルビン酸脱水素酵素キナーゼ1（*PDK1*）（[4.2.1.1.5: PD004]の Figure 4）の発現に対しては、MK-6482は影響を及ぼさなかった[4.3: 05BPS5] [4.3: 05BY9G] [4.3: 05BMZ4]。同様に、MK-6482は HIF-1α ではなく、HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化を阻害した[図 2.6.2-9]。これらの成績から、MK-6482は選択的な HIF-2α 阻害薬であり、HIF-1α の転写活性を阻害しないことが明らかとなった。

図 2.6.2-7　正常酸素及び低酸素条件下での Hep3B 細胞の *EPO* の発現量に及ぼす MK-6482 の影響



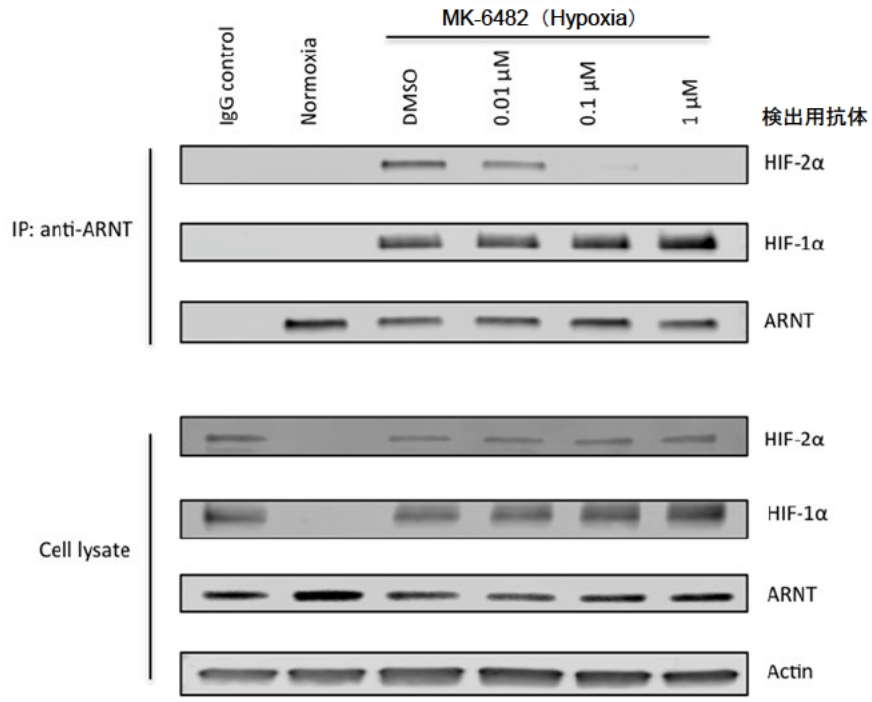
cDNA：相補的 DNA、DMSO：ジメチルスルホキシド、DNA：デオキシリボ核酸、*EPO*：エリスロポエチン遺伝子、µM：micromolar、mRNA：メッセンジャーRNA、n：number、O_2：酸素、RNA：リボ核酸、RT-qPCR：定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
正常酸素濃度（20% O_2）及び低酸素濃度（1% O_2）条件下で Hep3B 細胞を媒体（DMSO）又は図に示す種々の濃度の MK-6482を含む培地で24時間培養後、回収した。Total RNA を単離し、一本鎖 cDNA に転写した。得られた cDNA より RT-qPCR 法を用いて *EPO* の mRNA 量を定量し、内部標準であるサイクロフィリン B の mRNA 量で正規化した（n = 3）。*EPO* の発現は低酸素条件下で誘導され、その発現は MK-6482により阻害された。
[4.2.1.1.5: PD004]の Figure 1を変更して示した。

図 2.6.2-8　　正常酸素及び低酸素条件下での Hep3B 細胞の *PGK1* の発現量に及ぼす MK-6482 の影響



μM：micromolar、mRNA：メッセンジャーRNA、n：number、O_2：酸素、*PGK1*：ホスホグリセリン酸キナーゼ1遺伝子、RNA：リボ核酸
[図 2.6.2-7]と同様に Hep3B 細胞での *PGK1*の mRNA 量を定量した（n = 3）。*PGK1*の発現は低酸素条件下で誘導され、その発現は MK-6482により阻害されなかった。
[4.2.1.1.5: PD004]の Figure 3を変更して示した。

図 2.6.2-9　低酸素条件下の Hep3B 細胞での HIF-1α 又は HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体化に及ぼす MK-6482 の影響



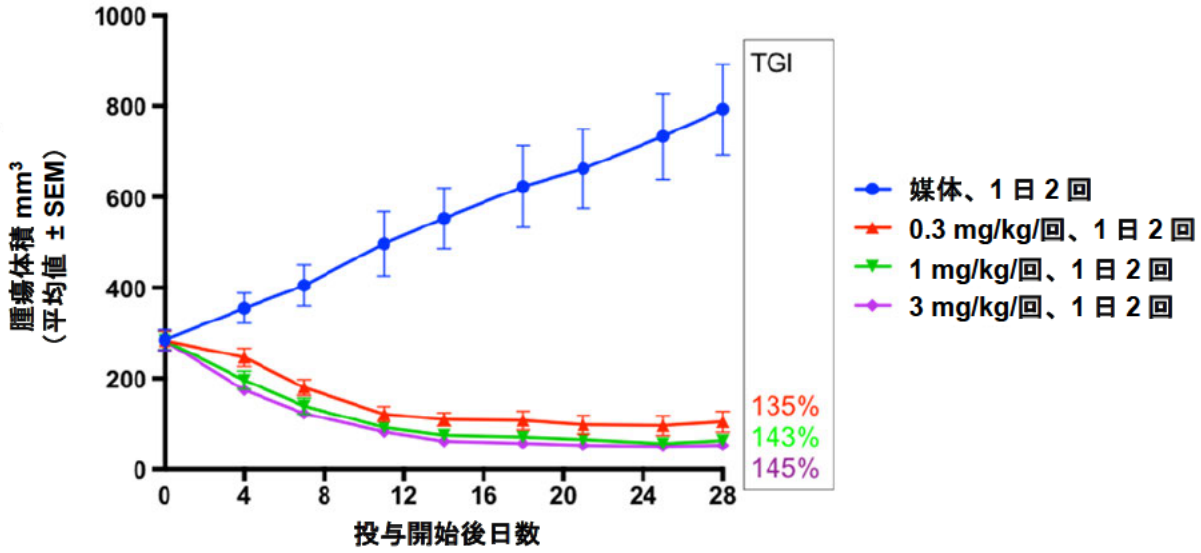
ARNT：aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator、DMSO：ジメチルスルホキシド、HIF-1α：低酸素誘導因子1α、HIF-2α：低酸素誘導因子2α、IgG：免疫グロブリン G、IP：免疫沈降、μM：micromolar、SDS：ドデシル硫酸ナトリウム
[図 2.6.2-7]と同様に MK-6482で培養した Hep3B 細胞より細胞ライセートを調製した。ARNT に対する抗体を用いて HIF-α と ARNT の蛋白質複合体を免疫沈降させた。蛋白質複合体及び細胞ライセートを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離し、HIF-2α、HIF-1α 及び ARNT に対する抗体を用いて Western Blot 法により各蛋白質を検出した。MK-6482で処理した細胞では HIF-2α と ARNT の共免疫沈降物が減少した。HIF-1α と ARNT の共免疫沈降物については MK-6482の処理により影響を受けなかった。
[4.2.1.1.5: PD004]の Figure 5を変更して示した。

2.6.2.2.2　In vivo での効力を裏付ける試験

2.6.2.2.2.1　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果

SCID/Beige マウスに移植したヒト ccRCC 由来 *VHL* 欠損786-O 細胞異種移植モデルを用いて MK-6482の抗腫瘍効果を検討した[4.2.1.1.6: PD006]。腫瘍の増殖したマウスに、媒体又は MK-6482を0.3、1及び3 mg/kg/回の用量で1日2回、28日間経口投与した。MK-6482のいずれの用量でも試験期間中、試験動物の体重及び行動に影響は認められず、死亡はみられなかった（データを示さず）。MK-6482の投与により、試験したいずれの用量でも腫瘍の退縮が認められ、媒体群と比較したときの投与開始28日目の腫瘍体積に基づく腫瘍増殖抑制（TGI）率は135%～145%であった[図 2.6.2-10]。また、試験終了時の腫瘍体積に基づくと、MK-6482の腫瘍増殖抑制効果はいずれの用量でも統計学的に有意であった[表 2.6.2-1]。

図 2.6.2-10　ccRCC 由来 786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482 又は媒体を投与した際の腫瘍増殖曲線



ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、mg/kg：milligram per kilogram、n：number、PEG：ポリエチレングリコール、SCID：重症複合免疫不全、SEM：平均値の標準誤差、TGI：腫瘍増殖抑制
SCID/Beige マウスの背部皮下に4×10^6個の786-O 細胞を移植し、腫瘍体積が300 mm^3に増殖した時点から媒体（10%エタノール、30% PEG400、0.3%メチルセルロース及び0.3% Tween 80）又は MK-6482の0.3、1及び3 mg/kg/回を1日2回、28日間経口投与した。腫瘍体積（mm^3）＝(長径×短径^2)/2。TGI (%) = (1-(MK-6482群の腫瘍体積の変化量/媒体群の腫瘍体積の変化量)) × 100。各点は腫瘍体積（mm^3）の平均値 ± SEM を示す（n = 8）。MK-6482の投与により、増殖した腫瘍体積の減少が認められた。
[4.2.1.1.6: PD006]の Figure 2を変更して示した。

表 2.6.2-1　ccRCC 由来 786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482 又は媒体を投与した後の腫瘍体積

投与群	腫瘍体積（mm^3）[a]	*p* 値 [b]
媒体	793 ± 100	NA
0.3 mg/kg/回	104 ± 23	<0.0001
1 mg/kg/回	63 ± 6	<0.0001
3 mg/kg/回	53 ± 4	<0.0001

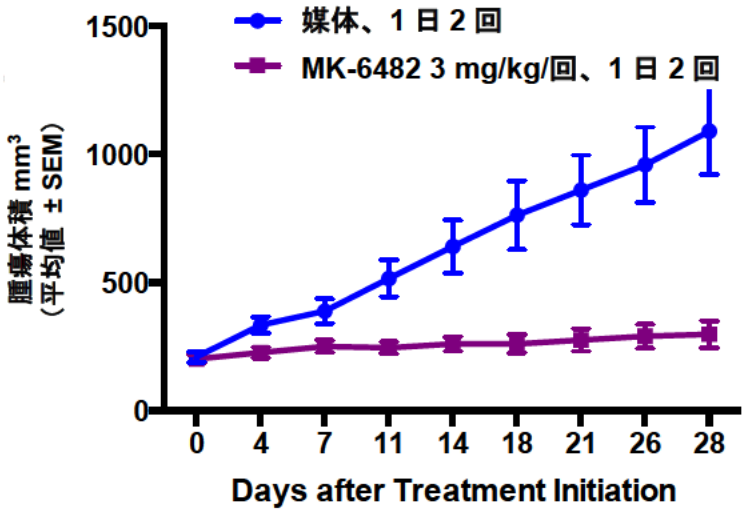
ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、mg/kg：milligram per kilogram、n：number、NA：該当せず、SEM：平均値の標準誤差
[図 2.6.2-10]に示した動物の投与終了後の腫瘍体積を測定した。
[a]　平均値 ± SEM（n = 8）
[b]　媒体群と比較したときの *p* 値（対応のない t 検定）
[4.2.1.1.6: PD006]の Table 5 を変更して示した。

2.6.2.2.2.2　患者由来 ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果

患者由来 ccRCC 細胞異種移植マウスモデルを用いて MK-6482の抗腫瘍効果を検討した[4.2.1.1.7: PD007]。免疫不全マウス（*nu/nu*）で継代した腫瘍切片を皮下移植した。この腫瘍モデルでは、以前に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。MK-6482の3 mg/kg/回を1日2回、28日間経口投与した結果、媒体群と比較して腫瘍の増殖抑制がみられ、投与終了後では89%の腫瘍体積の減少が認められた[図 2.6.2-11]。MK-6482の投与により、試験期間を通じて体重

増加に影響は認められず、全身状態の悪化及び死亡はみられなかった（データを示さず）。

図 2.6.2-11　患者由来 ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482 又は媒体を投与した際の腫瘍増殖曲線



ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、mg/kg：milligram per kilogram、n：number、SEM：平均値の標準誤差
患者由来 ccRCC 細胞を *nu/nu* マウスに移植し、腫瘍体積が1～1.5 cm^3まで増殖した切片を *nu/nu* マウスの背部皮下に移植した。腫瘍体積が150～300 mm^3に増殖した時点から媒体（図 2.6.2-10の脚注参照）又は MK-6482の 3 mg/kg/回を1日2回、28日間経口投与した。腫瘍体積（mm^3）＝0.52×長径×短径^2。各点は腫瘍体積の平均値 ± SEM を示す（n＝8）。MK-6482の投与により、腫瘍体積の増加抑制が認められた。投与終了時（投与開始28日目）の媒体及び MK-6482群の腫瘍体積はそれぞれ1091 ± 171及び298 ± 53 mm^3であり、MK-6482の投与により腫瘍体積は89%減少した。
[4.2.1.1.7: PD007]の Figure 6を変更して示した。

2.6.2.2.2.3　ccRCC 由来786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482の血中濃度及び薬力学的効果

VHL 欠損腫瘍モデルであるヒト ccRCC 由来786-O 細胞異種移植 SCID/Beige マウスに、媒体又は MK-6482の0.3、1及び3 mg/kg/回を1日2回、3日間経口投与した[4.2.1.1.8: PD008]。最終投与12時間後に、血漿及び腫瘍検体を採取した。

MK-6482の1 mg/kg/回以上の用量で、血漿中に MK-6482が検出された。腫瘍に由来するヒト VEGFa 蛋白質は、ELISA 法により媒体群の担癌マウスでは血漿中に検出されたが、MK-6482群では、0.3 mg/kg/回群の1検体を除き、検出されなかった[表 2.6.2-2]。腫瘍の遺伝子発現解析では、MK-6482を投与した担癌マウスで、HIF-2α の標的遺伝子（*CCND1*、*SERPINE1*、*VEGFA* 及び *SLC2A1*）の発現量が減少した[図 2.6.2-12]。

表 2.6.2-2　　MK-6482 の最終投与 12 時間後の血漿中ヒト VEGFa 及び薬物濃度

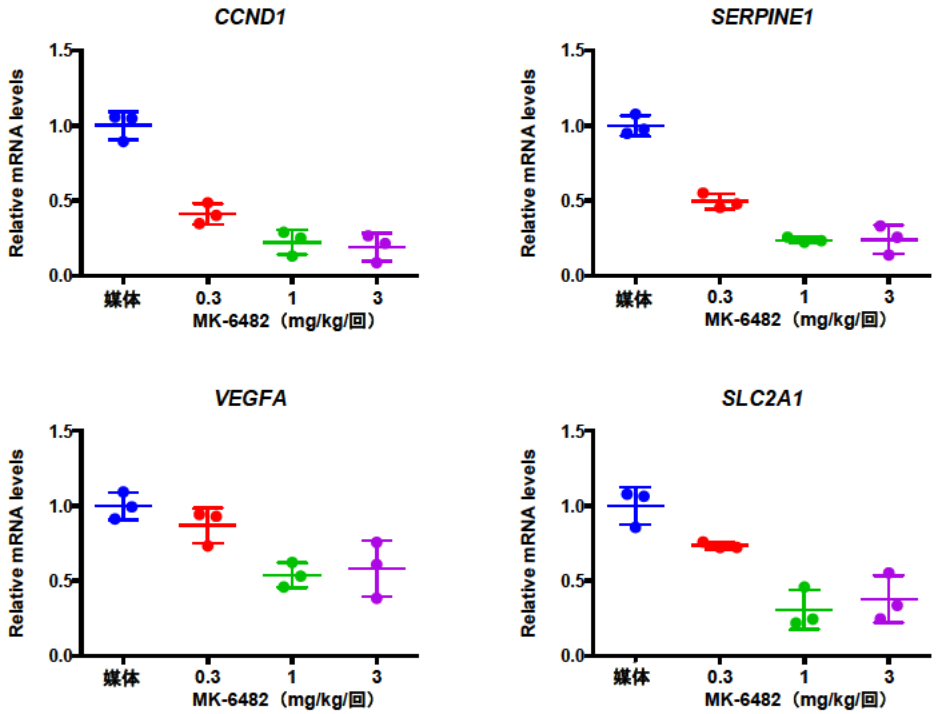
投与群	用量（mg/kg/回）	動物番号	血漿中ヒト VEGFa 濃度（pg/mL）	血漿中 MK-6482 濃度（μM）	血漿中 MK-6482 濃度の平均値（μM）
媒体	NA	1	121.145	ND	ND
		2	90.544	ND	
		3	17.808	ND	
MK-6482	0.3	4	7.102	LLQ 未満	LLQ 未満
		5	0.000	LLQ 未満	
		6	0.000	LLQ 未満	
	1	7	0.000	0.090	0.071
		8	0.000	0.068	
		9	0.000	0.054	
	3	10	0.000	0.183	0.153
		11	0.000	0.130	
		12	0.000	0.145	

ELISA：酵素結合免疫吸着測定法、LC-MS/MS：液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析、LLQ：定量下限（0.05 μM）、μM：micromolar、mg/kg：milligram per kilogram、NA：該当せず、ND：検出せず、PEG：ポリエチレングリコール、pg/mL：picogram per milliliter、SCID：重症複合免疫不全、VEGFa：血管内皮細胞増殖因子 A

SCID/Beige マウスの背部皮下に 5×10^6 個の 786-O 細胞を移植し、腫瘍体積が 350 mm^3 に増殖した時点から媒体（10%エタノール、30%PEG400、0.3%メチルセルロース及び 0.3% Tween 80）又は MK-6482 の 0.3、1 及び 3 mg/kg/回を 1 日 2 回、3 日間経口投与した。最終投与 12 時間後に血漿を採取し、血漿中ヒト VEGFa 濃度を ELISA 法により、血漿中 MK-6482 濃度を LC-MS/MS 法により測定した。

[4.2.1.1.8: PD008]の Table 5 を変更して示した。

図 2.6.2-12　ccRCC 由来 786-O 細胞異種移植モデルでの MK-6482 の最終投与 12 時間後の腫瘍組織でのヒト mRNA の発現量



CCND1：サイクリン D1遺伝子、ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、cDNA：相補的 DNA、DNA：デオキシリボ核酸、mg/kg：milligram per kilogram、mRNA：メッセンジャーRNA、n：number、PCR：ポリメラーゼ連鎖反応、RNA：リボ核酸、*SERPINE1*：プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1遺伝子、*SLC2A1*：グルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1遺伝子、*VEGFA*：血管内皮細胞増殖因子 A 遺伝子
[表 2.6.2-2]の脚注に示すマウスより最終投与12時間後に腫瘍を摘出した。凍結検体から total RNA を単離し、一本鎖 cDNA に転写した。得られた cDNA より定量的 PCR 法を用いて各検体の mRNA 量を定量し、内部標準であるペプチジルプロピルイソメラーゼ B の mRNA 量で正規化した（n＝3）。MK-6482の投与により腫瘍での *CCND1*、*VEGFA*、*SERPINE1*及び *SLC2A1*のヒト遺伝子の発現が抑制された。
[4.2.1.1.8: PD008]の Figure 1を変更して示した。

2.6.2.2.2.4　ccRCC 由来 A498細胞異種移植モデルでの MK-6482の血中濃度及び薬力学的効果

VHL 欠損腫瘍モデルであるヒト ccRCC 由来 A498細胞異種移植 SCID/Beige マウスに、媒体又は MK-6482の0.3及び1 mg/kg/回を1日2回、3日間経口投与した[4.2.1.1.9: PD009]。MK-6482又は媒体の最終投与12、24及び36時間後に、血漿及び腫瘍検体を採取した。

最終投与12時間後では、MK-6482の0.3及び1 mg/kg/回の用量で血漿中に MK-6482が検出された[表 2.6.2-3]。最終投与24及び36時間後では、1 mg/kg/回投与時のみ MK-6482の血漿中濃度が検出可能であった。MK-6482の0.3及び1 mg/kg/回の投与により、各投与後時点で媒体群と比較して腫瘍重量の減少傾向が認められた[図 2.6.2-13]。腫瘍組織の mRNA 解析では、MK-6482投与12時間後の時点で、媒体群と比較して HIF-2α の標的遺伝子である *VEGFA*、*SLC2A1*、*CCND1*及び *SERPINE1* の mRNA の発現量の減少傾向がみられた[図 2.6.2-14]。これらの遺伝子の発現量は投与24時間後までに媒体群と同程度となった。HIF-1α の標的遺伝子である *PGK1*及び *PDK1*の腫瘍での mRNA の発現量には、いずれの用量でも最終投与12時間後で減少は認められなかった。腫瘍組織の免疫

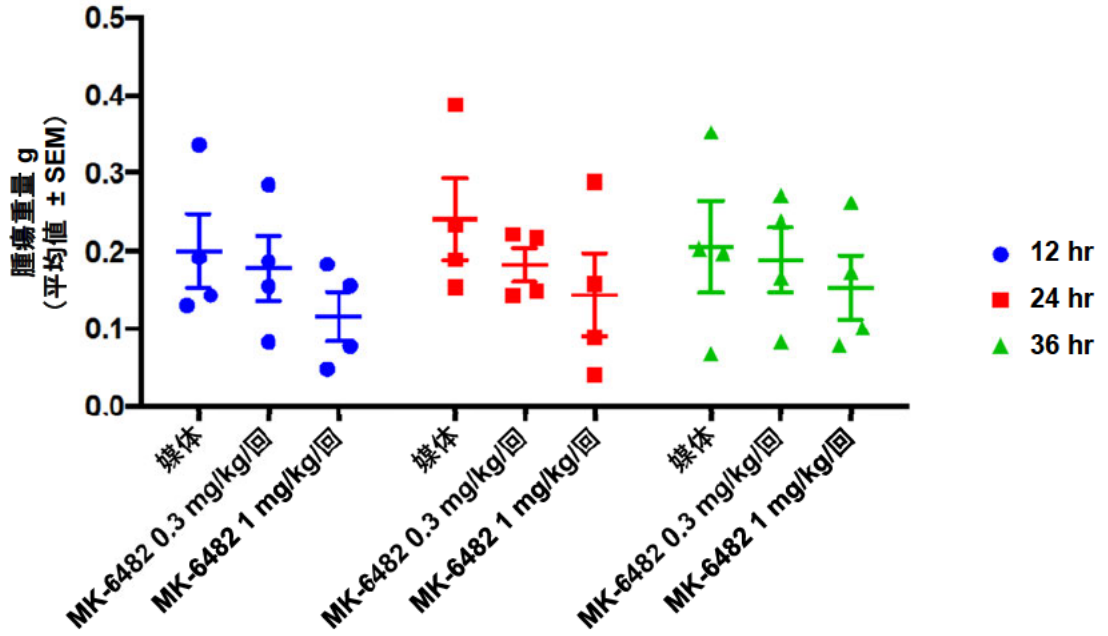
組織化学的染色では、MK-6482群の腫瘍での細胞増殖及び血管新生のマーカーであるそれぞれKi67及びCD31の陽性細胞数が、媒体群と比較して減少した（それぞれ、[4.2.1.1.9: PD009]のFigure 3及び4）。また、MK-6482群では腫瘍でのアポトーシスのマーカーである活性化カスパーゼ3の陽性細胞数が増加した（[4.2.1.1.9: PD009]のFigure 5）。これらの成績から、ccRCC由来A498細胞異種移植マウスモデルで、MK-6482はHIF-2αの標的遺伝子の発現を選択的に阻害することが示された。MK-6482の投与により、HIF-2αの標的遺伝子発現の阻害とともに、腫瘍細胞の増殖及び血管新生の減少、並びにアポトーシスの増加が認められた。

表 2.6.2-3　MK-6482の最終投与12、24及び36時間後の血漿中薬物濃度

MK-6482群	採血時間	動物番号	血漿中MK-6482濃度（μM）	血漿中MK-6482濃度の平均値（μM）
0.3 mg/kg/回	12時間	13	0.022	0.026
		14	LLQ未満	
		15	0.015	
		16	0.04	
	24時間	17	LLQ未満	LLQ未満
		18	LLQ未満	
		19	LLQ未満	
		20	LLQ未満	
	36時間	21	LLQ未満	LLQ未満
		22	LLQ未満	
		23	LLQ未満	
		24	LLQ未満	
1 mg/kg/回	12時間	25	0.036	0.071
		26	0.12	
		27	LLQ未満	
		28	0.056	
	24時間	29	0.021	0.024
		30	0.024	
		31	0.030	
		32	0.021	
	36時間	33	LLQ未満	0.020
		34	0.026	
		35	LLQ未満	
		36	0.014	

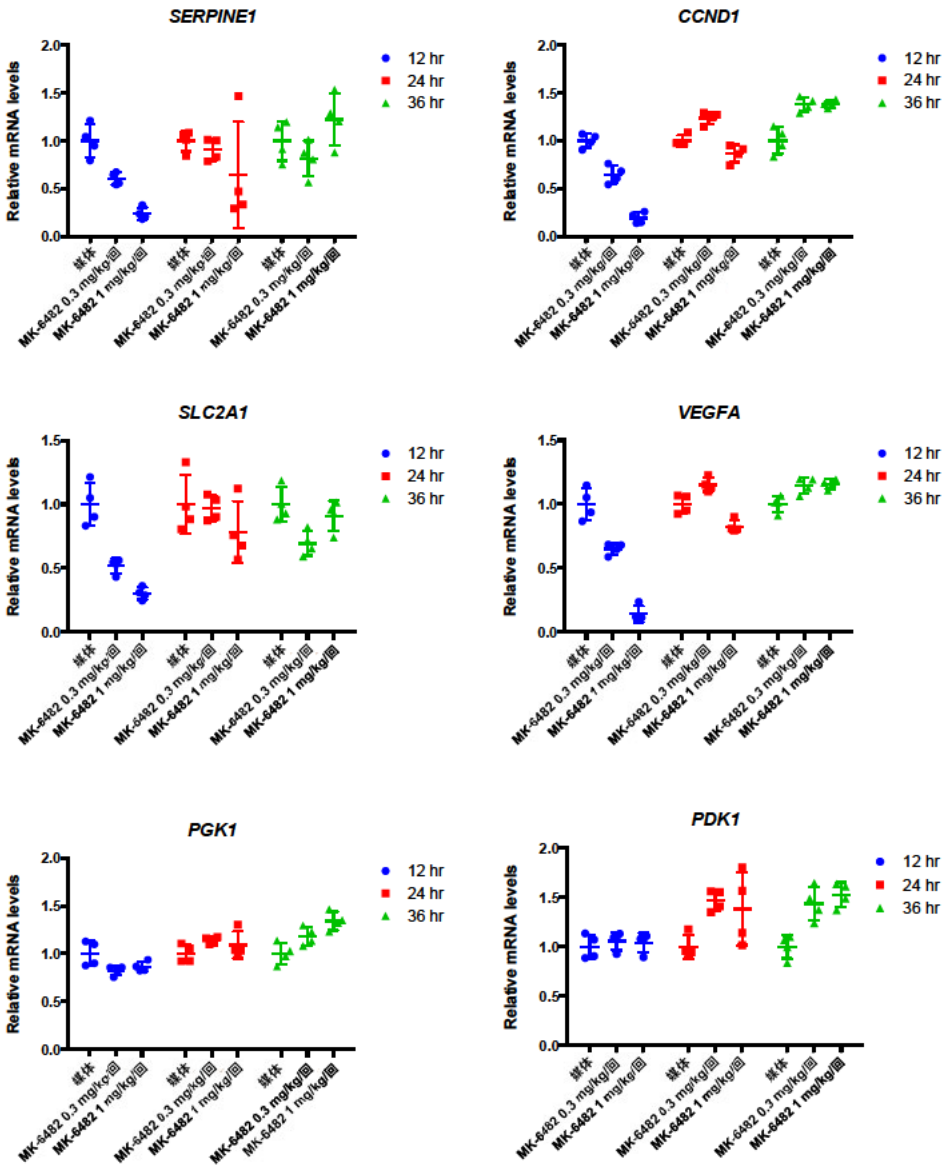
LC-MS/MS：液体クロマトグラフ質量分析、LLQ：定量下限（0.01 μM）、μM：micromolar、mg/kg：milligram per kilogram、PEG：ポリエチレングリコール、SCID：重症複合免疫不全
SCID/Beigeマウスの背部皮下に4×10^6個のA498細胞を移植し、腫瘍体積が350 mm^3に増殖した時点から媒体（10%エタノール、30%PEG400、0.3%メチルセルロース及び0.3% Tween 80）又はMK-6482の0.3及び1 mg/kg/回を1日2回、3日間経口投与した。最終投与12、24及び36時間後に血漿を採取し、血漿中MK-6482濃度をLC-MS/MS法により測定した。
[4.2.1.1.9: PD009]のTable 5を変更して示した。

図 2.6.2-13　ccRCC 由来 A498 細胞異種移植モデルでの MK-6482 の最終投与 12、24 及び 36 時間後の腫瘍重量



ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、g：gram、hr：時間、mg/kg：milligram per kilogram、n：number、SEM：平均値の標準誤差
[表 2.6.2-3]の脚注に示すマウスより最終投与12、24及び36時間後に腫瘍を摘出し、腫瘍重量（g）を測定した（n = 4）。
[4.2.1.1.9: PD009]の Figure 1を変更して示した。

図 2.6.2-14　ccRCC 由来 A498 細胞異種移植モデルでの MK-6482 の最終投与 12、24 及び 36 時間後の腫瘍組織でのヒト mRNA の発現量



CCND1：サイクリン D1遺伝子、ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、cDNA：相補的 DNA、DNA：デオキシリボ核酸、hr：時間、mg/kg：milligram per kilogram、mRNA：メッセンジャーRNA、n：number、PCR：ポリメラーゼ連鎖反応、*PDK1*：ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ1遺伝子、*PGK1*：ホスホグリセリン酸キナーゼ1遺伝子、RNA：リボ核酸、*SERPINE1*：プラスミノーゲン活性化因子インヒビター1遺伝子、*SLC2A1*：グルコース輸送体 solute carrier family 2 member 1遺伝子、*VEGFA*：血管内皮細胞増殖因子 A 遺伝子
[表 2.6.2-3]の脚注に示すマウスより最終投与12、24及び36時間後に腫瘍を摘出し、半切した。各腫瘍の半分を液体窒素で凍結した。凍結検体から total RNA を単離し、一本鎖 cDNA に転写した。得られた cDNA より定量的 PCR 法を用いて各検体の mRNA 量を定量し、内部標準であるペプチジルプロピルイソメラーゼ B の mRNA 量で正規化した（n = 4）。
[4.2.1.1.9: PD009]の Figure 2を変更して示した。

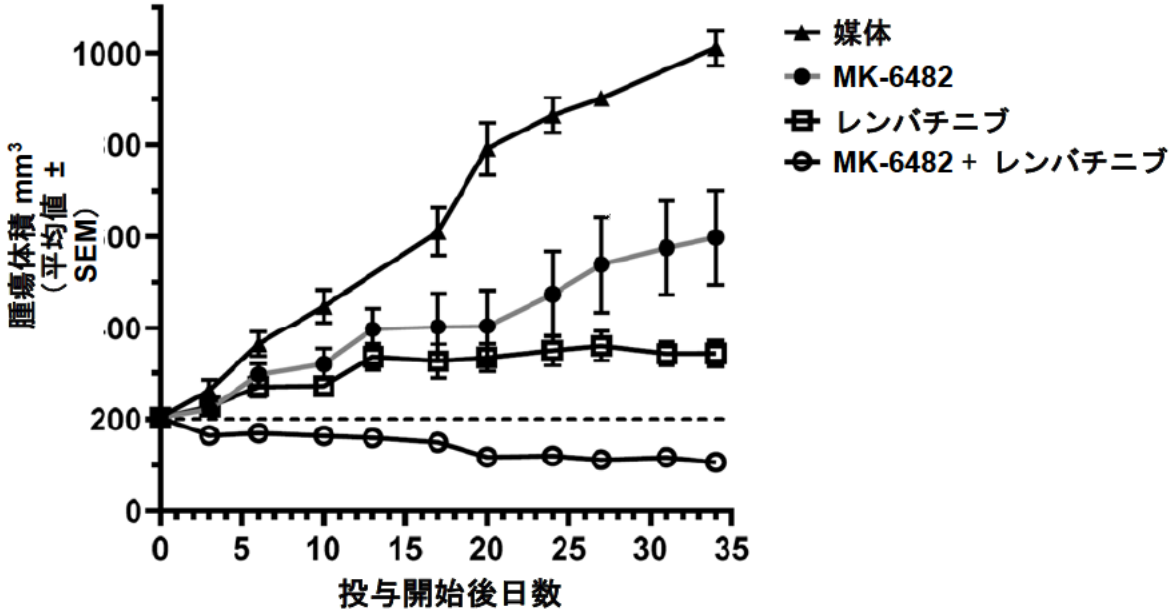
2.6.2.2.2.5　　他の抗腫瘍薬との併用

2.6.2.2.2.5.1　　レンバチニブとの併用

VHL 欠損腫瘍モデルであるヒト ccRCC 由来 UMRC2細胞異種移植 SCID/Beige マウスを用いて、MK-6482と RCC に適応を有するレンバチニブとを併用したときの抗腫瘍効果を検討した[4.2.1.1.10: PD011]。MK-6482の3 mg/kg/回を1日2回、レンバチニブの10 mg/kg/回を1日1回、単独又は両薬物を併用することにより35日間経口投与した。

MK-6482とレンバチニブの併用群の抗腫瘍効果は、MK-6482単独群（p<0.0001）又はレンバチニブ単独群（p=0.0444）と比較して大きいことが確認された[図 2.6.2-15]。MK-6482単独群（p=0.0131）、レンバチニブ単独群（p<0.0001）及び MK-6482とレンバチニブの併用群（p<0.0001）のいずれも、媒体群と比較して抗腫瘍効果を示した。また、腫瘍体積に基づく TGI、並びに目視での部分及び完全寛解の成績を[表 2.6.2-4]に示す。併用群ではすべての動物で部分寛解が認められたが、いずれの群の動物でも完全寛解はみられなかった。MK-6482とレンバチニブの併用により、体重変化及び早期死亡に影響は認められなかった（データを示さず）。

図 2.6.2-15　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482 の単独及びレンバチニブとの併用投与による抗腫瘍効果



ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、n：number、SCID：重症複合免疫不全、SEM：平均値の標準誤差
SCID/Beige マウスの側腹部皮下に1×10^{6}個の UMRC2細胞を移植し、腫瘍体積が203 mm^{3}に増殖した時点から媒体（0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80）、MK-6482の3 mg/kg/回を1日2回、レンバチニブの10 mg/kg/回を1日1回又は両薬物の併用により35日間、経口投与した。腫瘍体積（mm^3）＝0.5 ×長径×短径^2。各点は腫瘍体積の平均値 ± SEM を示す（n = 10）。水平の点線は投与開始時点の腫瘍体積である203 mm^{3}を示す。投与開始34日後に一元配置分散分析及び Tukey の多重比較検定により統計解析を実施した。
[4.2.1.1.10: PD011]の Figure 1を変更して示した。

表 2.6.2-4　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの投与開始 34 日後の媒体群に対する薬物投与群の TGI、並びに試験終了時の PR 及び CR

投与群	TGI[a]（*p* 値）	試験終了時の PR 及び CR[b]
MK-6482	51%（*p*=0.0579）	PR：1/10例、CR：0/10例
レンバチニブ	83%（*p*<0.0001）	PR：0/10例、CR：0/10例
MK-6482 + レンバチニブ	112%（*p*<0.0001）	PR：10/10例、CR：0/10例

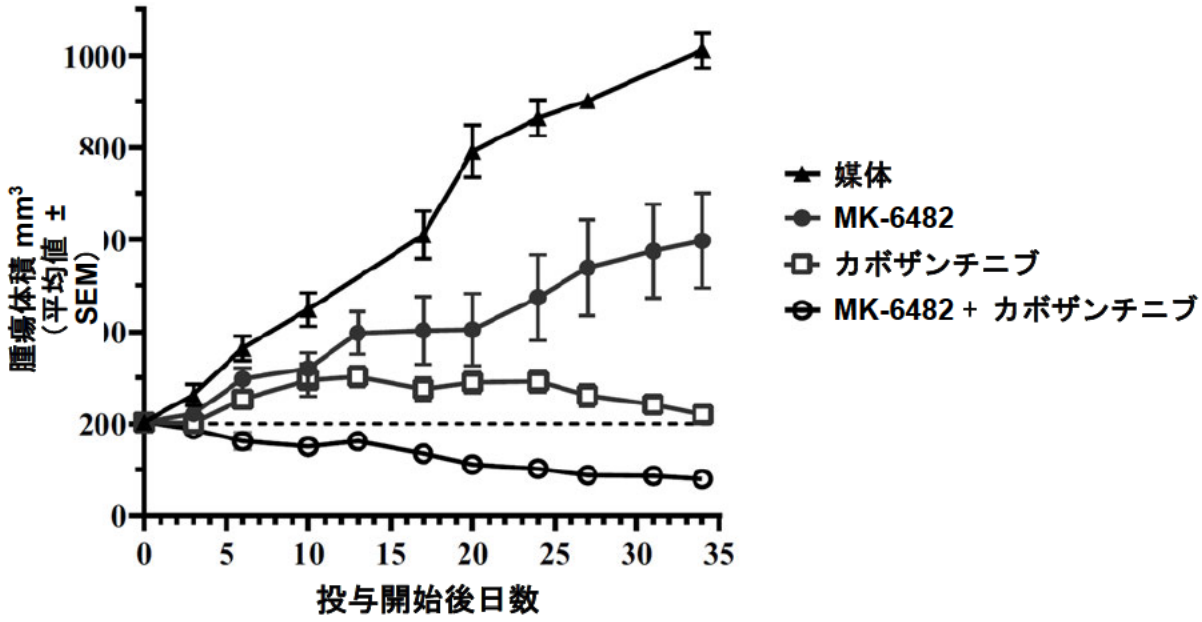
ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、CR：完全寛解、PR：部分寛解、TGI：腫瘍増殖抑制
[a] TGI（%）＝(1 - (薬物投与群の平均腫瘍体積)/(媒体群の平均腫瘍体積)) × 100。t 検定により解析した。
[b] CR は腫瘍を目視できない場合、PR は投与開始時の腫瘍体積より小さい場合と定義した。
[4.2.1.1.10: PD011]の Table 8を変更して示した。

2.6.2.2.2.5.2　カボザンチニブとの併用

[2.6.2.2.2.5.1 項]と同じ動物モデルを用いて、MK-6482と RCC に適応を有するカボザンチニブとを併用したときの抗腫瘍効果を検討した[4.2.1.1.11: PD012]。MK-6482の3 mg/kg/回を1日2回、カボザンチニブの30 mg/kg/回を1日1回、単独又は両薬物を併用することにより35日間経口投与した。

MK-6482とカボザンチニブの併用群の抗腫瘍効果は、MK-6482単独群（*p*<0.0001）と比較して大きいことが確認された[図 2.6.2-16]。カボザンチニブ単独群の抗腫瘍効果は、MK-6482との併用群と差がなかった（*p*=0.4348）。MK-6482単独群（*p*=0.0152）、カボザンチニブ単独群（*p*<0.0001）及び MK-6482とカボザンチニブの併用群（*p*<0.0001）のいずれも、媒体群と比較して抗腫瘍効果を示した。また、腫瘍体積に基づく TGI、並びに目視での部分及び完全寛解の成績を[表 2.6.2-5]に示す。併用群ではすべての動物で部分寛解が認められたが、いずれの群の動物でも完全寛解はみられなかった。MK-6482とカボザンチニブの併用により、体重変化及び早期死亡に影響は認められなかった（データを示さず）。

図 2.6.2-16　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの MK-6482 の単独及びカボザンチニブとの併用投与による抗腫瘍効果



ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、n：number、SCID：重症複合免疫不全、SEM：平均値の標準誤差
SCID/Beige マウスの背部皮下に1×10^{6}個の UMRC2細胞を移植し、腫瘍体積が203 mm^{3}に増殖した時点から媒体（0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80）、MK-6482の3 mg/kg/回を1日2回、カボザンチニブの30 mg/kg/回を1日1回又は両薬物の併用により35日間、経口投与した。腫瘍体積（mm^3）＝0.5 × (長径×短径^2)。各点は腫瘍体積の平均値 ± SEM を示す（n＝10）。水平の点線は投与開始時点の腫瘍体積である203 mm^{3}を示す。投与開始34日後に一元配置分散分析及び Tukey の多重比較検定により統計解析を実施した。
[4.2.1.1.11: PD012]の Figure 1を変更して示した。

表 2.6.2-5　ヒト ccRCC 細胞異種移植モデルでの投与開始 34 日後の媒体群に対する薬物投与群の TGI、並びに試験終了時の PR 及び CR

投与群	TGI[a]（*p* 値）	試験終了時の PR 及び CR[b]
MK-6482	51%（*p*=0.0579）	PR：1/10例、CR：0/10例
カボザンチニブ	98%（*p*<0.0001）	PR：3/10例、CR：0/10例
MK-6482 + カボザンチニブ	115%（*p*<0.0001）	PR：10/10例、CR：0/10例

ccRCC：淡明細胞型腎細胞癌、CR：完全寛解、PR：部分寛解、TGI：腫瘍増殖抑制
[a] TGI（%）＝(1 - (薬物投与群の平均腫瘍体積)/(媒体群の平均腫瘍体積)) × 100。t 検定により解析した。
[b] CR は腫瘍を目視できない場合、PR は投与開始時の腫瘍体積より小さい場合と定義した。
[4.2.1.1.11: PD012]の Table 8を変更して示した。

2.6.2.2.2.6　　他の腫瘍移植モデルでの MK-6482の抗腫瘍効果

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[表 2.6.2-6]。

表 2.6.2-6　　非 RCC 腫瘍異種移植モデルでの MK-6482 の抗腫瘍効果

腫瘍型	移植細胞	結果	記載箇所
NSCLC[a]	患者由来異種移植片	試験した 20 種類の腫瘍モデルで抗腫瘍効果は認められなかった	[4.2.1.1.12: PD013]
膀胱癌[b]	患者由来異種移植片	試験した 2 種類の腫瘍モデルで抗腫瘍効果は認められなかった	[4.2.1.1.13: PD016] [4.2.1.1.14: PD017]
胆管癌[c]	患者由来異種移植片	試験した 2 種類の腫瘍モデルで抗腫瘍効果は認められなかった	[4.2.1.1.15: PD014] [4.2.1.1.16: PD015]

n：number、NSCLC：非小細胞肺癌、RCC：腎細胞癌

[a] 免疫不全 *nu/nu* マウスの背部皮下に 20 種類の NSCLC 患者由来腫瘍片を移植し、腫瘍体積が 150～250 mm^3 に増殖した時点から媒体（10%エタノール、30%ポリエチレングリコール 400、0.3%メチルセルロース及び 0.3% Tween 80）又は MK-6482 の 10 mg/kg/回を 1 日 2 回、媒体群の腫瘍体積が 1500 mm^3 に増殖するか、最大 60 日間経口投与した（n = 2）。試験終了日の MK-6482 群の腫瘍体積を媒体群と比較した。

[b] 免疫不全 BALB/c Nude マウスの背部皮下に 2 種類の膀胱癌患者由来腫瘍片を移植し、腫瘍体積が 161 mm^3 [4.2.1.1.13：PD016]又は 152 mm^3 [4.2.1.1.14：PD017]に増殖した時点から上記媒体、MK-6482 の 3 及び 30 mg/kg/回を 1 日 2 回、28 日間経口投与した（n = 8）。試験終了日の MK-6482 群の腫瘍体積を媒体群と比較した。

[c] 免疫不全 BALB/c Nude マウスの背部皮下に 2 種類の胆管癌患者由来腫瘍片を移植し、腫瘍体積が 106 mm^3 [4.2.1.1.15：PD014]又は 162 mm^3 [4.2.1.1.16：PD015]に増殖した時点から上記媒体、MK-6482 の 3 及び 30 mg/kg/回を 1 日 2 回、28 日間経口投与した（n = 8）。試験終了日の MK-6482 群の腫瘍体積を媒体群と比較した。

2.6.2.3　　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　　In vitro での副次的薬理試験

MK-6482の選択性及びオフターゲット作用を評価するために、(1) 76種類の受容体及び8種類のイオンチャネル、並びに (2) 40種類のリン酸化酵素及び2種類の脱リン酸化酵素について試験を実施した[4.2.1.2.1: PD010]。その結果、試験に用いた濃度では MK-6482は作用を示さなかった。

2.6.2.3.1.1　　受容体及びイオンチャネル

76種類の受容体（アゴニスト及びアンタゴニスト活性）及び8種類のイオンチャネルに対するMK-6482の作用を検討した[4.2.1.2.1: PD010]。アゴニスト及びアンタゴニスト活性の評価に用いたMK-6482の濃度は、それぞれ12.5（4.8 µg/mL）及び10 µM（3.8 µg/mL）であった。84種類の受容体又はイオンチャネル[表 2.6.2-7]のいずれに対しても、MK-6482はアゴニスト及びアンタゴニスト活性を示さなかった。

表 2.6.2-7　　受容体及びイオンチャネルの測定対象

測定対象				
Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT1$_a$	Cannabinoid CB2	Endothelin ET$_A$	Melanocortin MC5	Prokineticin 1 (PK1)
Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT2$_a$	Cholecystokinin CCK2	Endothelin ET$_B$	Muscarinic M$_1$	Prolactin Releasing Peptide
Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT2$_b$	Complement 5a receptor	Prostanoid EP$_2$	Muscarinic M$_2$	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide 1 (PAC1)
Serotonin (5-Hydroxytryptamine) 5-HT2$_c$	Cannabinoid CB1	Prostanoid EP$_3$	Muscarinic M$_3$	Platelet Activating Factor
Adenosine A$_1$	Chemokine CCR1	Prostanoid FP	Motilin	Parathyroid Hormone 1 (PTH1)
Adenosine A$_3$	Chemokine CCR2B	Formyl peptide receptor 1	Tachykinin NK$_1$	Sphingosin-1-phosphate Receptor 3 (S1P3)
Adrenergic α$_{1A}$	Calcitonin Gene-Related Peptide CGRP1	Galanin1	Tachykinin NK$_3$	Somatostatin SST4
Adrenergic α$_{1D}$ (α2-79)	Corticotropin Releasing Factor CRF1	Gonadotropin Releasing Hormone	Neuromedin U Receptor 1	Thrombin-activated PARs
Adrenergic α$_{2A}$	Chemokine CX3CR1	Urotensin 2 Receptor (GPR14)	Neurotensin Receptor 1	Thromboxane A2 (TP)
Adrenergic α$_{2C}$	Chemokine CXCR1	Histamine H$_1$	Opiate delta 1 (OPRD1)	Thyrotropin (TSH)
Adrenergic β$_1$	Leukotriene, Cysteinyl CysLT1	Histamine H$_2$	Opiate kappa (OPRK)	Vasopressin 1$_A$
Adrenergic β$_2$	Dopamine D1	Histamine H$_3$	Opiate mu 1 (OPRM1)	Vasopressin 2
Angiotensin AT1	Dopamine D$_{2L}$	Prostaglandin I2	Oxytocin OT	Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 1 (VPAC1)
Bombesin BB2	Dopamine D$_5$	Lysophostatidic Acid Receptor 1	Orexin OX$_1$	Vasoactive Intestinal Peptide Receptor 2 (VPAC2)
Bradykinin receptor BDKR2	Prostanoid DP	Lysophostatidic Acid Receptor 3	Purinergic P2RY1	Neuropeptide Y (Y2)
Leukotriene B4 receptor BLT1	Nav1.5 sodium channel	Kv4.3 potassium channel	Cav1.2 calcium channel	Kv1.5 potassium channel
KCNQ1 potassium channel	hERG potassium channel	HCN4 potassium channel	Kir2.1 potassium channel	
[4.2.1.2.1: PD010]の測定対象を示した。				

2.6.2.3.1.2　　リン酸化酵素及び脱リン酸化酵素

40種類の蛋白質リン酸化酵素に対する MK-6482の10 μM（3.8 μg/mL）での作用を、放射標識トレーサーを用いた酵素活性測定法により検討した[4.2.1.2.1: PD010]。また、2種類の蛋白質脱リン酸化酵素である蛋白質チロシン脱リン酸化酵素1B 及び T 細胞蛋白質チロシン脱リン酸化酵素に対する作用については、蛍光測定法を用いて検討した。40種類のリン酸化酵素及び2種類の脱リン酸化酵素[表 2.6.2-8]のいずれに対しても MK-6482は作用を示さなかった。

表 2.6.2-8　　リン酸化酵素及び脱リン酸化酵素の測定対象

測定対象				
Tyrosine-protein kinase ABL1 (h)	CDK2/cyclin E (h)	Insulin Receptor (h)	Protein Kinase Bβ (h)	Protein Kinase Cι (h)
AMPKα1 (h)	CDK3/cyclin E (h)	LKB1 (h)	Protein Kinase Cα (h)	Protein Kinase Cμ (h)
CaMKIIβ (h)	CDK5/p25 (h)	Lyn (h)	Protein Kinase C βI (h)	Protein Kinase Cθ (h)
CaMKIIγ (h)	CDK5/p35 (h)	MAPK1 (h)	Protein Kinase C βII (h)	Protein Kinase Cζ (h)
CaMKIIδ (h)	CDK7/cyclin H/MAT1 (h)	MAPK2 (h)	Protein Kinase Cγ (h)	Protein Kinase G1α (h)
CaMKIV (h)	CDK9/cyclin T1 (h)	p70S6K (h)	Protein Kinase Cδ (h)	Protein Kinase G1β (h)
CDK1/cyclin B (h)	Flt3 (h)	PhKγ2 (h)	Protein Kinase Cε (h)	ROCK-II (h)
CDK2/cyclin A (h)	GSK3β (h)	Protein Kinase A (h)	Protein Kinase Cη (h)	SAPK2a (h)
Protein tyrosine phosphatase 1B (h)	T-cell protein tyrosine phosphatase (h)			

AMPKα1：AMP-activated protein kinase alpha 1、CaMKIIβ：calcium/calmodulin dependent protein kinase 2 beta、CaMKIIδ：calcium/calmodulin dependent protein kinase 2 delta、CaMKIIγ：calcium/calmodulin dependent protein kinase 2 gamma、CaMKIV：calcium/calmodulin dependent protein kinase 4、CDK1：cyclin-dependent kinase 1、CDK2：cyclin-dependent kinase 2、CDK3：cyclin-dependent kinase 3、CDK5：cyclin-dependent kinase 5、CDK7：cyclin-dependent kinase 7、CDK7/cyclin H/MAT1：complex also known as CAK or CDK-activating kinase complex、CDK9：cyclin-dependent kinase 9、GSK3β：glycogen synthase kinase 3 beta、h：human、LKB1：liver kinase B1, also known as serine/threonine kinase 11 (STK11)、Lyn：non-receptor tyrosine-protein kinase encoded by the *LYN* gene、MAPK：mitogen-activated protein kinase、p70S6K：ribosomal protein S6 kinase beta-1、PhKγ2：phosphorylase kinase catalytic subunit gamma 2、ROCK-II：rho-associated protein kinase 2、SAPK2a：p38 stress-activated protein kinase 2 alpha
[4.2.1.2.1: PD010]の測定対象を示した。

2.6.2.3.2　　In vivo での副次的薬理試験

ICH S7に記載されている主要な薬力学的作用については、効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験として実施しているため、MK-6482の in vivo での副次的薬理試験を実施しなかった。

2.6.2.4　　安全性薬理試験

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（ラット及びイヌ）及び13週間（イヌ）反復投与毒性試験（GLP）の一部として実施した（[表 2.6.2-9]参照）。心筋 IKr チャネルへの潜在的影響を in vitro hERG 試験（非 GLP 及び GLP）にて評価した[2.6.2.4.1.1 項][2.6.2.4.1.2 項]。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[2.6.2.4.1.5 項]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[2.6.2.4.1.4 項]。In vivo での心電図及び血圧に対する影響は、イヌを用いた毒性試験（28日間及び13週間、GLP）の中で評価した[2.6.2.4.1.3 項]。

MK-6482の hERG カリウム電流阻害に対する IC_{50}は、最高濃度（50 μM）での阻害が16.3%であったため算出されなかった。IC_{50}は50 μM 超と考えられた。この濃度は母集団薬物動態解析から算出したがん患者に120 mg QD 投与した際の定常状態の Cmax に相当する非結合型血漿中濃度（3.63 μM）の13.8倍を超える濃度であった。また、イヌを用いた毒性試験（28日間及び13週間、GLP）において、心電図パラメータ、QTc 間隔及び血圧に対する影響は認められなかった。In vivo

呼吸機能評価（プレチスモグラフィ測定）及び中枢神経系評価（FOB）でも被験物質に起因する影響はみられなかった。

すべての主要な安全性薬理試験は GLP の原則に準拠し、[redacted]（[redacted], USA）又は [redacted]（[redacted], Canada）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。

表 2.6.2-9　MK-6482 の安全性薬理試験（ICH S7A 及び S7B に準拠）

試験番号 (GLP 適用)	試験名	用量
TT #[redacted]-7857 (Non-GLP)	Effects of Two Test Articles on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells (HEK293)	1 and 10 µM
TT #[redacted]-7824 (GLP) (DEV-137)	Effect of PT2977 on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells	10 and 50 µM
TT #[redacted]-7821 (GLP) (DEV-136)	Dog Electrocardiography and Blood Pressure Evaluation from PT2977: A 28-Day Oral Gavage Toxicity Study Followed by a 28-Day and a 90-Day Recovery Periods in Beagle Dogs	1, 5, and 30 mg/kg per day
TT #[redacted]-7820 (GLP) (DEV-135)	FOB and Respiratory Function Evaluations from PT2977: A 28-Day Oral Gavage Toxicity Study Followed by a 28-Day and a 90-Day Recovery Periods in Sprague-Dawley Rats	6, 20, and 200 mg/kg per day
TT #[redacted]-7808 (GLP) (DEV-206)	Dog Electrocardiography and Blood Pressure Evaluation from PT2977: A 13-Week Oral Gavage Toxicity Study Followed by a 28-Day Recovery Periods in Beagle Dogs	1, 5, and 30 mg/kg per day

GLP：Good Laboratory Practice、ICH：International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、µM：micromolar
注：PT2977は MK-6482と同一

2.6.2.4.1　個別試験の概要

2.6.2.4.1.1　ヒト胎児腎細胞（HEK293）に発現させた hERG カリウムチャネルに対する MK-6482の影響

本非 GLP 試験では、哺乳類細胞に発現させた hERG カリウムチャネル［急速活性型心筋遅延整流カリウム電流（IKr）のサロゲート］に対する MK-6482の in vitro での影響を評価した。実験は自動パッチクランプシステムである QPatch HT®（Sophion Bioscience A/S, Denmark）を用い、室温条件下で評価を実施した。被験物質は1及び10 µM の濃度で評価した。各濃度につき3細胞（n=3）で評価を行い、各濃度への曝露時間は3分間とした（TT #[redacted]-7857、[2.6.3.1 項]参照）。

MK-6482は hERG 電流を1 µM で3.0±3.7%（平均値 ±SD、n=3）、10 µM で7.6±7.4%（平均値±SD、n=3）阻害した。

2.6.2.4.1.2　ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン hERG カリウムチャネルに対する PT2977（MK-6482）の影響

本 GLP 試験では、hERG チャネル［急速活性型心筋遅延整流カリウム電流（IKr）のサロゲート］に対する in vitro での MK-6482の影響を生理的温度に近い条件下で評価した（TT#[redacted]-7824、[2.6.3.1 項]参照）。

培養液中での MK-6482の安定性は、DFA 法バリデーション試験において確認した。試験期間中、投与液容器から均一性確認のための試料を採取した。

hERG チャネル安定発現細胞の電位を-80 mV に保持した。hERG カリウム電流の初期及び定常状態での MK-6482による阻害活性を固定振幅のパルスパターンにより評価した［コンディショニングプレパルスを+20 mV で1秒、再分極テストランプを-80 mV（-0.5 V/s）、5秒間隔で反復］。各測定の最後には、過剰な参照物質（E-4031、500 nM）を添加して内因性電流の寄与を評価した。残りの阻害されなかった電流はデータからオフラインでデジタル的に差し引き、MK-6482の hERG チャネル阻害活性を算出した。

MK-6482は10及び50 µM の濃度で3細胞（n=3）を用いて評価した。テストランプ間にピーク電流を測定した。MK-6482又は陽性対照物質を添加するまでに定常状態を少なくとも20秒間維持し、新たな定常状態に達するまでピーク電流の測定を行った。

試料分析の結果から、試験開始時のすべての試験溶液の均一性が確認された。灌流装置の流出口から採取した MK-6482試験溶液を濃度確認のため分析した結果、濃度を測定したすべての試料で MK-6482濃度は名目濃度の ±15%（相対誤差 ±15%）の範囲内であり、判定基準を満たしていた。

陽性対象物質（テルフェナジン60 nM）は hERG カリウム電流を85.2 ± 3.6%（平均値 ±SD、n=2）阻害した。この結果により本試験系の hERG 阻害に対する感受性が確認された。

MK-6482による hERG 電流阻害は、10 µM（n=3）では6.7 ± 2.0%（平均値 ±SEM）、50 µM（n=3）では16.3 ± 0.4%であったが、溶媒対照（n=3）では0.0 ± 0.6 %であった。溶媒対照と比較した際の10及び50 µM での hERG 阻害は統計学的に有意（P<0.05）であった。より高濃度では MK-6482が本試験系の溶媒に溶解しなかったため、試験濃度は2濃度のみで実施した。試験を行った最高濃度での阻害が16.3%であったため、MK-6482の hERG カリウム電流阻害に対する IC_{50}は算出できなかった。IC_{50}は50 µM 超と考えられた。本 in vitro 試験で検討された MK-6482の濃度は、臨床試験において腎細胞癌患者に臨床推奨用量（120 mg QD）を投与した際の非結合型 Cmax の約13.8倍であった。したがって、臨床用量である120 mg QD での QTc 間隔延長リスクはないと考えられる。

2.6.2.4.1.3 イヌに MK-6482を投与した際の心電図及び血圧評価：ビーグル犬を用いた28日間及び13週間反復経口投与毒性試験［28日間及び90日間（28日間試験のみ）の回復期間を含む］

MK-6482をビーグル犬に28日間又は13週間経口投与した際の心血管系への影響を評価するため、本 GLP 試験を実施した（TT #[redacted]-7821及び TT #[redacted]-7808、[2.6.3.1 項]参照）。

心血管系データはイヌを用いた28日間及び13週間反復経口投与毒性試験のデータを用いた。試験方法及びその他の試験結果は[2.6.6.3.7 項]及び[2.6.6.3.8 項]に詳細を述べる。

[2.6.6.3.7 項]及び[2.6.6.3.8 項]に示した一般的な試験デザインに従い、28日間及び13週間試験のいずれも MK-6482（1、5及び30 mg/kg/日）又は媒体［0.5%（w/v）メチルセルロース、0.5% Tween 80 水溶液］を1日1回、28日間及び13週間投与した。心電図（双極肢誘導 I、II、III、及び増高単極誘導 aVR、aVL、aVF）は投与開始前に1回、並びに28日間試験の試験4週及び13週間試験の試験13週に1回測定した。心電図波形の定性的及び定量的評価は、心臓の電気的障害を示唆する肉眼的変化の有無、並びに心拍（第II誘導）、洞調律、房室調律及び伝導性の異常の有無を評価するために実施した。血圧（収縮期、拡張期、平均動脈圧及び心拍数）測定はすべての動物で実施した。血圧はイヌの尾に新生児用カフを装着して計測した。

ビーグル犬に MK-6482を28日間又は13週間、最大30 mg/kg/日までの用量で投与したところ、投与前のベースライン又は対照群と比較して心電図、QTc 間隔及び血圧に対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.1.4 ラットに MK-6482を投与した際の呼吸機能評価：SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）

MK-6482を SD ラットに28日間経口投与した際の呼吸系への影響を評価するため、本 GLP 試験を実施した（TT #[redacted]-7820、[2.6.3.1 項]参照）。

呼吸機能データはラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験のデータを用いた。本試験の試験方法及びその他の試験結果は[2.6.6.3.4 項]に詳細を述べる。

[2.6.6.3.4 項]に示した試験デザインに従い、MK-6482又は媒体を1日2回（12時間 ± 30分間隔）28日間経口投与した。MK-6482の用量は3、10及び100 mg/kg BID（6、20及び200 mg/kg/日）とした。呼吸モニタリングシステムに接続したプレチスモグラフィチャンバーを用いて、試験1日に覚醒下で主試験群の雌ラット（8匹／群）の呼吸機能評価を実施した。投与前の呼吸ベースラインデータを取得するため、初回投与前に動物をプレチスモグラフチャンバーに少なくとも1.5時間以上保持し、呼吸モニタリングデータは少なくとも投与の1時間以上前から連続して記録した。その後、動物をチャンバーから取り出し試験1日の初回投与を実施した。

投与直後、並びに投与約3.5及び22.5時間後（試験1日の初回投与から起算）に、動物をプレチスモグラフチャンバーに入れ、さらに少なくとも0.5時間の順化期間及び1時間以上の呼吸モニタリ

ング期間を設け、データを少なくとも1時間以上連続して記録した。呼吸機能モニタリングが何らかの理由で中断した際は、中断時間がデータ収集システムに記録された。各呼吸モニタリング期間では、少なくとも投与前1時間以上並びに初回投与後1、4及び23時間の呼吸データを5分間ごとの平均として記録した（モニタリング時間は各1時間）。呼吸パラメータは一回換気量、分時換気量及び呼吸数を測定した。

投与前の呼吸データ解析では統計学的有意差は認められなかった。投与前の呼吸データからすべての雌動物は正常な呼吸機能を有しており、試験での使用が適切であることが確認された。

試験1日の初回投与から1時間後、4から5時間後及び23から24時間後の呼吸データ解析（ベースラインからの変化率）からは、対照群の雌動物と比較した際、MK-6482を経口投与［低用量（6 mg/kg/日）、中用量（20 mg/kg/日）及び高用量（200 mg/kg/日）］した動物の呼吸パラメータに影響はみられなかった。個体別の呼吸データ解析からも MK-6482投与による変化は認められなかった。

初回投与から1時間後の一回換気量に ANOVA 検定で統計学的な有意差がみられたが、追加の Dunnett 検定では対照群といずれの投与群にも有意差はみられなかった。各投与群でみられたその他の呼吸パラメータの変動（一部で統計学的に有意な差を含む）は、いずれも偶発的又は本モデルにおける正常な変動の範囲内の変化と考えられた（ANOVA 検定による投与前の呼吸数及び分時換気量における経時的影響、並びに初回投与後1時間の3種の呼吸パラメータにおける経時的影響を含む）。

MK-6482を最大100 mg/kg BID（200 mg/kg/日）までの用量で雌 SD ラットに投与した際（試験1日）、呼吸機能への影響は認められなかった。

2.6.2.4.1.5　ラットに MK-6482を投与した際の FOB：SD ラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験（28日間及び90日間の回復期間を含む）

MK-6482を SD ラットに28日間経口投与した際の中枢神経系への影響を評価するため、本 GLP 試験を実施した（TT #[redacted]-7820、[2.6.3.1 項]参照）。

FOB データはラットを用いた28日間反復経口投与毒性試験のデータを用いた。本試験の試験方法及びその他の試験結果は[2.6.6.3.4 項]に詳細を述べる。

[2.6.6.3.4 項]に示した試験デザインに従い、MK-6482又は媒体を1日2回（12時間 ± 30分間隔）28日間経口投与した。MK-6482の用量は3、10及び100 mg/kg BID（6、20及び200 mg/kg/日）とした。FOB（一連の行動観察）は毒性試験群のすべての雄を対象に4時点［投与前（投与開始より3日前まで）、並びに試験21日の1回目投与から約1、4及び23時間後］で評価を行った。すべての観察は FOB のトレーニングを受けた適格性を有する技術者によって実施された。技術者は観察する動物の用量について盲検下で評価を実施した（動物は到着番号のみで識別）。FOB は、別の動物室の静かな環境下で実施された。雄動物の一般行動を観察し、投与前及び同時対照群の雄（Group 1）の観察結果と比較した。

MK-6482に関連した定性的及び定量的なFOBの変化は、いずれのパラメータにも認められなかった。MK-6482を投与した動物でいくつかのパラメータの変化がみられたが、いずれも軽度及び／又は用量依存性のないものであり、対照群でも認められたことから、実験ラットでみられる通常の生物学的変動を反映していると考えられた。

MK-6482を最大100 mg/kg BID（200 mg/kg/日）までの用量で雄ラットに投与した際（試験21日）、FOBへの影響は認められなかった。

2.6.2.5　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。

2.6.2.6　考察及び結論

MK-6482はHIF-2αの転写因子としての機能を抑制し、癌細胞での低酸素性シグナル伝達を阻害する低分子化合物である。効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の結果、MK-6482は選択的なHIF-2α阻害薬であり、心血管系、中枢神経系及び呼吸系の評価では安全性は許容可能であると考えられた。

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。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SPA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細胞のHREによるルシフェラーゼの発現及びVEGFa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RT-qPCRで測定したHIF-2αの標的遺伝子*CCND1*、*SERPINE1*、*VEGFA*及び*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HIF-2αとARNTの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のヘテロ二量体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。

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の投与により、試験したいずれの用量でも腫瘍の退縮が認められた。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、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は選択的な HIF-2α の阻害薬であることが示された。さらに、MK-6482による HIF-2α の阻害は、*VHL* 欠損 ccRCC 腫瘍マウスモデルの治療に有効であることが確認された。

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）まで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 の濃度で阻害作用を示さなかった。

MK-6482の重要な器官系に対する潜在的な影響について、複数の安全性薬理試験（独立した試験又は GLP に準拠した28日間及び13週間反復投与毒性試験の一部）で評価した。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 AUC0-24hr 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。

効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験により、散発性の ccRCC、並びに VHL 病に伴う限局性 RCC 及び RCC 以外の腫瘍を含む HIF-2α シグナルの制御異常を有する腫瘍患者での MK-6482の臨床使用を支持する成績が得られた。

2.6.2.7　図表

図及び表を本文中の該当箇所に挿入した。

2.6.2.8　参考文献

参考文献を[1.12 項]の「4.3参考文献」に示した。