目次

表一覧
図一覧
略号及び用語の定義
2.6.4　薬物動態試験の概要文
2.6.4.1　まとめ
2.6.4.2　分析法
2.6.4.2.1　生体試料中での MK-6482の定量
2.6.4.2.2　総放射能の測定及び代謝物プロファイリング
2.6.4.3　吸収
2.6.4.3.1　マウス
2.6.4.3.1.1　雄の CD-1マウス又は SCID マウスに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態
2.6.4.3.2　ラット
2.6.4.3.2.1　雄の Sprague Dawley ラットに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態
2.6.4.3.3　イヌ
2.6.4.3.3.1　絶食下の雄のビーグル犬に MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態
2.6.4.3.4　サル
2.6.4.3.4.1　絶食下の雄のカニクイザルに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態
2.6.4.4　分布
2.6.4.4.1　ラットにおける組織分布
2.6.4.4.2　ラット及びウサギにおける胎盤通過性
2.6.4.4.3　血漿蛋白結合
2.6.4.4.4　In vitro での血液－血漿分配
2.6.4.5　代謝
2.6.4.5.1　In vivo 代謝
2.6.4.5.2　In vitro 代謝
2.6.4.6　排泄
2.6.4.6.1　ラット
2.6.4.6.2　イヌ
2.6.4.6.3　サル
2.6.4.6.4　ラットにおける乳汁移行
2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用
2.6.4.7.1　MK-6482の消失に関与する薬物代謝酵素及びトランスポーター
2.6.4.7.1.1　薬物代謝酵素

2.6.4.7.1.2　トランスポーター
2.6.4.7.2　薬物代謝酵素及びトランスポーターの阻害
2.6.4.7.2.1　薬物代謝酵素の阻害
2.6.4.7.2.2　トランスポーターの阻害
2.6.4.7.3　薬物代謝酵素の誘導
2.6.4.8　その他の薬物動態試験
2.6.4.8.1　胆汁酸塩排出ポンプに対する MK-6482及び PT3317の阻害
2.6.4.9　考察及び結論
2.6.4.10　参考文献

表一覧

表 2.6.4-1　マウスに MK-6482単回静脈内及び経口投与した際の薬物動態
表 2.6.4-2　Sprague Dawley ラットに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態パラメータ
表 2.6.4-3　雄の Sprague Dawley ラットに MK-6482を3、10、30、100又は300 mg/kg の用量で食後に単回経口投与した際の薬物動態パラメータ
表 2.6.4-4　イヌに MK-6482単回静脈内ボーラス及び経口投与した際の薬物動態
表 2.6.4-5　イヌに MK-6482を異なる用量及び製剤で経口投与した際の薬物動態パラメータ
表 2.6.4-6　サルに MK-6482単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態
表 2.6.4-7　In vitro における異なる動物種での MK-6482及び PT3317の可逆的な血漿蛋白結合
表 2.6.4-8　各動物種における MK-6482の in vitro での血液／血漿濃度比
表 2.6.4-9　無処置ラット及び胆管カニューレを施したラットに[^{14}C]-MK-6482を単回経口投与した際の放射能排泄率
表 2.6.4-10　種々の取込みトランスポーターに対する MK-6482の阻害作用
表 2.6.4-11　排出トランスポーターに対する MK-6482の阻害作用

図一覧

図 2.6.4-1　　In vitro 及び in vivo での MK-6482の代謝物の推定化学構造式

略号及び用語の定義

略号	定義	
AUC	Area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the plasma concentration curve from time zero to twenty-four 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
$AUC_{0\text{-}inf}$	Area under the plasma concentration curve from time zero to infinity	投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
BDC	Bile duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BID	Twice daily	1 日 2 回
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CL_p	Plasma clearance	血漿クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
$C_{max,u}$	Unbound maximum plasma concentration	非結合型の最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
DMA	Dimethylacetamide	ジメチルアセトアミド
EC_{50}	Half-maximal effective concentration	50%効果濃度
EM	Extensive metabolizer	－
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
E_{max}	Maximum effect	最大効果
ESI	Electrospray ionization	エレクトロスプレーイオン化
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基準
h	Hour(s)	時間
HIF	Hypoxia-inducible factor	低酸素誘導因子
HRMS	High resolution mass spectrometry	高分解能質量分析
IC_{50}	Half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
I_{gut}	Theoretical maximum gastrointestinal drug concentration	消化管内最高濃度の理論値
$I_{in,max,u}$	Maximum unbound hepatic inlet concentration	肝臓入口における非結合型最高濃度
IM	Intermediate metabolizer	－
IV	Intravenous	静脈内
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry	液体クロマトグラフィー・質量分析
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
LE	Long Evans	－
LLC-PK1	Lilly Laboratory Cell-Porcine Renal Epithelial cell	ブタ腎臓近位尿細管由来上皮細胞
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
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney Cells II	イヌ腎臓尿細管上皮細胞 II
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1	多剤耐性蛋白 1
min	Minutes	分
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRP	Multidrug Resistance-Associated Protein	多剤耐性関連蛋白質
NA	Not applicable	該当なし
NMR	Nuclear magnetic resonance	核磁気共鳴
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

略号	定義	
OCT	Organic Cation Transporter	有機カチオントランスポーター
P_{app}	Apparent Permeability Coefficient	見かけの透過係数
PBPK	Physiologically based pharmacokinetic (model)	生理学的薬物速度論（モデル）
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	Pharmacokinetic(s)	薬物動態
PM	Poor metabolizer	－
QD	Once daily	1 日 1 回
QWBA	Quantitative Whole-body Autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RCC	Renal cell carcinoma	腎細胞癌
SCID	Severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全症
SD	Sprague Dawley	－
[redacted]	[redacted]	[redacted]
Sf9	Spodoptera frugiperda (cells)	－
$t_{1/2}$	Terminal half-life	終末相半減期
T_{max}	Time at maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
UGT	Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase	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
VHL	Von Hippel Lindau	－

2.6.4　薬物動態試験の概要文

2.6.4.1　まとめ

MK-6482（別名：PT2977、一般名：ベルズチファン）は、RCC、膵内分泌腫瘍及び中枢神経系血管芽腫等の腫瘍を有する VHL 病成人患者、並びに免疫チェックポイント阻害剤及び抗血管新生療法による前治療歴を有する進行 RCC 成人患者の治療に用いる選択的 HIF-2α 阻害剤である。MK-6482の臨床推奨用法・用量は、120 mg QD であり、投与経路は経口投与である。本項では、マウス、ラット、イヌ及びサルにおける MK-6482の吸収、分布、代謝及び排泄について述べる。また 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種とヒトとを比較し考察する。さらに、MK-6482が種々の薬物代謝酵素及び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試験概要表に示す[2.6.5.1 項]。

非臨床動物種において、MK-6482を静脈内投与した際の CL_p は1.35（イヌ）～36.2 mL/min/kg（ラット）と低～中程度、Vd_{ss} は1.3～4.9 L/kg と中程度、$t_{1/2}$は1（ラット）～10時間（サル）であり中程度であった。ラットにおける $t_{1/2}$が短いことから、GLP 適用の28日間及び13週間反復投与毒性試験では BID 投与を選択した。

経口バイオアベイラビリティはラットでは低く（18%）、イヌ及びサルでは中程度（それぞれ33%及び53%）、マウスでは高かった（約100%）。GLP 適用の28日間及び13週間反復投与毒性試験では、期待する曝露量に到達し、かつ反復投与に適する溶媒として、0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80水溶液を選択した。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。0.5%MC/0.1%HPMCAS-HF/20 mM TRIS pH 7.2を用いた MK-6482の[redacted]処方としたところ、より高い曝露量が得られた[2.6.6.3 項]。この結果に基づき、この処方が CByB6F1/Tg rasH2ヘミ接合マウスを用いた28日間反復経口投与毒性試験で使用された。イヌにおける MK-6482の曝露量の増加は1～100 mg/kg の用量範囲で用量比を下回った。ラット及びイヌのいずれにおいても、MK-6482の薬物動態に性差は認められなかった[2.6.6.3 項]。

ラットを用いた QWBA 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、広範かつ可逆的に分布した。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。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。

ラットでは、MK-6482は主に代謝により消失し、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。薬物由来物質は主に胆汁中及び糞中に排泄され、放射能総排泄率の平均値は投与量の93.9%～97.1%であった。ヒト in vitro では、MK-6482は主に UGT2B17によるグルクロン酸抱合化及び CYP2C19による酸化的代謝を介

して代謝され、わずかに CYP3A4による代謝も寄与していた。また、ヒト血漿中での代謝物として、MK-6482の *O*-グルクロン酸抱合体（PT3317又は M16、以下 PT3317）が検出された（総放射能の約9%）。PT3317の毒性はイヌにおいて GLP 適用毒性試験で評価した。また、PT3317は HIF-2α に対する薬理活性を示さなかった。なお、ヒトの排泄物中及び血漿中に検出されたすべての代謝物は、ラット及び／又はイヌにおいても認められた。

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並びに 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母集団薬物動態解析を実施した[2.7.2.3 項]。UGT2B17又は CYP2C19の PM では酵素活性を有しない。ただし臨床試験結果及びリスク・ベネフィットプロファイルより、これらの酵素の遺伝子多型に基づく用量調節は必要ない。本解析結果により、理論的には UGT2B17又は CYP2C19の阻害剤が最大の酵素阻害作用を示したとしても UGT2B17及び CYP2C19が PM である被験者の曝露量を上回ることはないと考えられることから、UGT2B17又は CYP2C19の阻害剤と MK-6482を併用投与したとしても、MK-6482に対して臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低い。

MK-6482は高い膜透過性を示し、ヒト排出トランスポーターである P-gp の弱い基質である。ヒトに[^{14}C]-MK-6482を経口投与した際（008試験）、糞中で検出された未変化体はごく微量であったことから、P-gp は MK-6482の吸収を制限しないことが示唆された。また、MK-6482は取込みトランスポーターである OATP1B1及び OATP1B3の弱い基質であるが、ヒト肝細胞では能動的な取込みは認められなかったことから、MK-6482の肝細胞への取込みの重要な経路ではないことが示唆された。

In vitro 試験において、MK-6482及びそのグルクロン酸抱合体である PT3317は、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6及び3A4/5を含む主なヒト CYP 分子種に対して阻害作用を示さなかった。同様に、MK-6482及びそのグルクロン酸抱合体である PT3317は、UGT 分子種である UGT1A1、1A4、1A6、1A9、2B7及び2B17を阻害しなかった。ヒト肝細胞では、MK-6482（30 μM まで）は CYP1A2及び CYP2B6に対する誘導作用を示さなかったが、MK-6482は濃度依存的に CYP3A4の mRNA 発現量を増加させた。MK-6482がミダゾラムの薬物動態に及ぼす影響を評価した臨床薬物相互作用試験（009試験）の結果から、MK-6482は弱い CYP3A4誘導剤に分類されることが示唆された。PBPK モデル解析の結果より、MK-6482の血漿中曝露量が高い患者（UGT2B17及び CYP2C19の PM 患者等）において、中程度の CYP3A4の誘導作用を示す可能性がある[2.7.2.3 項]。

ヒト薬物トランスポーターである P-gp、BCRP、BSEP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1及び MATE2-K に対する MK-6482及び PT3317の阻害作用を評価した。FDA 及び本邦の薬物相互作用ガイドラインに基づき、MK-6482は、MATE2-K を除き、臨床用量である120 mg［非結合型最高濃度（$C_{max,u}$）：2.6 μM、肝臓入口における非結合型最高濃度（$I_{in,max,u}$）：14.7 μM］でこれらのトランスポーターを阻害する可能性は低いと考えられた[2.6.5.23 項] [2.6.5.25 項]。MATE2-K の基質は MATE1及び OCT2の基質になり得ること、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。さらに、文献に基づくと、MATE2-K 阻害薬と併用した場合、MATE2-K の基質の曝露量の増加は一般的に2倍未満である[4.3: 058R6J]。

以上より、MK-6482は、臨床用量での曝露量では、主要な CYP 酵素、UGT 酵素又は薬物トランスポーターの阻害薬として薬物相互作用を惹起する可能性は低いと考えられる。また、MK-6482は CYP3A4に対して弱い誘導作用、MK-6482の曝露量が高い患者においては中程度の誘導作用を示すが、CYP1A2及び CYP2B6に対しては誘導作用を示さないと考えられる。

2.6.4.2　分析法

2.6.4.2.1　生体試料中での MK-6482の定量

血漿中の MK-6482及び主な代謝物である *O*-グルクロン酸抱合体（PT3317）の測定には、LC-MS/MS 法を用いた。この分析法では、自動化された96ウェルプレートを用いた液－液抽出により血漿から薬物を抽出した。MK-6482、PT3317及び2種類の内標準物質（$^{13}C^{15}ND_3$-MK-6482及び $^{13}C^{15}ND_3$-PT3317）を逆相クロマトグラフィーで分離した後、ネガティブイオンモードで ESI 法を用いたタンデム質量分析法により検出した。GLP 適用試験で使用したラット、イヌ及びウサギ血漿中の MK-6482及び PT3317の生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションは、試験実施時点で有効な規制当局のガイダンスに準拠した。また、GLP に準拠して試料を分析した[2.6.5.2 項]。

LC-MS/MS 法を用いて、ラット、イヌ及びウサギ血漿中の MK-6482及び PT3317濃度を測定した。バリデートされた分析法の定量範囲は、ラット及びウサギ血漿において MK-6482では12.5～5,000 ng/mL、PT3317では2.50～1,000 ng/mL であり、イヌ血漿おいて MK-6482では20.0～20,000 ng/mL、PT3317では5.00～5,000 ng/mL であった[2.6.5.3 項]。

非臨床動物種での分析法の真度及び精度を[2.6.5.3 項]に要約する。

2.6.4.2.2　総放射能の測定及び代謝物プロファイリング

代謝及び排泄試験では、血漿中、尿中、糞中及び胆汁中に排泄された総放射能を LSC 法を用いて測定した。血漿中、尿中、糞中及び胆汁中の代謝物は逆相クロマトグラフィーにより分離された。In vivo 及び in vitro 試験では、MK-6482及びその代謝物は HRMS 法及び放射能検出器により検出された。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された[2.6.5.11 項] [2.6.5.12 項] [2.6.5.14 項]。PT3317はヒト循環血中に存在する MK-6482の代謝物であり、MK-6482を経口投与したイヌ尿試料中から分離された。LC-MS 法及び NMR スペクトルデータから、PT3317の構造は MK-6482の *O*-グルクロン酸抱合体であることが明らかになった[図 2.6.4-1]。PT3317の標品を化学合成することで、さらに構造を確認した。

2.6.4.3　吸収

2.6.4.3.1　マウス

2.6.4.3.1.1　雄の CD-1マウス又は SCID マウスに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態

CD-1マウス及び SCID マウスを用いて薬物動態試験を実施し、当該動物種における食後の薬物動態を評価した。静脈内及び経口投与後の薬物動態パラメータを[表 2.6.4-1]及び[2.6.5.4 項]に示す。雄の CD-1マウスに MK-6482を3 mg/kg の用量で単回静脈内投与した際、CL_p は21.05 mL/min/kg、Vd_{ss} は4.9 L/kg と中程度であり、$t_{1/2}$は4時間であった。MK-6482を10 mg/kg の用量で単回経口投与後、速やか、かつ良好な吸収が認められ、T_{max} は0.5時間、バイオアベイラビリティは、ほぼ100%であった。

雄の SCID マウスを用いて、薬理学的作用を示す用量である1又は10 mg/kg を単回経口投与する薬物動態試験を実施した[2.6.5.4 項]。その結果を[表 2.6.4-1]に示す。MK-6482の吸収は速やかであり、T_{max} は0.5～1.0時間であった。MK-6482の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}inf}$ は用量に伴い増加したが、用量比を下回った。

表 2.6.4-1　マウスに MK-6482 単回静脈内及び経口投与した際の薬物動態

動物種／系統	マウス／CD-1		マウス／SCID	
投与経路	IV	P.O.	P.O.	P.O.
用量（mg/kg）	3	10	1	10
PK パラメータ				
CL_p (mL/min/kg)	21.05	NA	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	4.94	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	4.00	5.37	2.67	2.90
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	2.37	14.01	1.98	8.16
$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose (kg·h/L)	0.79	1.40	1.98	0.82
C_{max} (μg/mL)	NA	1.38	0.31	1.17
C_{max}/Dose (kg/L)	NA	0.14	0.31	0.12
T_{max} (h)	NA	0.5	0.5	1.0
バイオアベイラビリティ（%）	NA	>100	NC	NC

SCID：重症複合免疫不全、IV：静脈内、P.O.：経口、h：時間、PK：薬物動態、CL_p：血漿クリアランス、Vd_{ss}：定常状態における分布容積、$t_{1/2}$：終末相半減期、$AUC_{0\text{-}inf}$：投与後0時間から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose：用量で補正した AUC、C_{max}：最高濃度、C_{max}/Dose：用量で補正した C_{max}、T_{max}：最高濃度到達時間、NA：該当なし、NC：算出せず
血漿は終末期の出血から採取した（各時点3例）。PK パラメータは平均血漿中濃度―時間プロファイルから算出した。そのため標準偏差は算出できなかった。

[2.6.5.4 項]

2.6.4.3.2　ラット

2.6.4.3.2.1　雄の Sprague Dawley ラットに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態

ラットにおける MK-6482の薬物動態パラメータを[表 2.6.4-2]及び[2.6.5.5.1 項]に示す。MK-6482を1又は2 mg/kg を静脈内投与した際、MK-6482の CL_p（16.4～36.2 mL/min/kg）及び Vd_{ss}（1.3～2.1 L/kg）は中程度であり、$t_{1/2}$は1.1～1.4時間であった。MK-6482の懸濁液を10 mg/kg の用量で経

口投与した際、MK-6482は速やかに吸収され、静脈内投与した結果と比べた際の経口バイオアベイラビリティは17.5%であった。次に懸濁液ではなく、MK-6482の溶液として投与したところ、吸収量は改善し、同様に吸収は速やかであった。すなわち MK-6482を溶液として投与した際の $AUC_{0\text{-}inf}$ は懸濁液と比べて55%高く、溶媒に対する MK-6482の溶解性は、ラットにおけるバイオアベイラビリティに影響を及ぼすことが示唆された。溶液製剤ではより高い曝露量が得られており、反復投与に適する溶媒を検討した結果、0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80 (w/v)を含有する水溶液を選択した。

表 2.6.4-2　Sprague Dawley ラットに MK-6482 を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態パラメータ

投与経路	IV[a]	IV[b]	P.O.[c]	P.O.[d]
用量（mg/kg）	1	2	10	10
PK パラメータ				
CL_p (mL/min/kg)	16.38	36.17	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	1.27	2.09	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	1.09	1.40	5.30	1.41
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	1.02	0.93	1.78	2.76
$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose (kg·h/L)	1.02	0.46	0.18	0.28
C_{max} (μg/mL)	NA	NA	0.28	0.57
C_{max}/Dose (kg/L)	NA	NA	0.03	0.06
T_{max} (h)	NA	NA	1.33	0.67
バイオアベイラビリティ（%）	NA	NA	17.5	NC

[a] 10%ジメチルアセトアミド、10%エタノール、40%ポリエチレングリコール400、40% H_2O (v/v/v/v)
[b] 20%エタノール、40% PEG 400、40% H_2O (v/v/v)
[c] 10%エタノール、30% PEG 400、60%（0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80 (w/v)）
[d] 10%ジメチルアセトアミド、60% PEG 400、30% H_2O (v/v/v)
IV：静脈内、P.O.：経口、h：時間、PK：薬物動態、CL_p：血漿クリアランス、Vd_{ss}：定常状態における分布容積、$t_{1/2}$：終末相半減期、$AUC_{0\text{-}inf}$：投与後0時間から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose：用量で補正した AUC、C_{max}：最高濃度、C_{max}/Dose：用量で補正した C_{max}、T_{max}：最高濃度到達時間、NA：該当なし、NC：算出せず

[2.6.5.5.1 項]

雄の SD ラットに MK-6482を3～300 mg/kg の用量範囲で食後投与した際の用量に伴う MK-6482の曝露量の増加を評価した。溶媒は0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80 (w/v)水溶液とした。$AUC_{0\text{-}inf}$ は3～30 mg/kg で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[表 2.6.4-3] [2.6.5.5.2 項]。

表 2.6.4-3　雄の Sprague Dawley ラットに MK-6482 を 3、10、30、100 又は 300 mg/kg の用量で食後に単回経口投与した際の薬物動態パラメータ

用量（mg/kg）	3	10	30	100	300
検体	血漿	血漿	血漿	血漿	血漿
PK パラメータ					
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	0.57	2.06	5.94	10.21	22.73
$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose (kg·h/L)	0.19	0.21	0.20	0.10	0.08
C_{max} (μg/mL)	0.13	0.34	0.66	0.87	2.01
C_{max}/Dose (kg/L)	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01
$t_{1/2}$ (h)	2.47	3.62	4.68	4.34	5.12
T_{max} (h)	0.67	1.00	1.33	1.67	1.00

h：時間、PK：薬物動態、$t_{1/2}$：終末相半減期、$AUC_{0\text{-}inf}$：投与後0時間から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose：用量で補正した AUC、C_{max}：最高濃度、C_{max}/Dose：用量で補正した C_{max}、T_{max}：最高濃度到達時間
数値は薬物動態パラメータの平均値。

[2.6.5.5.2 項]

0.5%MC/0.1%HPMCAS-HF/20 mM TRIS pH 7.2を用いた MK-6482の[redacted]処方では、より高い曝露量が得られたことから、ラット及びマウスを用いた試験において、この処方が用いられた[2.6.6.3 項]。

2.6.4.3.3　イヌ

2.6.4.3.3.1　絶食下の雄のビーグル犬に MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態

イヌにおける MK-6482の薬物動態パラメータを[表 2.6.4-4]及び[2.6.5.6.1 項]及びに示す。MK-6482を1 mg/kg 静脈内投与した際、MK-6482の CL_p（1.35 mL/min/kg）は低く、Vd_{ss}（1.8 L/kg）は中程度、また $t_{1/2}$は約9.7時間であった。0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80 (w/v)水溶液を溶媒として用いた MK-6482 5 mg/kg を経口投与した際、MK-6482の経口バイオアベイラビリティは33%で、吸収の割合は中程度であった。

表 2.6.4-4　　イヌに MK-6482 単回静脈内ボーラス及び経口投与した際の薬物動態

投与方法	IV	P.O.
用量（mg/kg）	1	5
PK パラメータ		
CL_p (mL/min/kg)	1.35	NA
Vd_{ss} (L/kg)	1.81	NA
$t_{1/2}$ (h)	9.65	17.20
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	12.25	25.29
$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose (kg･h/L)	12.25	5.06
C_{max} (μg/mL)	NA	1.51
C_{max}/Dose (kg/L)	NA	0.30
T_{max} (h)	NA	2
バイオアベイラビリティ（%）	NA	33

IV：静脈内、P.O.：経口、PK：薬物動態、$AUC_{0\text{-}inf}$：投与後0時間から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose：用量で補正した AUC、CL_p：血漿クリアランス、Vd_{ss}：定常状態における分布容積、$t_{1/2}$：終末相半減期、C_{max}：最高濃度、C_{max}/Dose：用量で補正した C_{max}、T_{max}：最高濃度到達時間、h：時間、NA：該当なし
数値は平均値（n＝3）。

[2.6.5.6.1 項]

絶食下の雄のビーグル犬を用いて、[表 2.6.4-5]に示した製剤及び用量が MK-6482の曝露量に及ぼす製剤の影響を評価した[2.6.5.6.2 項] [2.6.5.6.3 項]。これらの試験からも、溶媒に対するMK-6482の溶解度及び溶解速度は、バイオアベイラビリティに影響を及ぼすことが示され、溶媒組成比として、10% DMA、60% PEG 400及び30%水(v/v)に溶解して投与した際の曝露量が最も高かった。0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80水溶液(w/v)を溶媒として用いた試験では、1～100 mg/kg の用量範囲で、投与量の増加に応じた曝露量の増加は用量比を下回ったものの[2.6.5.6.1 項]、期待する曝露量に到達可能で、反復投与が可能であることから、毒性試験では0.5%メチルセルロース及び0.5% Tween 80水溶液(w/v)を溶媒として選択した。

表 2.6.4-5　　イヌに MK-6482 を異なる用量及び製剤で経口投与した際の薬物動態パラメータ

用量 (MPK)	製剤	食餌	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	C_{max}/Dose (kg/L)	$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose (kg·h/L)
5	0.5%メチルセルロース、0.5% Tween 80水溶液(w/v)	絶食	1.51	25.29	0.30	5.06
1	0.5%メチルセルロース、0.5% Tween 80水溶液(w/v)	絶食	0.36	10.91	0.36	10.91
10		絶食	1.41	32.09	0.14	3.21
30		絶食	2.15	67.09	0.07	2.24
100		絶食	3.29	109.11	0.03	1.09
5	0.5%メチルセルロース、0.5% Tween 80水溶液(w/v)（微粉子化）	絶食	1.22	20.69	0.24	4.14
30		絶食	3.37	70.62	0.11	2.35
10	10% DMA 60% PEG 400及び30%水(v/v)	絶食	6.0	130.5	0.60	13.05
5	MK-6482[redacted]（1%メチルセルロース及び1% Tween 80水溶液(w/v)懸濁液）	絶食	3.8	54.3	0.76	10.86
5	MK-6482[redacted]（1%メチルセルロース及び1% Tween 80水溶液(w/v)懸濁液）	絶食	3.9	58.3	0.78	11.66
53 mg／イヌ	[redacted]	絶食	1.2	33.5	NC	NC
40 mg／イヌ	錠剤：F1製剤[a]	絶食	3.51	51.0	NC	NC
40 mg／イヌ	錠剤：F3製剤[b]	絶食	2.48	47.7	NC	NC

MPK：mg/kg、DMA：ジメチルアセトアミド、PEG：ポリエチレングリコール、[redacted]、NC：算出せず、$AUC_{0\text{-}inf}$：投与後0時間から無限大までの濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高濃度
数値は平均値。
[a] F1製剤：[redacted]。
[b] F3製剤：[redacted]。

[2.6.5.6.1 項] [2.6.5.6.2 項] [2.6.5.6.3 項]

2.6.4.3.4　サル

2.6.4.3.4.1　絶食下の雄のカニクイザルに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態

絶食下の雄のカニクイザルに MK-6482を単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態パラメータを[表 2.6.4-6] [2.6.5.7 項]に示す。サルにおける MK-6482の CL_p は3.7 mL/min/kg と低く、Vd_{ss} は2.9 L/kg と中程度であり、$t_{1/2}$は10時間であった。T_{max} の平均値は5.3時間であり、吸収は緩徐であることが示唆された。経口バイオアベイラビリティは52.5%であり、吸収の割合は中程度であった。

表 2.6.4-6　サルに MK-6482 単回静脈内又は経口投与した際の薬物動態

投与方法	IV	P.O.
用量（mg/kg）	1	5
PK パラメータ		
CL_p (mL/min/kg)	3.7	NA
Vd_{ss} (L/kg)	2.93	NA
$t_{1/2}$ (h)	10.4	5.9
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	4.6	12.0
$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose (kg·h/L)	4.6	2.4
C_{max} (μg/mL)	NA	0.9
T_{max} (h)	NA	5.3
バイオアベイラビリティ（%）	NA	52.5

IV：静脈内、P.O.：経口、h：時間、CL_p：血漿クリアランス、Vd_{ss}：定常状態における分布容積、$t_{1/2}$：終末相半減期、$AUC_{0\text{-}inf}$：投与後0時間から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}inf}$/Dose：用量に補正した AUC、C_{max}：最高濃度、T_{max}：最高濃度到達時間、NA：該当せず、PK：薬物動態

[2.6.5.7 項]

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　ラットにおける組織分布

雄の SD ラットに MK-6482を30 mg/kg の用量で食後に単回経口投与し、MK-6482の組織への分布を検討した。投与後4、12及び24時間の血中、組織（肝臓、心臓、肺、腎臓、脳、精巣及び小腸）及び小腸内容物を採取し、LC-MS/MS による薬物濃度を測定した。MK-6482は小腸及び肝臓で広範に分布し、臓器別の分布量は、小腸≒肝臓＞腎臓＞心臓＞血漿≒肺＞精巣＞脳の順であった。MK-6482の脳／血漿濃度比は、投与後4～24時間で0.14～0.25であった。別の試験で、ラットに MK-6482を10 mg/kg の用量で単回経口投与した際の脳組織も採取し、LC-MS/MS で MK-6482を測定した。その結果、MK-6482の脳／血漿濃度比は、投与後4時間及び24時間で0.36～0.53であった[2.6.5.8.1 項]。これらの結果より、MK-6482は脳に分布するものの、他の組織と比較して脳内濃度が低いことから、脳への移行は限定的であることが示唆された。なお、In vitro では MK-6482はラットの P-gp の基質であることが示されている[2.6.5.21.1 項]。

雌雄の有色 LE ラット及びアルビノ SD ラットにおける MK-6482の組織分布についても QWBA 法を用いて評価した結果、有色及びアルビノラットの分布は雌雄で類似していた[2.6.5.8 項]。[^{14}C]-MK-6482をラットに経口投与したところ、[^{14}C]-MK-6482由来の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かつ広範に分布した。アルビノラットにおいて放射能の曝

露量（$AUC_{0\text{-}inf}$）が最も高かった組織は、肝臓、食道、小腸、腎皮質、盲腸、腎臓及び腎髄質であった。有色ラットにおいて放射能の曝露量が最も高かった組織は、肝臓、盲腸、小腸、腎皮質、腎臓及び食道であった。[^{14}C]-MK-6482由来の放射能の組織分布は可逆的であった。有色とアルビノラットの間で分布は類似しており、有色と非有色皮膚組織への分布及び貯留も両皮膚組織間で類似していたことから、メラニンへの結合はほとんど又は全くないことが示された。代謝及び排泄器官並びに消化管で最も高濃度の放射能が認められた。

2.6.4.4.2　ラット及びウサギにおける胎盤通過性

MK-6482の胎盤通過性は評価しなかった。

2.6.4.4.3　血漿蛋白結合

MK-6482の血漿蛋白結合はマウス、ラット、イヌ、サル及びヒトにおいて中程度であり、非結合率は39%～55%であった。ヒトにおける非結合率は55%であった。また、PT3317の血漿蛋白結合は中等度であった。非結合率は15%～54%であり、ラット及びイヌにおける非結合率はヒトと比べて低かった（1 µM の臨床曝露量で約2～3倍）。PT3317の非結合率は1 µM と10 µM の濃度で類似していた[表 2.6.4-7]。

表 2.6.4-7　In vitro における異なる動物種での MK-6482 及び PT3317 の可逆的な血漿蛋白結合

動物種	MK-6482		PT3317	
	濃度（µM）	非結合率 [a]	濃度（µM）	非結合率 [b]
CD-1/C57BL/6マウス [c]	10	44	1	49.4 ± 4.6
			10	38.0 ± 1.1
Sprague Dawley/Wistar Han ラット [d]	10	45	1	17.5 ± 0.4
			10	18.6 ± 1.3
ビーグル犬	10	39	1	15.0 ± 0.6
			10	14.9 ± 0.9
カニクイザル	10	48	NA	NA
ヒト	10	55	1	47.4 ± 2.4
			10	54.2 ± 3.8

[a] 平均値（n = 3）。
[b] 平均値 ± 標準偏差（n = 6）。
[c] MK-6482は CD-1マウス血漿、PT3317は C57BL/6マウス血漿を用いて評価した。
[d] MK-6482は Sprague Dawley ラット血漿、PT3317は Wistar Han ラット血漿を用いて評価した。

[2.6.5.9 項]

2.6.4.4.4　In vitro での血液－血漿分配

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの血液を用いて、MK-6482の血液分配を評価した。各動物種における血液／血漿濃度比は0.86～1.06であり（ヒトでは0.88）、MK-6482は赤血球への特異的な分布は認められなかった[表 2.6.4-8]。

表 2.6.4-8　　各動物種における MK-6482 の in vitro での血液／血漿濃度比

動物種	MK-6482の血中濃度（μM）	血液／血漿濃度比
マウス	1	1.06 ± 0.03
ラット	1	0.93 ± 0.06
イヌ	1	1.00 ± 0.02
サル	1	0.86 ± 0.09
ヒト	1	0.88 ± 0.08
数値は平均値 ± 標準偏差（n＝3）。		

[2.6.5.10 項]

2.6.4.5　代謝

2.6.4.5.1　In vivo 代謝

ラット及びヒトにおいて、MK-6482の in vivo 代謝及び排泄を評価した。ヒトにおけるデータの詳細は[2.7.2.2 項]に示す。代謝物である PT3317はイヌでも検出された。

無処置及び胆管カニューレを施した雌雄のラットに[^{14}C]-MK-6482を10 mg/kg の用量で単回経口投与したところ、代謝に性差は認められなかった[2.6.5.11.1 項]。MK-6482は様々な代謝を受け、23種類の放射性代謝物を生成し、そのうち14種類は LC-MS により同定された。MK-6482の主要な代謝経路は、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。ラットでは、未変化体に対するグルクロン酸抱合化（直接グルクロン酸抱合化）、脱フッ素化及び硫酸抱合化による代謝経路の寄与は小さかった。ラットにおける排泄物及び血漿中の代謝物の推定化学構造式を[図 2.6.4-1]に示す。

MK-6482は血漿中に最も多く存在し、循環血中における放射能の45.6%を占めていた。M2（チオシアン酸塩）は血漿中で2番目に多い放射性物質であり、23.7%を占めた。血漿中で検出されたその他の代謝物は、フルオロベンゾニトリル酸化物（M9；7.5%）、酸化的脱フッ素化システイン抱合体（M11；5.3%）、酸化的脱フッ素化システイン－グリシン抱合体（M12；2.2%）及び酸化的脱フッ素化 N-アセチルシステイン抱合体（M15；9.6%）であった。

無処置ラットでは投与した放射能の大部分が糞中に排泄されたが、BDC ラットでは投与した放射能の大部分が胆汁中に排泄され、胆汁中の放射能は投与量の85.0%であった。これらの結果より、MK-6482由来放射能は胆汁中に排泄されて消化管に到達し、糞中に排泄されることが示された。BDC ラットにおいて尿中排泄率は9.7%である一方で、糞中排泄率は2%未満であった。胆汁中から検出された代謝物は、主にモノヒドロキシ化グルクロン酸抱合体（M4；投与量の20.3%）、3種類のヒドロキシ化脱フッ素化グルタチオン抱合体［M6；6.8%、M7；9.5%及び M8；22.8%（共溶出する M8及び M9の薬物由来成分の合計）］及び PT3317（M16；9.0%）、並びに前述した代謝物である M11（3.0%）及び M12（4.4%）であった[2.6.5.11 項]。尿中から検出された放射能は、主に M9及び MK-6482であり、それぞれ投与量の4.0%及び3.8%であった。

健康被験者6例に[^{14}C]-MK-6482を120 mg（200 µCi）経口投与したところ（008試験）、血漿中の主な薬物由来物質は未変化体である MK-6482であった（投与後0～48時間の未変化体の総放射能に対する割合は73%）。なお、血漿中における総放射能に対する割合が10%を超える代謝物は認められなかった。ヒトにおける血漿中の主要代謝物は PT3317であり、総放射能に対する割合は約9%であった[2.6.5.11.1 項]。排泄物中で検出された主な代謝物は、尿中で PT3317（投与量に対する割合は32%）、糞中で M9（投与量に対する割合は42%）であった。In vitro 及び in vivo で生成された代謝物の推定化学構造式を[図 2.6.4-1]に示す。

ラット及びイヌを用いた GLP 適用の13週間反復投与毒性試験の一部として、PT3317の薬物動態を解析した。ラットにおける曝露量は低く、検討した最高用量である100 mg/kg BID における91日目の PT3317の $AUC_{0\text{-}24h}$ は0.09 µg·h/mL であり[表 2.6.6-14]、ヒトにおける $AUC_{0\text{-}24h}$ の平均値である6.5 µg·h/mL の0.02倍未満であった[2.7.2.2 項]。イヌを用いた GLP 適用の13週間反復投与毒性試験において、PT3317の血漿中曝露量は11.7 µg·h/mL（臨床曝露量の約1.8倍、非結合型曝露量の約0.6倍）であったことから、イヌにおける PT3317の安全性は十分に評価されている[表 2.6.6-23]。PT3317は HIF-2α に対して活性を示さず[2.6.2.2.1 項]、薬物相互作用を引き起こす可能性は低い[2.6.4.7 項]。

以上より、ラット及びヒトにおいて、MK-6482は主に代謝により消失し、その後糞中に排泄された。いずれの動物種においても、MK-6482の腎クリアランスはわずかであった。ヒトの排泄物及び血漿中で検出された全ての主要な代謝物は、ラット及び／又はイヌでも認められた。

2.6.4.5.2　In vitro 代謝

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームを用いて、1 µM の濃度で MK-6482の in vitro 代謝を評価した。MK-6482の代謝能はすべての動物種で低かった[2.6.5.12.2 項]。ラット、イヌ及びヒトの肝細胞懸濁液を用いて3 µM の濃度で in vitro 代謝を評価したところ、代謝能は低かった[2.6.5.12.3 項]。肝細胞懸濁液では代謝能が低かったことから、代謝能を最大にするために、HEPATPAC®共培養システムを用いて、インキュベーション時間を延長した追跡試験を実施した。In vitro で認められた主な代謝物は、ヒドロキシ化による M9及びグルクロン酸抱合化による PT3317であった[2.6.5.12.4 項]。

MK-6482の主な代謝経路は、CYP2C19による酸化及び UGT2B17によるグルクロン酸抱合化であり、一部 CYP3A4を介して代謝される。MK-6482の in vitro 代謝において、ヒト特異的な代謝物は認められなかった[図 2.6.4-1]。

図 2.6.4-1　　In vitro 及び in vivo での MK-6482 の代謝物の推定化学構造式



Gluc：グルクロン酸抱合、GSH：グルタチオン、Cys：システイン、Gly：グリシン、NAC：N-アセチルシステイン、HP：ヒト血漿、HU：ヒト尿、HF：ヒト糞、RP：ラット血漿、RU：ラット尿、RB：ラット胆汁、RF：ラット糞、RH, DH, HH：ラット、イヌ及びヒト肝細胞、RHPAC, DHPAC, HHPAC：ラット、イヌ及びヒト HEPATOPAC。

[2.6.5.13 項]

2.6.4.6　　排泄

2.6.4.6.1　　ラット

雌雄の無処置及び BDC ラットに[^{14}C]-MK-6482を経口投与し、マスバランス試験を実施して、ラットにおける MK-6482の排泄を評価した[2.6.5.14 項]。

無処置ラットに[^{14}C]-MK-6482を経口投与した際、放射能総回収率の平均値は、雄及び雌でそれぞれ投与量の94.6%及び93.9%であった。糞中排泄率は雄及び雌でそれぞれ投与量の74.0%及び69.8%であり、尿中排泄率は雄及び雌でそれぞれ投与量の17.7%及び19.5%であった[表 2.6.4-9][2.6.5.14 項]。

BDC ラットに[^{14}C]-MK-6482を経口投与した際、放射能総回収率の平均値は、雄及び雌でそれぞれ投与量の97.1%及び96.2%であった。胆汁中排泄率は雄及び雌でそれぞれ投与量の85.0%及び80.2%であり、尿中排泄率は雄及び雌でそれぞれ投与量の9.72%及び13.7%であった[表 2.6.4-9][2.6.5.14 項]。

無処置ラットでは糞中、BDC ラットでは胆汁中から投与量の大部分が回収されたことから、

MK-6482由来物質は主に糞中及び胆汁中に排泄されることが示された。

表 2.6.4-9　　無処置ラット及び胆管カニューレを施したラットに
[^{14}C]-MK-6482 を単回経口投与した際の放射能排泄率

性別	カニューレ処置	投与量に対する割合（%）					
		尿中	糞中	胆汁中	ケージ及びカニューレ中	屍体中	合計
雄	無処置	17.7	74.0	NA	1.92	0.97	94.6
雌	無処置	19.5	69.8	NA	3.90	0.70	93.9
雄	BDC	9.72	1.50	85.0	0.54	0.38	97.1
雌	BDC	13.7	1.54	80.2	0.49	0.22	96.2
BDC：胆管カニューレ挿入。 数値は平均値（n＝3）。							

[2.6.5.14 項]

2.6.4.6.2　イヌ

雄の無処置ビーグル犬を用いて、MK-6482を静脈内投与（1 mg/kg）又は経口投与（5 mg/kg）した際の尿中排泄を評価した[2.6.5.6.1 項]。MK-6482の尿中排泄率は、静脈内投与量の0.9%～3.8%、経口投与量の0.3%～0.8%であり、イヌの腎クリアランスは極めて低いことが示された。また、雄の無処置ビーグル犬に組成比の異なる2種類の錠剤（40 mg）の MK-6482を経口投与した際のMK-6482の尿中排泄を評価した。MK-6482の尿中排泄率は投与量の約4%であり、前述した試験の結果と一貫しており、イヌにおける MK-6482の主な消失経路は腎を介したクリアランスではないことが示された[2.6.5.6.1 項] [2.6.5.6.3 項]。

2.6.4.6.3　サル

雄の無処置カニクイザルに MK-6482を静脈内投与（1 mg/kg）又は経口投与（5 mg/kg）した際のMK-6482の尿中排泄を評価した。MK-6482の尿中排泄率は、静脈内投与量の0.13%、経口投与量の0.09%であり、サルにおける腎クリアランスは極めて低いことが示された[2.6.5.7 項]。

2.6.4.6.4　ラットにおける乳汁移行

MK-6482の乳汁移行は評価していない。

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1　MK-6482の消失に関与する薬物代謝酵素及びトランスポーター

2.6.4.7.1.1　薬物代謝酵素

In vitro で肝細胞及びミクロソームとインキュベートしたところ、MK-6482は酸化及びグルクロン酸抱合化により代謝されることが示された。MK-6482（5 µM）を発現系 CYP 分子種（CYP1A1、1A2、1B1、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4及び3A5）とインキュベートしたところ、MK-6482は CYP2C19により代謝され、CYP3A4による代謝の寄与は CYP2C19より小さいことが示された。

MK-6482（5及び50 µM）を発現系 UGT 分子種［UGT1A1、1A3、1A4、1A6、1A7、1A8、1A9、1A10、2B7、2B15及び2B17（5及び50 µM）並びに2B4及び2B10（5 µM のみ）］とインキュベートしたところ、UGT2B17によるグルクロン酸抱合化で PT3317が生成されることが示された。その他の UGT 分子種で代謝能は認められなかった[2.6.5.16 項]。

MK-6482の消失に対する UGT2B17及び CYP2C19の寄与を母集団薬物動態解析により評価した結果、UGT2B17及び CYP2C19の表現型は CL/F に有意な影響を及ぼした。異なる集団における曝露量への影響を含め、本解析の詳細は[2.7.2.3 項]に示す。UGT2B17を発現している被験者（UGT2B17 IM 及び EM）の大部分において、MK-6482の主要な消失経路は UGT2B17を介したグルクロン酸抱合化であること、UGT2B17を発現している被験者では CYP2C19を介した酸化は UGT2B17と比べて寄与は小さいものの重要な補助的経路であるが、UGT2B17を発現していない被験者（UGT2B17 PM）では CYP2C19を介した酸化は主要な消失経路であることが示された。これまでに検討した臨床試験結果及びリスク・ベネフィットプロファイルより、これらの酵素の遺伝子多型に基づく用量調節は必要ない[2.7.2.3 項]。UGT2B17又は CYP2C19の PM ではそれらの酵素活性を有しないことより、理論的には UGT2B17又は CYP2C19の阻害剤が最大の酵素阻害作用を示したとしても UGT2B17及び CYP2C19の両酵素が PM である患者集団の曝露量を上回る可能性は低いと考えられることから、本解析結果により、MK-6482と UGT2B17又は CYP2C19の阻害剤を併用投与した際、MK-6482の有効性及び安全性に対して臨床的に意味のある薬物相互作用は生じないと考えられる。

2.6.4.7.1.2　トランスポーター

MDCKII 細胞及び LLC-PK1細胞の単層膜を用いて、in vitro で MK-6482の膜透過性を評価した。MK-6482の P_{app} は LLC-PK1細胞及び MDCKII 細胞のいずれにおいても高かった（それぞれ29.2～29.4×10^{-6} cm/秒及び24.4～25.7×10^{-6} cm/秒）[2.6.5.21.1 項] [2.6.5.21.3 項]。代謝物である PT3317の P_{app} も MDCKII 細胞の単層膜で測定され、低値であった（<1×10^{-6} cm/秒）[2.6.5.20 項]。

2つの in vitro の評価系で MK-6482が P-gp の基質であるかを検討した。ヒト P-gp を発現する MDCKII（MDCKII-MDR1）細胞で、MK-6482（1 µM）の基底膜側（B）から頂端膜側（A）／頂端

膜側から基底膜側（B-A/A-B）への排出比は1.5であり、トランスポーターに対する親和性はほとんどないことが示唆された。さらに、P-gp を発現する LLC-PK1（LLC-MDR1）細胞の単層膜を用いて、P-gp 阻害剤であるシクロスポリン A の存在下又は非存在下で追加試験を実施した。B-A/A-B の排出比は0.1及び1 μM でそれぞれ2.4及び2.5であった。シクロスポリン A によりトランスポーターが阻害されたことから、MK-6482はヒト P-gp の弱い基質であることが示唆された[2.6.5.20 項] [2.6.5.21.1 項]。In vitro では膜透過性が高く、輸送活性は比較的低いことから、P-gp の阻害が MK-6482の曝露量に対して臨床的に意味のある影響を及ぼす可能性は低い。ヒトでのマスバランス試験（008試験）では、未変化体として糞中に排泄された放射能はわずかであったことから、吸収に関与する排出トランスポーターの影響はごくわずかであることが示された[2.7.2.2 項]。代謝物である PT3317についても、P-gp の基質であるかを MDCKII-MDR1細胞を用いて評価した。MDCK-MDR1細胞での PT3317の排出比は2未満であり（2及び5 μM でそれぞれ0.3及び0.9）、PT3317は P-gp の基質ではないことが示唆された。

MDCKII-BCRP 細胞の単層膜を用いた2試験で、MK-6482が BCRP の基質であるかを評価した。最初の試験では、1 μM の濃度で B-A/A-B の排出比が0.96であったことから、MK-6482は BCRP の基質ではないことが示唆された。次の試験では、B-A/A-B の排出比は0.1及び1 μM でそれぞれ1.7及び1.3であり、BCRP 阻害剤である Ko143の影響を受けなかったことから、MK-6482は BCRP の基質ではないと考えられる[2.6.5.21.2 項] [2.6.5.21.3 項]。代謝物である PT3317についても、BCRP の基質であるか MDCKII-BCRP 細胞を用いて評価した。排出比は2をわずかに上回ったが、BCRP 阻害剤である Ko143存在下でも阻害作用は認められなかったことから[2.6.5.21.2 項]、PT3317は BCRP の基質ではないことが示唆された。排出比が2をわずかに上回ったのは他の機序による可能性が考えられる。

また、ヒト OATP1B1又は OATP1B3を安定発現させた細胞株及びヒト凍結肝細胞を用いて、MK-6482の肝取込み能を評価した[2.6.5.21.4 項] [2.6.5.21.6 項] [2.6.5.21.8 項]。これらの試験結果より、MK-6482は OATP1B1及び OATP1B3の弱い基質であることが示唆されたが、肝トランスポーター阻害剤の併用の有無にかかわらず、ヒト凍結肝細胞への取込みに変化は認められなかった（阻害薬剤の併用の有無による違い：0.5～5分間で0.7～1.2倍）。さらに、[^{14}C]-MK-6482の取込みプロファイルに、非標識 MK-6482（100又は200 μM）の存在下と非存在下で、差は認められなかった。これらの in vitro の結果より、MK-6482は OATP1B1及び OATP1B3の弱い基質ではあるが、肝取込み能動輸送能はわずかであり、OATP1B の阻害剤との併用が MK-6482の曝露量に影響を及ぼす可能性は低いことが示唆された。

代謝物である PT3317は OATP1B1及び OATP1B3の基質であり、ヒト凍結肝細胞では PT3317の能動的な取込みが認められたが、この取込みは肝トランスポーター阻害剤の併用により減少した[2.6.5.21.5 項] [2.6.5.21.7 項] [2.6.5.21.9 項]。PT3317は、排出トランスポーターである MRP2及び MRP3の基質でもある[2.6.5.21.10 項] [2.6.5.21.11 項] [2.6.5.21.12 項]。PT3317は HIF-2α に対して薬理活性を示さず、薬物相互作用を引き起こす可能性が低いことから、取込みトランスポーター

である OATP1B1及び OATP1B3の阻害剤、又は排出トランスポーターである MRP2及び MRP3の阻害剤と併用した際、PT3317の曝露量に臨床的に意味のある変化が生じる可能性は低い。

2.6.4.7.2　薬物代謝酵素及びトランスポーターの阻害

2.6.4.7.2.1　薬物代謝酵素の阻害

ヒト肝ミクロソームでは、MK-6482は主な CYP 分子種（CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6及び3A4）に対して可逆的な阻害作用を示さず、IC_{50}値は CYP2C19（IC_{50}：280.54 µM）を除き、すべての分子種で検討した最高濃度（300 µM）よりも高かった[2.6.5.17.1 項]。ヒト代謝物である PT3317も同様に、これらの CYP 分子種に対する可逆的な阻害作用を評価した。PT3317の IC_{50}値はすべての分子種で150 µM を超えており、最小値は CYP3A を介したミダゾラムの代謝で測定された IC_{50}値の166.6 µM であり、臨床で認められた PT3317の $C_{max,u}$ 値（0.47 µM）の300倍を超えていた[2.6.5.17.1 項]。

また、MK-6482及び PT3317の主な CYP 分子種（CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6及び3A4）に対する時間依存的な阻害作用も評価した。10 µM の MK-6482及び PT3317は、いずれの CYP 分子種についても陰性対照のメタノールと類似した速度定数（min^{-1}）を示し（2倍以内）、MK-6482及び PT3317のいずれも時間依存的な CYP 阻害作用を示さなかった[2.6.5.17.2 項]。

MK-6482は主な UGT 分子種である UGT1A1、1A4、1A6、1A9及び2B7に対して阻害作用を示さなかった（IC_{50}値 >300 µM）[2.6.5.18 項]。UGT2B17に対する MK-6482の IC_{50}値は45 µM であり、$C_{max,u}$（2.6 µM）の10倍を超えていたことから、臨床曝露量で阻害が生じる可能性は低い。実際、臨床で MK-6482の AUC は120 mg から200 mg で線形性を示し[2.7.1.2.2項]、この用量範囲の曝露量では UGT2B17が阻害された挙動は認められなかった。PT3317は UGT 分子種である UGT1A4、1A6、1A9及び2B7に対して阻害作用を示さなかった（IC_{50}値 >300 µM）。UGT1A1に対する PT3317の IC_{50}値は149 µM であり、$C_{max,u}$（0.47 µM）の300倍を超えていたことから、臨床曝露量で阻害が生じる可能性は低い [2.6.5.18 項]。

2.6.4.7.2.2　トランスポーターの阻害

MK-6482及び PT3317の取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OAT1及び OAT3）に対する阻害作用を評価するため、安定発現細胞株を用いて300 µM（OATP1B1及び OATP1B3は150 µM）までの濃度で IC_{50}値を測定した。その結果を[表 2.6.4-10]、[2.6.5.22 項]及び[2.6.5.26 項]に要約する。これらの試験ではプローブ基質の濃度が報告された K_m 値よりもはるかに低かったため、競合阻害を仮定して IC_{50}値は K_i 値にほぼ等しいとした。

表 2.6.4-10　種々の取込みトランスポーターに対する MK-6482 の阻害作用

トランスポーター	プローブ基質（基質濃度）	IC_{50} (μM)	
		MK-6482	PT3317
OATP1B1	ピタバスタチン（0.1 μM）	149.2 ± 11.9	32.6 ± 3.5
OATP1B3	ブロモスルホフタレイン（0.1 μM）	>150	74.1 ± 13.4
OCT1	メトホルミン（10 μM）	46.9 ± 5.8	215.1 ± 34.4
OCT2	メトホルミン（5 μM）	173.4 ± 4.0	>300
OAT1	Cidofovir（1 μM）	>300	>300
OAT3	エストロン硫酸塩（1 μM）	99.2 ± 24.8	>300

OATP：有機アニオン輸送ポリペプチド、OCT：有機カチオントランスポーター、OAT：有機アニオントランスポーター、
IC_{50}：50%阻害濃度
数値は平均値 ± 標準誤差。

[2.6.5.22 項] [2.6.5.26 項]

本邦［「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」について（平成30年7月23日、薬生薬審発0723第6号）］、FDA 及び EMA の薬物相互作用ガイドラインに基づき、MK-6482は臨床用量である120 mg の曝露量［C_{max}：約4.7 μM（1.79 μg/mL）］では、非結合型 C_{max}：約2.6 μM、$I_{in,max,u}$：約14.7 μM であり[2.7.2.2 項]、OAT1及び OCT2を阻害しないと考えられる。OATP1B1及びOATP1B3の阻害に関しては、推奨 ka 値0.1 min^{-1}に基づき、臨床用量である120 mg では OATP1B1及び OATP1B3の $I_{in,max,u}/IC_{50}$（$I_{in,max,u}/K_i$）はそれぞれ0.098及び<0.098と算出された。これらの値は、EMA のガイドラインに定めるカットオフ基準（≥0.04）を上回ったが、本邦及び FDA のガイドラインに定めるカットオフ基準（≥0.1）を下回った。同様に、OAT3の $C_{max,u}/IC_{50}$（$C_{max,u}/K_i$）は0.026であり、EMA のガイドラインに定めるカットオフ基準（≥0.02）をわずかに上回ったが、本邦及び FDA のガイドラインに定めるカットオフ基準（≥0.1）を下回った。以上より、OATP1B1、OATP1B3又は OAT3の基質との臨床的に意味のある薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。肝取込みトランスポーターである OCT1を評価したところ、臨床用量である MK-6482 120 mg での $I_{in,max,u}/IC_{50}$（$I_{in,max,u}/K_i$）は約0.3であった[2.6.5.24 項] [2.6.5.25 項]。しかしながら、本邦のガイドラインで OCT1のカットオフ基準はなく、in vitro での OCT1阻害データから臨床的重要性を評価することは現在の知見では困難である[4.3: 05DSRY]。PT3317は臨床濃度（$C_{max,u}$：0.47 μM）では取込みトランスポーターを阻害しなかった（OATP1B1、1B3、OCT1、OCT2、OAT1及び OAT3に対する $C_{max,u}/IC_{50}$：<0.02）[2.6.5.27 項] [2.6.5.28 項] [2.6.5.29 項]。

以上より、評価した取込みトランスポーターに対して MK-6482が臨床的に意味のある阻害を示す可能性は低い。

排出トランスポーターに対する MK-6482及び PT3317の阻害作用は、プローブ基質を用いて、トランスポーターを安定発現させた細胞株及び膜小胞を用いて評価した。その結果を[表 2.6.4-11]、[2.6.5.22 項]及び[2.6.5.26 項]に要約する。

表 2.6.4-11　排出トランスポーターに対する MK-6482 の阻害作用

トランスポーター	プローブ基質（基質濃度）	IC_{50} (μM)	
		MK-6482	PT3317
P-gp	ジゴキシン（0.1 μM）	>100	>300
BCRP	メトトレキサート（10 μM）	>300	>300
MATE1	メトホルミン（5 μM）	39.0 ± 9.7	74.0 ± 17.2
MATE2-K	メトホルミン（5 μM）	0.7 ± 0.1	14.9 ± 1.3

P-gp：P-糖蛋白質、BCRP：乳癌耐性蛋白質、MATE：多剤・毒素化合物排出蛋白質、IC_{50}：50%阻害濃度

[2.6.5.22 項] [2.6.5.26 項]

視覚的に可溶な最高濃度（100 μM）において、MK-6482は P-gp を介した輸送活性を約18%阻害したが、IC_{50}値の算出は見合わせた。同様に、代謝物である PT3317の P-gp 阻害作用を検討したところ、IC_{50}値は300 μM を超えていた。検討した最高濃度100 μM が IC_{50}と同等であり、瞬時溶解を仮定すると、I_{gut}/IC_{50}値は約13であり、本邦、FDA 及び EMA のガイドラインに定めるカットオフ基準をわずかに上回ると考えられる。しかし、100 μM での阻害作用は50%を大きく下回っており、MK-6482の溶出は速やかではないことから[2.7.1.1.3.2 項]、MK-6482が消化管内で P-gp を阻害する可能性は低いと考えられる。

BCRP については、検討した最高濃度（300 μM）において、MK-6482は BCRP を介した輸送活性を28%阻害したが、IC_{50}値を算出しなかった。BCRP の I_{gut}/IC_{50}（IC_{50}値は300 μM と仮定）から、BCRP の $C_{max,u}/IC_{50}$値は本邦、FDA 及び EMA のガイドラインに定めるカットオフ基準を下回っており、BCRP の基質を併用した際に MK-6482が薬物相互作用を引き起こす可能性は低い。代謝物である PT3317についても BCRP に対する阻害作用が評価され、IC_{50}値は300 μM を上回った。

MK-6482は MATE1及び MATE2-K に対する阻害作用を示し、IC_{50}値はそれぞれ39.0及び0.7 μM であった。MK-6482 120 mg での非結合型 C_{max} 約2.6 μM より、MATE1の $C_{max,u}/IC_{50}$（$C_{max,u}/K_i$）は0.066であり、FDA のガイドラインに定めるカットオフ基準（≥0.1）を下回り、本邦及び EMA のガイドラインに定めるカットオフ基準(≥0.02)をわずかに上回った。同様に、MATE2-K の $C_{max,u}/IC_{50}$（$C_{max,u}/K_i$）は3.7であり、MK-6482は臨床濃度で MATE2-K を阻害する可能性が示唆された。しかしながら、MATE2-K の基質は MATE1及び OCT2の基質になり得ること、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[2.6.5.23 項] [2.6.5.24 項] [2.6.5.25 項]。本邦、FDA 及び EMA のガイダンスに基づくと、PT3317は MATE1（$C_{max,u}/IC_{50}$：0.006）に対する阻害剤ではなかった。MATE2-K（$C_{max,u}/IC_{50}$：0.032）については、FDA のガイドラインに定めるカットオフ基準（≥0.1）を下回り、PT3317は MATE2-K の阻害剤ではなかったが、本邦及び EMA のガイドラインに定めるカットオフ基準(≥0.02)をわずかに上回った。前述したとおり、PT3317による MATE2-K 阻害の臨床的な影響は小さいと考えられる。

2.6.4.7.3　薬物代謝酵素の誘導

In vitro 及び in vivo で MK-6482の CYP 誘導作用を評価した。3例のドナーから採取した培養ヒト肝細胞に MK-6482（最高濃度30 µM）を QD で3日間連続曝露させた[2.6.5.19 項]。CYP1A2及び CYP2B6の mRNA 発現量に対する MK-6482の影響はほとんど認められなかったことから（変化量は2.0倍未満であり、陽性対照の20%未満であった）、臨床用量での曝露量で MK-6482が CYP1A2及び CYP2B6を誘導する可能性は低い。肝細胞3ロットすべてにおいて、MK-6482の曝露により CYP3A4の mRNA 発現量は、30 µM で最大8.87倍、3.40倍及び16.1倍まで濃度依存的に増加したことから、MK-6482が CYP3A4を誘導する可能性が示唆された。

MK-6482による CYP3A の誘導の影響を定量的に評価するため、2ロットのヒト肝細胞を用いて 250 µM までの濃度で誘導反応を評価する追跡試験を実施した[2.6.5.19 項]。両ロットにおいて濃度依存的な誘導作用が認められ、EC_{50}値は5.4及び13.1 µM、E_{max} 値は15.2及び29.5倍であった。臨床薬物相互作用試験（009試験）において、ミダゾラムの $AUC_{0\text{-}inf}$ の幾何平均比（ミダゾラム + MK-6482／ミダゾラム単独）は0.60であり、MK-6482は弱い誘導作用を示す可能性があることが示唆された[2.7.2.3 項]。

以上より、MK-6482又は PT3317が、CYP 酵素、UGT 酵素又はトランスポーターの阻害剤として薬物相互作用を引き起こす可能性は低いことが示唆された。また、MK-6482が CYP1A2又は CYP2B6を誘導する可能性も低い。しかしながら、ミダゾラムとの臨床薬物相互作用試験より、MK-6482は弱い CYP3A4誘導作用を示す可能性が示唆され、PBPK モデル解析の結果より、MK-6482の曝露量が高い患者（UGT2B17及び CYP2C19が PM 患者等）においては MK-6482は中程度の CYP3A4誘導作用があることが示唆された[2.7.2.3 項]。

2.6.4.8　その他の薬物動態試験

2.6.4.8.1　胆汁酸塩排出ポンプに対する MK-6482及び PT3317の阻害

ヒト BSEP 発現バキュロウイルス感染 Sf9細胞から単離した膜小胞を用いて、MK-6482及び PT3317の BSEP に対する阻害作用を評価した。[^{3}H]タウロコール酸をプローブ基質として使用し、MK-6482の300 µM までの濃度で BSEP を介した輸送の阻害作用を評価した。IC_{50}値は MK-6482及び PT3317の両者で300 µM を超えていたため、臨床曝露量で MK-6482が BSEP を阻害する可能性は低い[2.6.5.22 項] [2.6.5.26 項]。

2.6.4.9　考察及び結論

MK-6482の薬物動態は、非臨床動物種で、CL_p は低（イヌ）～中程度（ラット）、Vd_{ss} は中程度（マウス、ラット、イヌ及びサル）であり、$t_{1/2}$は1（ラット）～10時間（サル）であった。MK-6482の経口バイオアベイラビリティはマウスでは高く、イヌ及びサルでは中程度、ラットでは低かった。

動物種での MK-6482の血漿蛋白結合率は低く、MK-6482の血液／血漿濃度比は0.86～1.06であり選択的に赤血球に分布しなかった。ラットに[^{14}C]-MK-6482を経口投与した際、放射能は広範かつ可逆的に分布し、大部分は代謝器官、排泄器官及び消化管で認められたが、ラットの脳内放射能濃度は低かった。これらのデータに加え、MK-6482の脳／血漿濃度比が他の臓器に比べて低いことから、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る。なお、MK-6482はヒト P-gp の弱い基質である。

ラットに[^{14}C]-MK-6482を単回経口投与した際、血漿中の主な放射性物質は MK-6482であった（>45%）。MK-6482の主な消失経路は、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り、放射能は主に代謝物として胆汁中及び糞中に排泄された。未変化体である MK-6482の腎排泄及び胆汁中排泄はわずかであった。

ヒトでは、MK-6482の代謝には主に UGT2B17及び CYP2C19が関与することが示された。臨床試験結果及びリスク・ベネフィットプロファイルより、これらの酵素の遺伝子多型に基づく用量調節の必要はない。この解析結果より、MK-6482と UGT2B17又は CYP2C19の阻害剤を併用投与した際に臨床的に意味のある薬物相互作用は生じないことが外挿可能であると考えられる。

ヒト血漿中では、グルクロン酸抱合体である PT3317は非活性型であり、主な代謝物である。この代謝物は MK-6482の *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、イヌにおける無毒性量での 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。MK-6482の薬物動態は、CL_p は低～中程度、分布容積は中程度、$t_{1/2}$は1（ラット）～10時間（サル）であった。MK-6482の経口バイオアベイラビリティは、マウスでは高く、イヌ及びサルで中程度、ラットでは低かった。これらの非臨床試験動物種のデータは、ヒトでのマスバランス試験から得られたデータと一貫しており、この試験では MK-6482の吸収は良好であり、糞中には微量の未変化体が排泄された。GLP 適用の毒性試験では、ヒト代謝物である PT3317の曝露量は、ヒトと比べて、ラットで低く、イヌと同程度であった。MK-6482は P-gp 及び OATP の基質であり、膜透過性が高く、輸送活性が比較的低いことから、P-gp 又は OATP の阻害が MK-6482の曝露量に対して臨床的に意味のある影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

臨床濃度では、MK-6482及び PT3317のいずれも、主な CYP 酵素（CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6及び3A4）、UGT 酵素（UGT1A1、1A4、1A6、1A9、2B7及び2B17）、主な取込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OCT2、OAT1及び OAT3）又は排出トランスポーター（P-gp、BCRP、BSEP 及び MATE1）の阻害剤ではなかった。ただし、in vitro で MATE2-K の阻害作用は認められたが、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 CYP2B6を誘導しなかったが、MK-6482は CYP3A4に対して弱い誘導作用、MK-6482の曝露量が高い患者においては中程度の CYP3A4誘導作用を示す可能性があることが示唆された[2.7.2.3項]。そのため、MK-6482は CYP3A4の基質となる薬物の曝露量に影響を及ぼす可能性がある。CYP3A4を誘導する可能性を除き、MK-6482による薬物相互作用が生じる可能性は低い。

2.6.4.10　参考文献

参考文献は、[1.12 項]の「4.3参考文献」に示した。

目次

2.6.5　薬物動態試験概要表
2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表
2.6.5.2　非臨床薬物動態及びトキシコキネティクス試験の概要及び分析法
2.6.5.3　分析法及びバリデーション報告書
2.6.5.4　薬物動態：マウスに単回投与した際の薬物動態
2.6.5.5　薬物動態：ラットに単回投与した際の薬物動態
2.6.5.5.1　ラットにおける MK-6482の薬物動態
2.6.5.5.2　ラットに異なる用量の MK-6482を経口投与した際の薬物動態パラメータの比較
2.6.5.6　薬物動態：イヌに単回投与した際の薬物動態
2.6.5.6.1　イヌにおける MK-6482の薬物動態
2.6.5.6.2　イヌに異なる製剤の MK-6482を経口投与した際の薬物動態パラメータの比較
2.6.5.6.3　イヌに異なる錠剤の MK-6482を経口投与した際の薬物動態パラメータの比較
2.6.5.7　薬物動態：サルに単回投与した際の薬物動態
2.6.5.8　薬物動態：ラットにおける組織分布
2.6.5.8.1　雄の Sprague Dawley ラットに MK-6482を単回経口投与した際の血漿中及び組織内薬物動態パラメータ
2.6.5.8.2　雄の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布
2.6.5.8.3　雌の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布
2.6.5.8.4　雄の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布
2.6.5.8.5　雌の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布
2.6.5.9　薬物動態：MK-6482及び PT3317の in vitro 血漿蛋白結合
2.6.5.10　薬物動態：血液／血漿濃度比
2.6.5.11　薬物動態：In vivo 代謝
2.6.5.11.1　ラット及びヒトにおける MK-6482の代謝
2.6.5.11.2　ラットに MK-6482を単回投与した際の PT3317の薬物動態
2.6.5.11.3　イヌに異なる用量及び製剤の MK-6482を投与した際の PT3317の薬物動態パラメータ
2.6.5.11.4　イヌに異なる製剤の MK-6482を経口投与した際の PT3317の薬物動態パラメータ
2.6.5.11.5　イヌに異なる錠剤の MK-6482を経口投与した際の PT3317の薬物動態パラメータの比較
2.6.5.11.6　サルに MK-6482を単回投与した際の PT3317の薬物動態パラメータ
2.6.5.12　薬物動態：In vitro 代謝
2.6.5.12.1　血液中での MK-6482の安定性
2.6.5.12.2　肝ミクロソームでの MK-6482の代謝安定性
2.6.5.12.3　肝細胞での in vitro 代謝
2.6.5.12.4　HEPATOPAC®での in vitro 代謝

2.6.5.13　薬物動態：In vitro 及び in vivo で予想された代謝経路
2.6.5.14　薬物動態：ラットにおける排泄
2.6.5.15　薬物動態：CYP 代謝分子種の同定
2.6.5.16　薬物動態：UGT 代謝分子種の同定
2.6.5.17　薬物動態：MK-6482及び PT3317によるヒト CYP 分子種の阻害作用
2.6.5.17.1　MK-6482及び PT3317によるヒト CYP 分子種の可逆的阻害作用
2.6.5.17.2　MK-6482及び PT3317によるヒト CYP3A4の時間依存的阻害作用
2.6.5.18　薬物動態：MK-6482及び PT3317によるヒト UGT の阻害作用
2.6.5.19　薬物動態：MK-6482によるヒト CYP 分子種の誘導作用
2.6.5.19.1　MK-6482によるヒト CYP1A2の誘導作用
2.6.5.19.2　MK-6482によるヒト CYP2B6の誘導作用
2.6.5.19.3　MK-6482によるヒト CYP3A4の誘導作用
2.6.5.19.4　ヒト CYP3A4の誘導作用（Relative Induction Score 法）
2.6.5.20　薬物動態：MK-6482及び PT3317の in vitro での MDCK 細胞単層膜透過性
2.6.5.21　薬物動態：薬物トランスポーターの基質としての MK-6482及び PT3317の評価
2.6.5.21.1　ヒト及びラット P-糖蛋白質の基質としての MK-6482の評価
2.6.5.21.2　ヒト BCRP の基質としての MK-6482及び PT3317の評価
2.6.5.21.3　ヒト BCRP 及びラット Bcrp の基質としての MK-6482の評価
2.6.5.21.4　ヒト凍結肝細胞における MK-6482の取込み能
2.6.5.21.5　ヒト凍結肝細胞における PT3317の取込み能
2.6.5.21.6　ヒト OATP1B1の基質としての MK-6482の評価
2.6.5.21.7　ヒト OATP1B1の基質としての PT3317の評価
2.6.5.21.8　ヒト OATP1B3の基質としての MK-6482の評価
2.6.5.21.9　ヒト OATP1B3の基質としての PT3317の評価
2.6.5.21.10　ヒト MRP2の基質としての MK-6482及び PT3317の評価
2.6.5.21.11　ヒト MRP2の基質としての PT3317の評価
2.6.5.21.12　ヒト MRP3の基質としての PT3317の評価
2.6.5.22　薬物動態：MK-6482によるヒト薬物トランスポーターの阻害作用
2.6.5.23　薬物動態：FDA の薬物相互作用ガイダンスに基づく MK-6482によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用
2.6.5.24　薬物動態：EMA の薬物相互作用ガイドラインに基づく MK-6482によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用
2.6.5.25　薬物動態：本邦の薬物相互作用ガイドラインに基づく MK-6482によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用
2.6.5.26　薬物動態：PT3317によるヒト薬物トランスポーターの阻害作用
2.6.5.27　薬物動態：FDA の薬物相互作用ガイダンスに基づく PT3317によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用
2.6.5.28　薬物動態：EMA の薬物相互作用ガイドラインに基づく PT3317によるトランスポー

ター阻害に関する薬物相互作用
2.6.5.29　薬物動態：本邦の薬物相互作用ガイドラインに基づく PT3317によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

2.6.5　薬物動態試験概要表

2.6.5.1　　薬物動態試験：一覧表

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設 [a]	試験番号／記載箇所
Absorption after a single dose				
Pharmacokinetics	Mouse (CD-1)	IV, P.O.	[redacted]	PK005／[4.2.2.2.1: PK005]
Pharmacokinetics	Mouse (SCID)	P.O.	[redacted]	PK006／[4.2.2.2.2: PK006]
Pharmacokinetics	Rat (SD)	IV, P.O.	[redacted]	PK007／[4.2.2.2.3: PK007]
Pharmacokinetics	Rat (SD)	IV	[redacted]	PK019／[4.2.2.5.1: PK019]
Pharmacokinetics	Rat (SD)	P.O.	[redacted]	PK008／[4.2.2.2.4: PK008]
Pharmacokinetics	Rat (SD)	P.O.	[redacted]	PK009／[4.2.2.2.5: PK009]
Pharmacokinetics	Dog (Beagle)	IV, P.O.	[redacted]	PK010／[4.2.2.2.6: PK010]
Pharmacokinetics	Dog (Beagle)	P.O.	[redacted]	PK011／[4.2.2.2.7: PK011] PK012／[4.2.2.2.8: PK012] PK013／[4.2.2.2.9: PK013] PK014／[4.2.2.2.10: PK014] PK015／[4.2.2.2.11: PK015]
Pharmacokinetics	Monkey (Cynomolgus)	IV, P.O.	[redacted]	PK016／[4.2.2.2.12: PK016]
Distribution				
Single-dose tissue distribution	Rat (SD)	P.O.	[redacted]	PK020／[4.2.2.3.1: PK020]
Single-dose tissue distribution	Rat (SD, Long Evans)	P.O.	[redacted]	PK021／[4.2.2.5.2: PK021]
Distribution to CNS	Rat (SD)	P.O.	[redacted]	PK007／[4.2.2.2.3: PK007]
In vitro reversible binding	Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human plasma	In vitro	[redacted]	PK018／[4.2.2.3.2: PK018]
In vitro reversible binding	Mouse, Rat, Dog, and Human plasma	In vitro	[redacted]	PK057／[4.2.2.6.1: PK057]
Blood-to-plasma partitioning	Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human	In vitro	[redacted]	PK017／[4.2.2.3.3: PK017]

C Confidential

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設 [a]	試験番号／記載箇所
Metabolism				
Metabolism in vivo (plasma)	Rat (intact)	IV, P.O.	[redacted]	PK007／[4.2.2.2.3: PK007]
Metabolism in vivo (plasma)	Rat (intact)	P.O.	[redacted]	PK008／[4.2.2.2.4: PK008]
Metabolism in vivo (plasma, feces)	Rat (intact)	P.O.	[redacted]	PK021／[4.2.2.5.2: PK021]
Metabolism in vivo (bile)	Rat (BDC)	IV	[redacted]	PK019／[4.2.2.5.1: PK019]
Metabolism in vivo (urine, bile,)	Rat (BDC)	P.O.	[redacted]	PK021／[4.2.2.5.2: PK021]
Metabolism in vivo (plasma)	Dog (intact)	IV, P.O.	[redacted]	PK010／[4.2.2.2.6: PK010]
Metabolism in vivo (plasma)	Dog (intact)	P.O.	[redacted]	PK011／[4.2.2.2.7: PK011] PK012／[4.2.2.2.8: PK012] PK013／[4.2.2.2.9: PK013] PK014／[4.2.2.2.10: PK014]
Metabolism in vivo (plasma)	Dog (intact)	P.O.	[redacted]	PK015／[4.2.2.2.11: PK015]
Metabolism in vivo (urine)	Dog (intact)	P.O.	[redacted]	PK027／[4.2.2.4.1: PK027]
Metabolism in vivo (plasma)	Monkey (intact)	IV, P.O.	[redacted]	PK016／[4.2.2.2.12: PK016]
Metabolic stability in blood	Mouse, Rat, Dog, Monkey, Human	In vitro	[redacted]	PK022／[4.2.2.4.3: PK022]
Metabolic stability in liver microsomes	Mouse, Rat, Dog, Monkey, Human	In vitro	[redacted]	PK023／[4.2.2.4.4: PK023]
Metabolic stability in hepatocytes	Mouse, Rat, Dog, Monkey, Human	In vitro	[redacted]	PK024／[4.2.2.4.5: PK024]
Metabolism in hepatocytes	Mouse, Rat, Dog, Monkey, Human	In vitro	[redacted]	PK026／[4.2.2.4.6: PK026]
Metabolism in hepatocytes	Rat, Dog, Human	In vitro	MRL	PK038／[4.2.2.4.7: PK038]
Metabolism in HEPATOPAC® co-culture	Rat, Dog, Human	In vitro	MRL	PK038／[4.2.2.4.7: PK038]
Excretion				
Excretion (urine, feces)	Rat (intact)	P.O.	[redacted]	PK021／[4.2.2.5.2: PK021]
Excretion (urine, bile, feces)	Rat (BDC)	P.O.	[redacted]	PK021／[4.2.2.5.2: PK021]

C Confidential

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設 [a]	試験番号／記載箇所
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Evaluation of MK-6482 as a substrate of human CYP isoforms	Recombinant human CYP isoforms	In vitro	MRL	PK001／[4.2.2.4.8: PK001]
Evaluation of MK-6482 as a substrate of human UGT	Recombinant human UGT isoforms	In vitro	[redacted]	PK025／[4.2.2.4.9: PK025]
Evaluation of MK-6482 as a substrate of human UGT	Recombinant human UGT isoforms	In vitro	MRL	PK038／[4.2.2.4.7: PK038]
Reversible inhibition of human CYP isoforms by MK-6482	Human liver microsomes	In vitro	[redacted]	PK053／[4.2.2.6.2: PK053]
Reversible inhibition of human CYP isoforms by PT3317[b]	Human liver microsomes	In vitro	[redacted]	PK054／[4.2.2.6.3: PK054]
Time-dependent inhibition of human CYP isoforms by MK-6482	Human liver microsomes	In vitro	[redacted]	PK055／[4.2.2.6.4: PK055]
Time-dependent inhibition of human CYP isoforms by PT3317	Human liver microsomes	In vitro	[redacted]	PK056／[4.2.2.6.5: PK056]
Inhibition of human UGT by MK-6482	Human liver microsomes, cDNA-derived UGT	In vitro	[redacted]	PK050／[4.2.2.6.6: PK050]
Inhibition of human UGT by PT3317	Human liver microsomes, cDNA-derived UGT	In vitro	[redacted]	PK051／[4.2.2.6.7: PK051]
Induction of human CYP isoforms by MK-6482	Human hepatocytes	In vitro	[redacted]	PK031／[4.2.2.6.8: PK031]
Evaluation of RIS for induction of human CYP3A4 by MK-6482	Human hepatocytes	In vitro	[redacted]	PK045／[4.2.2.6.9: PK045]
Evaluation of MK-6482 and PT3317 as a substrate of human P-gp	MDCK-MDR1 cells	In vitro	[redacted]	PK003／[4.2.2.2.13: PK003]
Evaluation of MK-6482 as a substrate of rat and human P-gp	LLC-PK1-MDR1 cells LLC-PK1-Mdr1a cells	In vitro	MRL	PK032／[4.2.2.6.10: PK032]
Evaluation of MK-6482 and PT3317 as a substrate of human BCRP	MDCKII-BCRP cells	In vitro	[redacted]	PK003／[4.2.2.2.13: PK003]
Evaluation of MK-6482 as a substrate of rat and human BCRP	MDCKII-BCRP cells MDCKII-Bcrp cells	In vitro	MRL	PK032／[4.2.2.6.10: PK032]
Evaluation of MK-6482 and PT3317 as a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3	HEK293-OATP1B1 cells HEK293-OATP1B3 cells	In vitro	MRL	PK032／[4.2.2.6.10: PK032]

2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設 [a]	試験番号／記載箇所
Uptake of MK-6482 and PT3317	Hepatocytes	In vitro	MRL	PK032／[4.2.2.6.10: PK032]
Evaluation of MK-6482 and PT3317 as a substrate of human MRP2	Sf9 membrane vesicles	In vitro	[redacted]	PK004／[4.2.2.2.14: PK004]
Evaluation of PT3317 as a substrate of human MRP2 and MRP3	Sf9 membrane vesicles	In vitro	MRL	PK032／[4.2.2.6.10: PK032]
Inhibition of human OATP1B1- and OATP1B3-mediated transport by MK-6482 and PT3317	HEK293-OATP1B1 cells HEK293-OATP1B3 cells	In vitro	MRL	PK033／[4.2.2.6.11: PK033]
Inhibition of human BSEP- mediated transport by MK-6482	Sf9 membrane vesicles	In vitro	[redacted]	PK046／[4.2.2.6.12: PK046]
Inhibition of human BSEP- mediated transport by PT3317	Sf9 membrane vesicles	In vitro	[redacted]	PK047／[4.2.2.6.13: PK047]
Inhibition of human OAT1- and OAT3-mediated transport by MK-6482 and PT3317	MDCKII-OAT1 cells MDCKII-OAT3 cells	In vitro	MRL	PK033／[4.2.2.6.11: PK033]
Inhibition of human OCT1- and OCT2-mediated transport by MK-6482 and PT3317	CHO-K1-OCT1 cells HEK293-OCT2 cells	In vitro	MRL	PK033／[4.2.2.6.11: PK033]
Inhibition of human MATE1- and MATE2-K-mediated transport by MK-6482 and PT3317	CHO-K1-MATE1 cells MDCKII-MATE2-K cells	In vitro	MRL	PK033／[4.2.2.6.11: PK033]
Inhibition of human BCRP- mediated transport by MK-6482 and PT3317	Sf9 membrane vesicles	In vitro	MRL	PK033／[4.2.2.6.11: PK033]
Inhibition of human P-gp- and BCRP-mediated transport by MK-6482 and PT3317	MDCK-MDR1 cells MDCK-BCRP cells	In vitro	[redacted]	PK034／[4.2.2.6.14: PK034]
Inhibition of human P-gp- mediated transport by MK-6482	LLC-PK1-MDR1 cells	In vitro	[redacted]	PK048／[4.2.2.6.15: PK048]
Inhibition of human P-gp- mediated transport by PT3317	LLC-PK1-MDR1 cells	In vitro	[redacted]	PK049／[4.2.2.6.16: PK049]

Abbreviations: P.O. = per oral; IV = intravenous; BDC = bile duct-cannulated; CNS = central nervous system; cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; CYP = cytochrome P450; CHO-K1 = Chinese hamster ovary-K1 cells; P-gp = P-glycoprotein; MDR1 = multidrug resistance protein 1; BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP = bile salt export pump; LLC-PK1 = Lilly Laboratories cell porcine kidney; MDCKII = Madin-Darby canine kidney; OATP1B1 = organic anion-transporting polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion-transporting polypeptide 1B3; HEK293 = human embryonic kidney 293; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K; MRP2 = multidrug resistance protein 2; MRP3 = multidrug resistance protein 3; Sf9 = *Spodoptera frugiperda*; SD = Sprague Dawley; SCID = severe combined immunodeficient; UGT = uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase.

[a] [redacted], China; [redacted], USA; [redacted], USA; [redacted], USA; [redacted], USA ; MRL = Merck Research Laboratories, NJ, USA; [redacted], USA; [redacted], USA; [redacted], China; [redacted], USA; [redacted], USA; [redacted], USA.

[b] PT3317 is know as an *O*-glucuronide metabolite of MK-6482 (M16).

Confidential

2.6.5.2　非臨床薬物動態及びトキシコキネティクス試験の概要及び分析法

被験物質：MK-6482 及び PT3317

動物種／系統	試験番号／記載箇所	測定対象物質	分析方法	マトリックス	バリデーション番号	GLP 適用
Rat/SD	TT#[redacted]-7820／[4.2.3.2.4: TT[redacted]7820]	MK-6482, PT3317	LC-MS/MS	Plasma	BAM.0349.01	GLP
Dog/Beagle	TT#[redacted]-7821／[4.2.3.2.7: TT[redacted]7821]	MK-6482, PT3317	LC-MS/MS	Plasma	BAM.0348.02	GLP
Rat/SD	TT#[redacted]-7823／[4.2.3.2.2: TT[redacted]7823]	MK-6482, PT3317	LC-MS/MS	Plasma	Exploratory Assay	Non-GLP
Dog/Beagle	TT#[redacted]-7808／[4.2.3.2.8: TT[redacted]7808]	MK-6482, PT3317	LC-MS/MS	Plasma	BAM.0348.02	GLP
Rat/SD	TT#[redacted]-7809／[4.2.3.2.5: TT[redacted]7809]	MK-6482, PT3317	LC-MS/MS	Plasma	BAM.0349.01	GLP
Rabbit/Dutch Belted	TT#[redacted]-7003／[4.2.3.5.2.2: TT[redacted]7003]	MK-6482, PT3317	LC-MS/MS	Plasma	BAM.0717.02	Non-GLP
Rat/SD	TT#[redacted]-7004／[4.2.3.5.2.1: TT[redacted]7004]	MK-6482	LC-MS/MS	Plasma	BAM.0349.01	Non-GLP
Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; SD = Sprague Dawley.						

Confidential

2.6.5.3　分析法及びバリデーション報告書

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Validation Report Number	[redacted] BIO.VR.0143-1686.01[a]	[redacted] BIO.VR.0143-1685.01[b]	[redacted] BIO.VR.0350-2564.01[c]	[redacted] BIO.VR.0143-1686.01[a]	[redacted] BIO.VR.0143-1685.01[b]	[redacted] BIO.VR.0350-2564.01[c]
Bioanalytical Method Reference	BAM.0349.01	BAM.0348.02	BAM.0717.02	BAM.0349.01	BAM.0348.02	BAM.0717.02
Activity	Full Validation Rat Plasma	Full Validation Dog Plasma	Full Validation Rabbit Plasma	Full Validation Rat Plasma	Full Validation Dog Plasma	Exploratory Validation Rabbit Plasma
Species	Rat	Dog	Rabbit	Rat	Dog	Rabbit
Analyte	MK-6482	MK-6482	MK-6482	Metabolite (PT3317)	Metabolite (PT3317)	Metabolite (PT3317)
Matrix	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Method	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Regression Model	Quadratic $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$	Linear $1/x^2$
Range of Quantitation (LLOQ-ULOQ) (ng/mL)	12.5 - 5,000	20.0 - 20,000	12.5 - 5,000	2.50 - 1,000	5.00 - 5,000	2.50 - 1,000
Standard Inter-day Accuracy Range (%Bias)	-1.00 to 1.60	-0.70 to 1.10	-1.20 to 1.50	-2.30 to 2.00	-1.20 to 2.00	-2.40 to 2.00
Standard Inter-day Precision Range (%CV)	1.40 to 3.00	1.40 to 10.2	1.70 to 3.60	4.90 to 8.40	1.10 to 11.2	2.70 to 3.50
QC Nominal Concentration (ng/mL)	12.5, 15.0, 375, 3,750	20.0, 60.0, 1,500, 15,000	12.5, 15.0, 1,500, 3,750	2.50, 3.00, 75.0, 750	5.00, 15.0, 375, 3,750	2.50, 3.00, 300, 750
QC Inter-day Accuracy Range (%Bias)	-2.70 to 1.60	-7.00 to 0.00	6.70 to 10.7	-6.00 to -3.20	-7.20 to -2.40	6.30 to 12.8
QC Inter-day Precision Range (%CV)	1.80 to 5.60	1.00 to 8.90	1.90 to 6.70	6.30 to 9.90	1.80 to 7.60	3.00 to 7.60
Matrix LTS (-80°C)	98 Days[d]	49 Days[e]	64 Days	102 Days[d]	49 Days[e]	64 Days
Dilution Integrity QC (Dilution Factor) (ng/mL)	10,000 (10)	40,000 (10)	50,000 (20)	2,000 (10)	10,000 (10)	10,000 (20)

Abbreviations: CV = Coefficient of variation; LC-MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LLOQ = Lower limit of quantitation; LTS = Long-term stability; QC = Quality control; ULOQ = Upper limit of quantitation.

[a] VR-MK-6482, [redacted] BIO.VR.0143-1686.01 [4.2.2.1.1: 05GVV6].
[b] VR-MK-6482, [redacted], BIO.VR.0143-1685.01 [4.2.2.1.2: 05GVVQ].
[c] VR-MK-6482, [redacted], BIO.VR.0350-2564.01 [4.2.2.1.3: 05KSXQ].
[d] VR-MK-6482, [redacted], BIO.VR.0143-1686.02 [4.2.2.1.4: 05KVRZ].
[e] VR-MK-6482, [redacted], BIO.VR.0143-1685.02 [4.2.2.1.5: 05KVS6].

C Confidential

2.6.5.4 薬物動態：マウスに単回投与した際の薬物動態

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.1: PK005]		[4.2.2.2.2: PK006]	
Species/Strain	Mouse/CD-1		Mouse/SCID	
Number of animals/Gender	3 per time point/M	3 per time point/M	3 per time point/M	3 per time point/M
Feeding condition	Fed	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	20% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v)	10% Ethanol, 30% PEG 400, 60% (0.5% methylcellulose, 0.5% Tween 80 (w/v) in water)	10% Ethanol, 30% PEG 400, 60% (0.5% methylcellulose, 0.5% Tween 80 (w/v) in water)	
Method of administration	IV[a]	P.O.	P.O.	P.O.
Dose (mg/kg)	3	10	1	10
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482	MK-6482	MK-6482	MK-6482
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters				
CL_p (mL/min/kg)	21.05	NA	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	4.94	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	4.00	5.37	2.67	2.90
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	2.37	14.01	1.98	8.16
$AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose (kg·h/L)	0.79	1.40	1.98	0.82
C_{max} (µg/mL)	NA	1.38	0.31	1.17
C_{max} /Dose (kg/L)	NA	0.14	0.31	0.12
T_{max} (h)	NA	0.5	0.5	1.00
Bioavailability (%)[b]	NA	>100	NC	NC

Abbreviations: M = male; SCID = severe combined immunodeficiency; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetics; CL_p = plasma clearance; Vd_{ss} = volume of distribution at steady state; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; C_{max}/Dose = C_{max} normalized to dose; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; NC = not calculated.
Values represent means.

[a] IV bolus.

[b] Oral bioavailability was calculated relative to the AUC at 3 mg/kg IV obtained from the same study [4.2.2.2.1: PK005].

Additional Information: Plasma was obtained by terminal bleeding (n=3 per time point). PK parameters were calculated from the average plasma concentration vs time profile. As such, standard deviation could not be calculated. Plasma concentration of PT3317 was also quantified by LC-MS/MS following a single P.O. dose of MK-6482 at 1 or 10 mg/kg [4.2.2.2.2: PK006]. Concentrations of PT3317 were below the quantitation limit in most plasma samples.

C Confidential

2.6.5.5 薬物動態：ラットに単回投与した際の薬物動態

2.6.5.5.1 ラットにおける MK-6482の薬物動態

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.3: PK007]	[4.2.2.5.1: PK019]	[4.2.2.2.3: PK007]	[4.2.2.2.4: PK008]
Species/Strain	Rat/SD	Rat/SD	Rat/SD	Rat/SD
Number of animals/Gender	3/M	3/M	3/M	3/M
Feeding condition	Fed	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	10% Dimethylacetamide, 10% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v/v)	20% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v)	10% Ethanol, 30% PEG 400, 60% (0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water)	10% Dimethylacetamide, 60% PEG 400, 30% water (v/v/v)
Method of administration	IV[a]	IV[a]	P.O.	P.O.
Dose (mg/kg)	1	2	10	10
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482	MK-6482	MK-6482	MK-6482
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters				
CL_p (mL/min/kg)	16.38	36.17	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	1.27	2.09	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	1.09	1.40	5.30	1.41
$AUC_{0\text{-}inf}$ (μg·h/mL)	1.02	0.93	1.78	2.76
$AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose (kg·h/L)	1.02	0.46	0.18	0.28
C_{max}(μg/mL)	NA	NA	0.28	0.57
C_{max} /Dose (kg/L)	NA	NA	0.03	0.06
T_{max} (h)	NA	NA	1.33	0.67
Bioavailability (%)[b]	NA	NA	17.5	NC

Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetics; CL_p = plasma clearance; Vd_{ss} = volume of distribution at steady state; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}inf}$/Dose = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; C_{max}/Dose = C_{max} normalized to dose; SD = Sprague Dawley; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; NC = not calculated.
Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal (n=3).
[a] IV bolus.
[b] Oral bioavailability was calculated relative to the AUC at 1 mg/kg IV obtained from the same study [4.2.2.2.3: PK007].
Additional Information: Following a single IV (1 mg/kg) administration of MK-6482, the amount of MK-6482 excreted into urine was determined [4.2.2.2.3: PK007]. A small amount of MK-6482 was detected in urine with mean concentration of 91 ng/mL in 0-8 h and 8 ng/mL in 0-24h post-dose.

2.6.5.5.2　　ラットに異なる用量の MK-6482を経口投与した際の薬物動態パラメータの比較

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.5: PK009]				
Species/Strain	Rat/SD				
Number of animals/Gender	3 per dose/M				
Feeding condition	Fed				
Vehicle/Formulation	0.5% methylcellulose, 0.5% Tween 80 (w/v) in water				
Method of administration	P.O.				
Dose (mg/kg)	3	10	30	100	300
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482				
Assay	LC-MS/MS				
PK parameters					
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	0.57	2.06	5.94	10.21	22.73
$AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose (kg·h/L)	0.19	0.21	0.20	0.10	0.08
C_{max}(µg/mL)	0.13	0.34	0.66	0.87	2.01
C_{max} /Dose (kg/L)	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01
$t_{1/2}$ (h)	2.47	3.62	4.68	4.34	5.12
T_{max} (h)	0.67	1.00	1.33	1.67	1.00

Abbreviations: M = male; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetics; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$= area under the concentration-time curve from 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; C_{max}/Dose = C_{max} normalized to dose; SD = Sprague Dawley; T_{max} = time to maximum concentration.
Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal (n=3).

C Confidential

2.6.5.6 薬物動態：イヌに単回投与した際の薬物動態

2.6.5.6.1 イヌにおける MK-6482の薬物動態

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.6: PK010]		[4.2.2.2.7: PK011]			
Species/Strain	Dog/Beagle		Dog/Beagle			
Number of animals/Gender	3/M	3/M	3/M	3/M	3/M	3/M
Feeding condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	20% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v)	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water			
Method of administration	IV[a]	P.O.	P.O.			
Dose (mg/kg)	1	5	1	10	30	100
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482					
Assay	LC-MS/MS					
PK parameters						
CL_p (mL/min/kg)	1.35	NA	NA	NA	NA	NA
Vd_{ss} (L/kg)	1.81	NA	NA	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	9.65	17.20	27.69	22.16	30.85	39.42
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	12.25	25.29	10.91	32.09	67.09	109.11
$AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose (kg·h/L)	12.25	5.06	10.91	3.21	2.24	1.09
C_{max}(µg/mL)	NA	1.51	0.36	1.41	2.15	3.29
C_{max} /Dose (kg/L)	NA	0.30	0.36	0.14	0.07	0.03
T_{max} (h)	NA	2	2	4	4	4
Bioavailability (%)[b]	NA	33	NC	NC	NC	NC

Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; CL_p = plasma clearance; Vd_{ss} = volume of distribution at steady state; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; C_{max}/Dose = C_{max} normalized to dose; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; NC = not calculated; PK = pharmacokinetics.
Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal (n=3).
[a] IV bolus.
[b] Oral bioavailability was calculated relative to the AUC at 1 mg/kg IV obtained from the same study [4.2.2.2.6: PK010].
Additional Information: Following a single IV and P.O. administration of MK-6482, the amount of MK-6482 excreted into urine ranged from 0.3 to 3.8% of the administered MK-6482 [4.2.2.2.6: PK010].

C Confidential

2.6.5.6.2　イヌに異なる製剤の MK-6482を経口投与した際の薬物動態パラメータの比較

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.8: PK012][a]		[4.2.2.2.9: PK013]	[4.2.2.2.10: PK014]		
Species/Strain	Dog/Beagle		Dog/Beagle	Dog/Beagle		
Number of animals/Gender	3/M	3/M	3/M	4/M	4/M	4/M
Feeding condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water		10% Dimethylacetamide, 60% PEG 400, 30% water (v/v/v)	[redacted][b]	[redacted][c]	Lipid Formulation[d]
Method of administration	P.O.		P.O.	P.O.		
Dose (mg/kg)	5	30	10	5	5	53 mg/dog
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482					
Assay	LC-MS/MS					
PK parameters						
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	20.69	70.62	130.5	54.3	58.3	33.5
$AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose (kg·h/L)	4.14	2.35	13.1	10.9	11.7	NA
C_{max}(µg/mL)	1.22	3.37	6.0	3.8	3.9	1.2
C_{max} /Dose (kg/L)	0.24	0.11	0.6	0.8	0.8	NA
$t_{1/2}$ (h)	16.82	13.73	16.1	16.5	15.8	20.0
T_{max} (h)	2.83	9.67	2.3	1.8	1.6	3.5

Abbreviations: M = male; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}inf}$/Dose = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; C_{max}/Dose = C_{max} normalized to dose; T_{max} = time to maximum concentration; PEG 400 = polyethylene glycol 400; [redacted]; NA = not applicable; PK = pharmacokinetics.

Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal.

[a] Study was conducted with [redacted] MK-6482 ([redacted]).

[b] [redacted] was comprised of [redacted] ratio of MK-6482:[redacted] material was suspended in 1% methylcellulose and 1% Tween 80 in water (w/v).

[c] [redacted] was comprised of [redacted] ratio of MK-6482:[redacted] material was suspended in 1% methylcellulose and 1% Tween 80 in water (w/v).

[d] Lipid formulation was comprised of a [redacted] % solution of MK-6482 dissolved in a [redacted] ratio of [redacted], and [redacted]. Each [redacted] contained ~26.5 mg of MK-6482. Each dog was dosed with two [redacted] by oral gavage.

C Confidential

2.6.5.6.3 イヌに異なる錠剤の MK-6482を経口投与した際の薬物動態パラメータの比較

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.11: PK015]	
Species/Strain	Dog/Beagle	
Number of animals/Gender	4/M	4/M
Feeding condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	MK-6482-F1 Tablet[a]	MK-6482-F3 Tablet[b]
Method of administration	P.O.	P.O.
Dose (mg/dog)	40	40
Normalized Dose (mg/kg)	3.80 ± 0.35	3.91 ± 0.18
Sample	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482	MK-6482
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters		
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	51.0 ± 13.9	47.7 ± 4.5
C_{max}(µg/mL)	3.51 ± 1.53	2.48 ± 0.63
$t_{1/2}$ (h)	22.6 ± 7.1	28.3 ± 7.5
T_{max} (h)	0.7 ± 0.9	1.1 ± 0.7

Abbreviations: M = male; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetics; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; C_{max} = maximum concentration; T_{max} = time to maximum concentration; [redacted].
Values represent mean ± standard deviation (n = 4).

[a] F1 tablet: [redacted].

[b] F3 tablet: [redacted].

Additional information: Following a single oral tablet administration of MK-6482-F1 and MK-6482-F3, the mean amount of MK-6482 excreted in urine (0-48 h post-dose) was about 4% of the administered dose for both formulations.

Confidential

2.6.5.7　薬物動態：サルに単回投与した際の薬物動態

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.2.12: PK016]	
Species/Strain	Monkey/Cynomolgus	
Number of animals/Gender	3/M	3/M
Feeding condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	20% Ethanol, 40% PEG 400, 40%　water (v/v/v)	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water
Method of administration	IV[a]	P.O.
Dose (mg/kg)	1	5
Sample	Plasma	Plasma
Analyte	MK-6482	MK-6482
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters		
CL_p (mL/min/kg)	3.7	NA
Vd_{ss} (L/kg)	2.93	NA
$t_{1/2}$ (h)	10.4	5.9
$AUC_{0\text{-}inf}$ (µg·h/mL)	4.6	12.0
$AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose (kg·h/L)	4.6	2.4
C_{max}(µg/mL)	NA	0.9
T_{max} (h)	NA	5.3
Bioavailability (%)	NA	52.5

Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; CL_p = plasma clearance; Vd_{ss} = volume of distribution at steady state; $t_{1/2}$ = terminal half-life; $AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; $AUC_{0\text{-}inf}$ /Dose = AUC normalized to dose; C_{max} = maximum concentration; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; PK = pharmacokinetics.
Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal (n=3).
[a] IV bolus.
Additional Information: The amounts of MK-6482 excreted in urine (0-48 h post-dose) were 0.13 and 0.09% of the administered dose following a single 1 mg/kg IV and 5 mg/kg P.O. administration of MK-6482, respectively.

C Confidential

2.6.5.8　薬物動態：ラットにおける組織分布

2.6.5.8.1　雄の Sprague Dawley ラットに MK-6482を単回経口投与した際の血漿中及び組織内薬物動態パラメータ

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.3.1: PK020]							
Species/Strain	Rat/SD							
Number of animals/Gender	3 per time point/M							
Feeding Condition	Fed							
Vehicle/Formulation	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water							
Method of Administration	P.O.							
Dose (mg/kg)	30							
Analyte	MK-6482							
Method of Analysis	LC-MS/MS							
Sampling Time	4, 12, 24 h (post-dose)							
Tissue or Matrix	Plasma (µg/mL)	Liver (µg/g)	Heart (µg/g)	Lung (µg/g)	Kidney (µg/g)	Brain (µg/g)	Testis (µg/g)	Small Intestine (µg/g)
4 h	1.45	3.10	1.98	1.38	2.35	0.21	0.86	3.36
12 h	0.38	0.89	0.45	0.35	0.62	0.06	0.18	0.96
24 h	0.12	0.41	0.22	0.17	0.33	0.03	0.08	0.35
$AUC_{0\text{-}24h}$ (µg·h/mL)	12.0	27.8	16.0	11.8	20.7	1.8	6.7	29.3
$AUC_{0\text{-}24h}$ ratio (tissue/plasma)	NA	2.3	1.3	1.0	1.7	0.2	0.6	2.5

Abbreviations: M = male; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; SD = Sprague Dawley; $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the concentration-time curve from 0 to 24 h post-dose; NA = not applicable.
Values represent means.
Additional information: Concentrations of PT3317 in plasma and tissues were also quantified by LC-MS/MS in this study. Following an oral administration of MK-6482 at 30 mg/kg to rats, among the tissues collected, concentrations of PT3317 were low compared with MK-6482, and only measurable in liver, plasma and small intestine but not in the other collected tissues. The PT3317 to MK-6482 exposure ratios (% of $AUC_{0\text{-}24h}$) were 4.3 and 1.7 for liver and plasma, respectively. In a separate study, following a single oral dose of MK-6482 to SD rats at 10 mg/kg [4.2.2.2.3: PK007], MK-6482 was distributed into brain with mean concentration of 55.5 and 5.02 ng/mL, and brain to plasma ratios of 0.36 and 0.53 in the 4 and 24 h brain samples. PT3317 was not detected in the 4 or 24 h brain samples.

C Confidential

2.6.5.8.2 雄の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布

被験物質：MK-6482

Report Number	PK021						
Species/Strain:	Rat/Long-Evans						
Gender (M/F)/Number of animals:	M/9 (one per time point)						
Feeding Condition:	Fasted						
Vehicle/Formulation:	20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO water (v/v/v)						
Method of Administration:	P.O.						
Dose (mg/kg):	10						
Radionuclide:	[^{14}C]-MK-6482						
Specific Activity (µCi/mg):	149.75						
Method of Analysis:	QWBA[a], LSC[b]						
Sampling Time:	0.5 to 168 h (post-dose)						
Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)						
	R0401	R0402	R0403	R0404	R0405	R0406	R0407
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Adrenal gland(s)	ND[c]	998	441[d]	61.3	56.9[d]	ND	ND
Arterial wall	4430	921	496	246	157	77.7	ND
Blood	2830	1100	509	217	95.7	78.6	BLQ
Bone	306	181	86.9	BLQ	ND	ND	ND
Bone marrow	2640	452	265	65.6	BLQ	ND	ND
Brain cerebellum	642	75.2	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	600	80.3	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	624	69.0	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	644	113	64.1	BLQ	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	3640	449	529	175	103	ND	ND
Cecum	3320	2840	ND[c]	1320	NR	BLQ	ND
Diaphragm	4290	591	268	BLQ	ND	ND	ND
Epididymis	1860[d]	643	486	116	BLQ	BLQ	ND
Esophagus	3290	692	861	NR	261	82.8	BLQ
Exorbital lacrimal gland	3980	643	293	56.2	BLQ	ND	ND
Eye lens	498	362	288	192	64.2	BLQ	ND
Eye uveal tract	5430	1380	478	59.3	BLQ	ND	ND
Eye(s)	1520	494	212	72.4	BLQ	ND	ND
Fat (abdominal)	1490	265	BLQ	ND	ND	ND	ND

2.6.5.8.2 雄の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)						
	R0401	R0402	R0403	R0404	R0405	R0406	R0407
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Fat (brown)	3080	670	192	BLQ	ND	ND	ND
Harderian gland	5570	847	253	BLQ	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	3530	598	342	BLQ	ND	ND	ND
Kidney cortex	10200	2090	1100	151	71.0	BLQ	ND
Kidney medulla	7640	1420	738	136	88.2	BLQ	ND
Kidney(s)	9730	1950	1010	149	74.6	BLQ	ND
Large intestine	2770	938	1800	200	83.0	BLQ	ND
Liver	18900	3780	1210	229	160	75.6	BLQ
Lung(s)	3680	905	354	126	71.1	BLQ	ND
Lymph node(s)	2940	645	309	55.3[d]	75.4	BLQ	ND
Muscle	2630	442	151	BLQ	ND	ND	ND
Myocardium	5130	848	391	84.3	BLQ	ND	ND
Nasal turbinate	1270	287	183	105	65.8	BLQ	ND
Pancreas	4770	885	347	BLQ	ND	ND	ND
Pituitary gland	3550	708	278	117	82.1	ND	ND
Preputial gland	2220[d]	740	516	128[d]	62.4[d]	BLQ[d]	ND
Prostate gland	3050	597	353	78.4	BLQ	BLQ	ND
Salivary gland(s)	4480	749	305	71.5	BLQ	ND	ND
Seminal vesicle(s)	2210	624	403	163	79.8	BLQ	BLQ
Skin (nonpigmented)	1530	596	506	75.7	59.9	BLQ	BLQ
Skin (pigmented)	1530	698	535	258	307	116	BLQ

C Confidential

2.6.5.8.2 雄の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)						
	R0401	R0402	R0403	R0404	R0405	R0406	R0407
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Small intestine	4620	6450	1030	124	88.1	BLQ	ND
Spinal cord	808	86.8	BLQ	ND	ND	ND	ND
Spleen	3180	551	323	BLQ	ND	ND	ND
Stomach	4530	1060	583	230	112	75.2	66.4
Testis(es)	707	434	200	BLQ	ND	ND	ND
Thymus	3120	479	184	63.7	BLQ	ND	ND
Thyroid	4470	650	324	74.9	BLQ	ND	ND
Urinary bladder	ND[e]	1230	726	223	137	BLQ	ND
Urine	8810	4010	986	664	127	82.8	ND
Blood	4010	1350	596	262	140	83.6	37.1
Plasma	6350	2160	777	269	131	72.8	31.5

Abbreviations: M = male; DMSO = dimethyl sulfoxide; PEG 400 = polyethylene glycol 400; RO = reverse osmosis; P.O. = per oral; h = hour; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; LSC = liquid scintillation counting; BLQ = below the limit of quantitation (<54.2 ng equivalents [^{14}C]-MK-6482/g); ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); NR = not represented (tissue not present in section).

[a] Radioluminography was used to quantitate the amount of radioactivity in tissues.

[b] LSC was used to quantitate radioactivity concentration in blood and plasma.

[c] Tissue ND due to flare from gastrointestinal contents.

[d] Tissue appeared to be fat soaked.

[e] Tissue ND due to flare from urine.

Additional Information: The animals sacrificed at 336 and 672 h time points were not analyzed since there was a clear elimination phase for critical matrices by 168 h post-dose.

C Confidential

2.6.5.8.3　　雌の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.5.2: PK021]						
Species/Strain:	Rat/Long-Evans						
Gender (M/F)/Number of animals:	F/9 (one per time point)						
Feeding Condition:	Fasted						
Vehicle/Formulation:	20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO water (v/v/v)						
Method of Administration:	P.O.						
Dose (mg/kg):	10						
Radionuclide:	[^{14}C]-MK-6482						
Specific Activity (µCi/mg):	149.75						
Method of Analysis:	QWBA[a], LSC[b]						
Sampling Time:	0.5 to 168 h (post-dose)						
Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)						
	R0901	R0902	R0903	R0904	R0905	R0906	R0907
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Adrenal gland(s)	4040[c]	1390[c]	160[c]	BLQ[c]	ND	ND	ND
Arterial wall	3280	979	354	209	147	110	ND
Bile	30800	ND	1970	ND	ND	ND	ND
Blood	2140	1250	329	186	137	68.9	ND
Bone	242	135	56.9	BLQ	ND	ND	ND
Bone marrow	1860	566	139	BLQ	ND	ND	ND
Brain cerebellum	442	113	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	390	104	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	453	108	BLQ	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	432	91.0	BLQ	ND	ND	ND	ND
Cecum	2230	ND[d]	ND[d]	1160	103	BLQ	ND
Diaphragm	3330	877	130	BLQ	ND	ND	ND
Esophagus	2610	2700	1420	956	229	102	88.9
Exorbital lacrimal gland	2840	835	129	58.5	BLQ	ND	ND
Eye lens	128	502	115	105	BLQ	ND	ND
Eye uveal tract	3020	1400	189	67.4	BLQ	ND	ND
Eye(s)	832	573	106	72.5	BLQ	ND	ND
Fat (abdominal)	1310	199	BLQ	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	2070	680	105	BLQ	ND	ND	ND

Confidential

2.6.5.8.3 雌の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)						
	R0901	R0902	R0903	R0904	R0905	R0906	R0907
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Harderian gland	3670	1280	121	BLQ	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	2750	1100	119	BLQ	ND	ND	ND
Kidney cortex	7870	2060[c]	470	154	82.0	BLQ	ND
Kidney medulla	6190	1910	545	148	79.2	BLQ	ND
Kidney(s)	7530	2030	482	152	81.9	BLQ	ND
Large intestine	2340	1380	1240[c]	95.6	65.5	BLQ	ND
Liver	17100	3740	743	308	165	108	BLQ
Lung(s)	2180	994	236	122	106	59.7	BLQ
Lymph node(s)	2030	980	211	92.5	BLQ	BLQ	ND
Muscle	2060	642	BLQ	ND	ND	ND	ND
Myocardium	3990	1340	202	84.1	BLQ	ND	ND
Nasal turbinate	970	421	108	83.1	64.1	BLQ	ND
Ovary(ies)	3430[c]	936[c]	119[c]	68.4[c]	BLQ[c]	ND	ND
Pancreas	4190	949	222	BLQ	BLQ	ND	ND
Pituitary gland	3000	1130	147	66.3	BLQ	ND	ND
Preputial gland	1380[c]	NR	NR	106[c]	BLQ[c]	ND	ND
Salivary gland(s)	3090	983	193	110	56.7	BLQ	ND
Skin (nonpigmented)	928	666	122	112	81.5	BLQ	ND
Skin (pigmented)	1210	612	416	176	214	95.2	BLQ
Small intestine	3180	1340	1300	190	BLQ	ND	ND
Spinal cord	449	144	BLQ	ND	ND	ND	ND

C Confidential

2.6.5.8.3 雌の Long-Evans ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)						
	R0901	R0902	R0903	R0904	R0905	R0906	R0907
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	48 h	72 h	168 h
Spleen	1720[c]	671	133	BLQ	ND	ND	ND
Stomach	ND[d]	1850	553	383	162	159	56.7
Thymus	2330	767	123	92.3	BLQ	ND	ND
Thyroid	3330	1280	110	BLQ	ND	ND	ND
Urinary bladder	2570	ND[e]	ND[e]	221	BLQ	64.1	ND
Urine	12200	14100	8920	1090	BLQ	ND	ND
Uterus	2340	890	285[c]	186	77.2[c]	56.0[c]	BLQ[c]
Blood	2450	1200	392	284	144	103	49.0 (11.9)[f]
Plasma	4010	1790	438	254	128	93.3	42.4 (10.3)[f]

Abbreviations: F = female; DMSO = dimethyl sulfoxide; PEG 400 = polyethylene glycol 400; RO = reverse osmosis; P.O. = per oral; h = hour; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; LSC = liquid scintillation counting; BLQ = below the limit of quantitation (<54.2 ng equivalents [^{14}C]-MK-6482/g); ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); NR = not represented (tissue not present in section).

[a] Radioluminography was used to quantitate the amount of radioactivity in tissue.

[b] LSC was used to quantitate radioactivity concentration in blood and plasma.

[c] Tissue appeared to be fat soaked.

[d] Tissue ND due to flare from gastrointestinal contents.

[e] Tissue ND due to flare from urine.

[f] Data in parentheses were from 336 h post-dose.

Additional Information: The animals that sacrificed at 336 and 672 h time points were not analyzed since there was a clear elimination phase for critical matrices by 168 h post-dose.

C Confidential

2.6.5.8.4 雄の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.5.2: PK021]				
Species/Strain:	Rat/SD				
Gender (M/F)/Number of animals:	M/5 (one per time point)				
Feeding Condition:	Fasted				
Vehicle/Formulation:	20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO water (v/v/v)				
Method of Administration:	P.O.				
Dose (mg/kg):	10				
Radionuclide:	[^{14}C]-MK-6482				
Specific Activity (µCi/mg):	149.75				
Method of Analysis:	QWBA[a], LSC[b]				
Sampling Time:	0.5 to 72 h (post-dose)				
Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)				
	R0301	R0302	R0303	R0304	R0305
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	72 h
Adrenal gland(s)	ND[c]	4460	362	86.3[d]	BLQ[d]
Arterial wall	2580	3010	461	267	118
Bile	28000	21200	3940	ND	ND
Blood	2530	2070	463	278	123
Bone	223	327	BLQ	BLQ	ND
Bone marrow	2450	1730	282	83.7	BLQ
Brain cerebellum	504	310	BLQ	ND	ND
Brain cerebrum	510	319	BLQ	ND	ND
Brain medulla	544	349	BLQ	ND	ND
Brain olfactory lobe	386	278	BLQ	ND	ND
Bulbo-urethral gland	3500	2470	503	143	BLQ
Cecum	3130	ND[c]	ND[c]	427	63.1
Diaphragm	3480	2950	215	BLQ	ND
Epididymis	1440	2630[d]	339[d]	93.4	BLQ
Esophagus	2160	2320	912	1280	356
Exorbital lacrimal gland	4220	2610	223	88.7	BLQ
Eye lens	361	430	282	179	69.6
Eye uveal tract	1870	1440	197	74.6	BLQ
Eye(s)	639	579	156	93.2	BLQ

C Confidential

2.6.5.8.4 雄の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)				
	R0301	R0302	R0303	R0304	R0305
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	72 h
Fat (abdominal)	731	502	63.5	BLQ	ND
Fat (brown)	4630	2970	299	82.5	60.9
Harderian gland	5500	3800	222	77.8	BLQ
Intra-orbital lacrimal gland	4050	2600	219	106	BLQ
Kidney cortex	8570	6120	773	231	73.2
Kidney medulla	5850	4210	430	204	59.2
Kidney(s)	8030	5640	725	230	70.1
Large intestine	2140	2010	684	ND[c]	63.0
Liver	17000	7770	1080	306	127
Lung(s)	2880	2190	270	160	61.9
Lymph node(s)	2470	1940	262	99.7	BLQ
Muscle	2340	1940	132	BLQ	ND
Myocardium	4710	3440	358	110	BLQ
Nasal turbinate	777	610	133	77.2	56.4
Pancreas	4080	3240	295	217	BLQ
Pituitary gland	3400	3160	255	79.4	56.9
Preputial gland	1760[d]	3060[d]	332[d]	108[d]	62.8[d]
Prostate gland	2210	2460	370	169	65.4
Salivary gland(s)	3790	3010	280	121	58.5
Seminal vesicle(s)	1590	2290	398	174	81.3
Skin (nonpigmented)	1340	1690	429	243	68.7

C Confidential

2.6.5.8.4　雄の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)				
	R0301	R0302	R0303	R0304	R0305
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	72 h
Small intestine	3770	5880	1130	524	79.6
Spinal cord	469	388	54.3	BLQ	ND
Spleen	3020	2210	245	76.9	BLQ
Stomach	ND[c]	3140	748	398	91.9
Testis(es)	546	1190	172	55.5	BLQ
Thymus	2250	1880	189	60.7	BLQ
Thyroid	3900	2630	256	121	BLQ
Urinary bladder	3510	ND[e]	1040	537	ND
Urine	6700	18700	15800	1390	254
Blood	3140	2640	547	314	124
Plasma	4640	3730	686	337	109

Abbreviations: M = male; DMSO = dimethyl sulfoxide; PEG 400 = polyethylene glycol 400; RO = reverse osmosis; P.O. = per oral; h = hour; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; LSC = liquid scintillation counting; BLQ = below the limit of quantitation (<54.2 ng equivalents [^{14}C]-MK-6482/g); ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); SD = Sprague Dawley.

[a] Radioluminography was used to quantitate the amount of radioactivity in tissue.

[b] LSC was used to quantitate radioactivity concentration in blood and plasma.

[c] Tissue ND due to flare from gastrointestinal contents.

[d] Tissue appeared to be fat soaked.

[e] Tissue ND due to flare from urine.

Additional Information: Distribution of MK-6482-related radioactivity was similar between male pigmented and non-pigmented rats, as was distribution to and retention in, pigmented and non-pigmented eye uveal tracts and skin, indicating little to no melanin binding.

C Confidential

2.6.5.8.5 雌の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.5.2: PK021]				
Species/Strain:	Rat/SD				
Gender (M/F)/Number of animals:	F/5 (one per time point)				
Feeding Condition:	Fasted				
Vehicle/Formulation:	20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO water (v/v/v)				
Method of Administration:	P.O.				
Dose (mg/kg):	10				
Radionuclide:	[^{14}C]-MK-6482				
Specific Activity (µCi/mg):	149.75				
Method of Analysis:	QWBA[a], LSC[b]				
Sampling Time:	0.5 to 72 h (post-dose)				
Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)				
	R0801	R0802	R0803	R0804	R0805
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	72 h
Adrenal gland(s)	ND[c]	4200[d]	543	68.0[d]	BLQ
Arterial wall	3970	3120	387	144	BLQ
Bile	NR	10600	2130	730	ND
Blood	4150	1540	515	190	85.4
Bone	384	171	60.0	BLQ	ND
Bone marrow	4120	1780	245	96.9	ND
Brain cerebellum	1020	436	BLQ	ND	ND
Brain cerebrum	994	404	60.5	BLQ	ND
Brain medulla	906	410	BLQ	ND	ND
Brain olfactory lobe	745	727	BLQ	ND	ND
Cecum	5090	ND[c]	670	447	BLQ
Diaphragm	6540	3050	292	BLQ	ND
Esophagus	5470	2480	1180	319	209
Exorbital lacrimal gland	5950	2170	257	70.0	BLQ
Eye lens	649	607	319	212	57.2
Eye uveal tract	2060	1750	249	72.8	BLQ
Eye(s)	960	712	173	94.3	BLQ
Fat (abdominal)	1760	1040	76.5	BLQ	ND
Fat (brown)	9020	3430	373	69.7	BLQ

C Confidential

2.6.5.8.5 雌の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)				
	R0801	R0802	R0803	R0804	R0805
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	72 h
Harderian gland	9440	3620	387	62.5	BLQ
Intra-orbital lacrimal gland	5680	2070	281	BLQ	BLQ
Kidney cortex	10500	5050	623	136	73.1
Kidney medulla	9560	4160	446	149	76.5
Kidney(s)	10400	4770	599	141	74.2
Large intestine	4270	4180	299	1100	BLQ
Liver	18800	6500	1260	292	126
Lung(s)	4320	2330	312	148	BLQ
Lymph node(s)	4040	2050	231	78.6	BLQ
Muscle	3710	1920	145	BLQ	ND
Myocardium	8120	3420	405	88.4	BLQ
Nasal turbinate	1810	649	138	75.1	ND
Ovary(ies)	5490[d]	2170[d]	321[d]	92.4[d]	BLQ[d]
Pancreas	7680	2910	264	68.7	BLQ
Pituitary gland	5950	3140	278	73.8	BLQ
Preputial gland	NR	3260[d]	672	125[d]	NR
Salivary gland(s)	7730	3200	340	102	BLQ
Skin (nonpigmented)	1610	1160	228	157	BLQ
Small intestine	8990	4780	1480	270	BLQ
Spinal cord	922	472	BLQ	ND	ND
Spleen	4880	2270	217	77.2	BLQ

C Confidential

2.6.5.8.5 雌の Sprague Dawley ラットに単回経口投与した際の組織分布（続き）

被験物質：MK-6482

Tissue or Matrix	Concentration Radioequivalents (ng-eq/g)				
	R0801	R0802	R0803	R0804	R0805
	0.5 h	4 h	8 h	24 h	72 h
Stomach	ND[c]	2800	768	267	117
Thymus	4350	1980	215	88.2	BLQ
Thyroid	NR	2970	318	141	BLQ
Urinary bladder	4400	ND[e]	ND[e]	148	ND
Urine	13000	16600	3660	1160	ND
Uterus	5440	2460	360	197	66.8
Blood	4990	2080	524	241	99.4
Plasma	6890	2330	646	232	85.7

Abbreviations: F = female; DMSO = dimethyl sulfoxide; PEG 400 = polyethylene glycol 400; RO = reverse osmosis; P.O. = per oral; h = hour; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; LSC = liquid scintillation counting; BLQ = below the limit of quantitation (<54.2 ng equivalents [^{14}C]-MK-6482/g); ND = not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); NR = not represented (tissue not present in section); SD = Sprague Dawley.

[a] Radioluminography was used to quantitate the amount of radioactivity in tissue.

[b] LSC was used to quantitate radioactivity concentration in blood and plasma.

[c] Tissue ND due to flare from gastrointestinal contents.

[d] Tissue appeared to be fat soaked.

[e] Tissue ND due to flare from urine.

Additional Information: Distribution of MK-6482-related radioactivity was similar between female pigmented and non-pigmented rats, as was distribution to and retention in, pigmented and non-pigmented eye uveal tracts and skin, indicating little to no melanin binding.

C Confidential

2.6.5.9　薬物動態：MK-6482及び PT3317の in vitro 血漿蛋白結合

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Test System	Plasma			
Method	Equilibrium dialysis			
Analytes	MK-6482, PT3317			
Assay	LC-MS/MS			
Report Number	[4.2.2.3.2: PK018]		[4.2.2.6.1: PK057]	
Species	MK-6482		PT3317	
	Concentration (µM)	Percent of Unbound [a]	Concentration (µM)	Percent of Unbound [b]
CD-1 Mouse/C57BL/6 Mouse [c]	10	44	1	49.4 ± 4.6
			10	38.0 ± 1.1
Sprague Dawley/ Wistar Han Rat [d]	10	45	1	17.5 ± 0.4
			10	18.6 ± 1.3
Beagle Dog	10	39	1	15.0 ± 0.6
			10	14.9 ± 0.9
Cynomolgus Monkey	10	48	NA	NA
Human	10	55	1	47.4 ± 2.4
			10	54.2 ± 3.8

Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; NA = not applicable.

[a] Values represent mean (n = 3).

[b] Values represent mean ± standard deviation (n = 6).

[c] MK-6482 was tested in CD-1 mouse plasma and PT3317 was tested in C57BL/6 mouse plasma.

[d] MK-6482 was tested in Sprague Dawley rat plasma and PT3317 was tested in Wistar Han rat plasma.

C Confidential

2.6.5.10　薬物動態：血液／血漿濃度比

被験物質：MK-6482

Test System	In vitro	
Report Number	[4.2.2.3.3: PK017]	
Matrix	Fresh blood and plasma	
Analytes	MK-6482	
Assay	LC-MS/MS	
Species	MK-6482 Blood Concentration (μM)	C_{blood}/C_{plasma} Ratio
Mouse	1	1.06 ± 0.03
Rat	1	0.93 ± 0.06
Dog	1	1.00 ± 0.02
Monkey	1	0.86 ± 0.09
Human	1	0.88 ± 0.08
Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry. Values represent mean ± standard deviation (n = 3).		

C Confidential

2.6.5.11　薬物動態：In vivo 代謝

2.6.5.11.1　ラット及びヒトにおける MK-6482の代謝

被験物質：MK-6482

Species/Strain	Rat/SD				Human
Report Number	[4.2.2.5.2: PK021]		[4.2.2.5.2: PK021]		[4.2.2.4.2: PK058] [a]
Gender/Number of animals/subjects	M/4 per time point (intact)	F/4 per time point (intact)	M/3 (BDC)	F/3 (BDC)	F/4, M/2
Feeding conditions	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle / Formulation	20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO water (v/v/v)		20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO water (v/v/v)		1% HPMC in 100% PEG 400 (w/v)
Method of Administration	P.O.		P.O.		P.O.
Dose	10 mg/kg		10 mg/kg		120 mg
Radionuclide	^{14}C		^{14}C		^{14}C
Specific Activity (µCi/mg)	149.75		149.75		1.7
Radioactivity Dose Solution (µCi/mg)	20.3		20.3		1.7
Biological Samples	Plasma, feces		Urine, bile		Plasma, Urine, Feces
Analyte(s)	MK-6482 and metabolites				
Assays	LC-MS/MS with off-line radiometric analysis fraction of LC column eluents				LC-HRMS with on-line or off-line radiometric analysis fraction of LC column eluents

Abbreviations: BDC = bile duct-cannulated; F = female; M = male; DMSO = dimethyl sulfoxide; HPMC = hypromellose; PEG 400 = polyethylene glycol 400; RO = reverse osmosis; P.O. = per oral; LC = liquid chromatography; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; LC-HRMS = liquid chromatograph-high resolution mass spectrometry; SD = Sprague Dawley.

[a] Samples were obtained from clinical study P008 [2.7.2.2 項].

Confidential

2.6.5.11.1　　ラット及びヒトにおける MK-6482の代謝（続き）

被験物質：MK-6482

Presence of MK-6482 and Metabolites in Plasma and Excreta[b]											
Species	Rat (Intact)		Rat (BDC)	Rat (BDC)	Rat (Intact)	Rat (BDC)	Rat (BDC)	Rat (Intact)	Human		
Report Number	[4.2.2.5.2: PK021]								[4.2.2.4.2: PK058][a]		
Gender	Male	Female	Male			Female			Male/Female		
Method of Administration	P.O.	P.O.	P.O.			P.O.			P.O.		
Biological Matrix	Plasma	Plasma	Urine	Bile	Feces	Urine	Bile	Feces	Plasma	Urine	Feces
Sample Pooling Interval (h)	0.25-168	0.25-168	0-24	0-48	0-48	0-24	0-48	0-48	0-48	0-96	0-144
MK-6482	45.56	59.23	3.83	-	-	2.32	-	0.82	73	6	Trace
M1 (Unidentified)	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	-	-
M2 (Thiocyanate)	23.72	29.70	-	-	-	0.15	-	-	2	-	-
M3 (Unidentified)	-	-	-	-	-	0.56	-	-	-	-	-
M4 (Oxidation and glucuronidation)	-	-	-	20.3	-	-	20.2	-	3	4	-
M5 (Unidentified)	-	-	-	-	-	0.15	-	1.03	-	-	-
M6 (Oxidative defluorination, glutathione conjugation)	-	-	-	6.78	-	-	6.92	-	-	-	-
M7 (Oxidative defluorination, glutathione conjugation)	-	-	-	9.51	-	-	11.3	-	-	-	-
M8 (Oxidative defluorination, glutathione conjugation)	-	-	-	22.8[c]	-	-	18.4[c]	-	-	-	-
M9 (Oxidation)	7.51	6.27	4.01		26.6	6.35		23.0	2	3	42
M10 (Oxidative defluorination, cysteine conjugation)	-	-	-	1.45	-	-	2.09	0.58	-	-	-
M11(Oxidative defluorination, cysteine conjugation)	5.29	1.85	-	3.01	-	-	5.02	0.82	-	-	-
M12 (Oxidative defluorination, cysteine-glycine)	2.22	-	-	4.41	-	-	3.36	-	-	-	-
M13 (Di-defluorination and sulfation)	-	-	-	-	1.01	-	-	-	-	-	-
M14 (Oxidative defluorination, mercaptan)	-	-	-	-	8.70	0.47	-	8.90	-	-	3
M15 (Oxidative defluorination, NAC)	9.56	1.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C Confidential

2.6.5.11.1 ラット及びヒトにおける MK-6482の代謝（続き）

被験物質：MK-6482

Presence of MK-6482 and Metabolites in Plasma and Excreta[a]											
Species	Rat (Intact)		Rat (BDC)	Rat (BDC)	Rat (Intact)	Rat (BDC)	Rat (BDC)	Rat (Intact)	Human		
Report Number	[4.2.2.5.2: PK021]								[4.2.2.4.2: PK058] [a]		
Gender	Male	Female	Male			Female			Male/Female		
Method of Administration	P.O.	P.O.	P.O.			P.O.			P.O.		
Biological Matrix	Plasma	Plasma	Urine	Bile	Feces	Urine	Bile	Feces	Plasma	Urine	Feces
Sample Pooling Interval (h)	0.25-168	0.25-168	0-24	0-48	0-48	0-24	0-48	0-48	0-48	0-96	0-144
M16 (PT3317, Direct glucuronide)	-	-	-	8.99	-	-	6.53	-	9	32	-
M17 (unidentified)	-	-	-	-	0.92	-	-	0.63	-	-	-
M18 (Oxidative defluorination, mercaptan)	-	-	-	-	8.64	0.33	-	6.64	-	-	2
M19 (unidentified)	-	-	0.64	-	0.67	0.71	-	-	-	-	-
M20 (Oxidative defluorination)	-	-	-	-	1.24	0.21	-	1.08	-	-	Trace
M21 (unidentified)	-	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	-
M22 (unidentified)	-	-	-	-	0.71	-	-	-	-	-	-
M23 (unidentified)	-	-	-	1.25	5.84	-	-	5.63	-	-	-
M26 (Oxidative defluorination, glucuronidation)	-	-	-	-	-	-	-	-	Trace	1	-
M27 (Oxidative defluorination, glucuronidation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
M28 (Hydrolysis of the cyano moiety to a carboxylic acid)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
M29 (Oxidation and defluorination)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Trace
M30 (Oxidative Di-defluorination)	-	-	-	-	-	-	-	-	Trace	Trace	-
M31 (Di-defluorination)	-	-	-	-	-	-	-	-	Trace	Trace	Trace
M32 (Oxidative decyanation, glucuronidation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Trace	-
M33 (Oxidative decyanation)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Trace

Abbreviation: $AUC_{0\text{-inf}}$ = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; BDC = bile duct-cannulated; HRMS = high resolution mass spectrometry; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; h = hour; IV = intravenous; P.O. = per oral; - = not detected or below the established limit of quantification (<1% of the radioactivity); NAC = *N*-acetylcysteine; Trace = observed by HRMS only, not included in the calculation of the % of the dose.

[a] Values represent percentages relative to the total integrated radioactivity in the plasma or percentages relative to the administered dose (bile, urine, and feces).

[b] Human metabolism data were obtained from samples from clinical study P008 [2.7.2.2 項].

[c] Combined values of M8 and M9.

Additional Information: Unidentified metabolites in [4.2.2.5.2: PK021] were quantified by radiochemical analysis, but no structural information could be elucidated under the conditions used. An additional study was conducted with male BDC SD rats following IV administration of MK-6482 at 2 mg/ml in 20% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v) [4.2.2.5.1: PK019], concentrations of parent compound and M16 (PT3317) in the bile were quantified by LC-MS/MS using synthetic standards. M16 had much higher concentrations than MK-6482 in rat bile. The mean recovery of MK-6482 and M16 in bile was about 3.36% of the dose. The plasma exposures of MK-6482 were much higher than PT3317. The $AUC_{0\text{-inf}}$ of MK-6482 and PT3317 were 927 and 5.6 h·ng/mL, respectively.

C Confidential

2.6.5.11.2　ラットに MK-6482を単回投与した際の PT3317の薬物動態

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.2.3: PK007]	[4.2.2.2.3: PK007]	[4.2.2.2.4: PK008]
Species/Strain	Rat/SD	Rat/SD	Rat/SD
Number of animals/Gender	3/M	3/M	3/M
Feeding condition	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	10% Dimethylacetamide, 10% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v/v)	10% Ethanol, 30% PEG 400, 60% (0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water)	10% Dimethylacetamide, 60% PEG 400, 30% water (v/v/v)
Method of administration	IV[a]	P.O.	P.O.
Dose (mg/kg)	1	10	10
Sample	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	PT3317	PT3317	PT3317
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters			
$t_{1/2}$ (h)	1.26	2.83	2.74
MRT (h)	1.80	4.06	4.12
AUC_{0-t} (ng·h/mL)	3.97	24.1	56.4
AUC_{0-inf} (ng·h/mL)	4.51	27.7	65.2
C_{max}(ng/mL)	NA	7.98	14.6
T_{max} (h)	NA	0.58	0.67
PT3317 AUC_{0-inf}/ MK-6482 AUC_{0-inf}(%)	0.4	1.6	NA

Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; $t_{1/2}$ = terminal half-life; AUC_{0-t}= area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable concentration; AUC_{0-inf}= area under the concentration-time curve from 0 to infinity; C_{max} = maximum concentration; SD = Sprague Dawley; MRT = mean residence time; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; PK = pharmacokinetics.
Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal (n=3)
[a] IV bolus.
Additional Information: PK parameters from parent compound MK-6482 from these studies are summarized in [2.6.5.5.1 項]. Concentrations of MK-6482 and PT3317 were also determined in urine following a single IV dose of MK-6482 [4.2.2.2.3: PK007], small amount of MK-6482 and PT3317 (<0.1% in total) were detected in urine in 0-24h post-dose.

Confidential

2.6.5.11.3　イヌに異なる用量及び製剤の MK-6482を投与した際の PT3317の薬物動態パラメータ

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.2.6: PK010]		[4.2.2.2.7: PK011]			
Species/Strain	Dog/Beagle		Dog/Beagle			
Number of animals/Gender	3/M	3/M	3/M	3/M	3/M	3/M
Feeding condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	20% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v)	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water			
Method of administration	IV[a]	P.O.	P.O.			
Dose (mg/kg)	1	5	1	10	30	100
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	PT3317		PT3317			
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters						
$t_{1/2}$ (h)	6.86	21.84	30.14	34.00	27.56	22.42
T_{max} (h)	NA	4	2	4	4	4
C_{max}(μg/mL)	NA	0.68	0.10	0.52	0.81	1.31
AUC_{0-t} (μg·h/mL)	2.48	7.06	1.89	6.75	10.12	13.75
AUC_{0-inf} (μg·h/mL)	2.64	11.38	2.82	9.53	15.56	17.86
PT3317 C_{max}/ MK-6482 C_{max}	NA	0.45	0.27	0.36	0.37	0.39
PT3317 AUC_{0-t} / MK-6482 AUC_{0-t}	0.25	0.43	0.24	0.26	0.22	0.23

Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; C_{max} = maximum concentration; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to maximum concentration; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable concentration; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; NA = not applicable; PK = pharmacokinetics.

Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal (n=3).

[a] IV bolus.

Additional Information: PK parameters from parent compound MK-6482 from these studies are summarized in [2.6.5.6.1 項]. The amount of PT3317 excreted in urine (0-24h post-dose) ranged from 2.1 to 13.3% of the administered dose following a single 1 mg/kg IV and 5 mg/kg P.O. administration of MK-6482 [4.2.2.2.6: PK010].

C Confidential

2.6.5.11.4　イヌに異なる製剤の MK-6482を経口投与した際の PT3317の薬物動態パラメータ

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.2.8: PK012] [a]		[4.2.2.2.9: PK013]	[4.2.2.2.10: PK014]		
Species/Strain	Dog/Beagle		Dog/Beagle	Dog/Beagle		
Number of animals/Gender	3/M	3/M	3/M	4/M	4/M	4/M
Feeding condition	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water		10% Dimethylacetamide, 60% PEG 400, 30% water (v/v/v)	SDD: HPMCAS-H[b]	SDD: CAP[c]	Lipid Formulation[d]
Method of administration	P.O.			P.O.		
Dose (mg/kg)	5	30	10	5	5	53 mg/dog
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	PT3317			PT3317		
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters						
$t_{1/2}$ (h)	16.20	20.48	36.7	16.8	14.3	25.6
T_{max} (h)	4.00	10.67	4.0	2.5	3.5	4.0
C_{max}(μg/mL)	0.46	0.97	1.1	1.1	1.1	0.5
AUC_{0-t} (μg·h/mL)	4.54	12.05	20.8	8.6	8.8	7.0
AUC_{0-inf} (μg·h/mL)	4.90	14.42	33.7	9.5	9.4	9.3
PT3317 C_{max}/MK-6482 C_{max}	0.39	0.28	0.18	0.3	0.3	0.4
PT3317 AUC_{0-t} / MK-6482 AUC_{0-t}	0.24	0.23	0.18	0.2	0.1	0.3

Abbreviations: M = male; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; $t_{1/2}$ = terminal half-life; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable concentration; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; C_{max} = maximum concentration; T_{max} = time to maximum concentration; PEG 400 = polyethylene glycol 400; [redacted]; PK = pharmacokinetics.

Values represent the means of PK parameters calculated from individual animal.

[a] Study was conducted with [redacted] MK-6482 ([redacted]).

[b] [redacted] was comprised of [redacted] ratio of MK-6482:[redacted] material was suspended in 1% methylcellulose and 1% Tween 80 in water (w/v).

[c] [redacted] was comprised of [redacted] ratio of MK-6482:[redacted] material was suspended in 1% methylcellulose and 1% Tween 80 in water (w/v).

[d] Lipid formulation was comprised of a [redacted]% solution of MK-6482 dissolved in a [redacted] ratio of [redacted], and [redacted]. Each [redacted] contained ~26.5 mg of MK-6482. Each dog was dosed with two [redacted] by oral gavage.

Additional information: PK parameters from parent compound MK-6482 from these studies are summarized in [2.6.5.6.2 項].

C Confidential

2.6.5.11.5　イヌに異なる錠剤の MK-6482を経口投与した際の PT3317の薬物動態パラメータの比較

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.2.11: PK015]	
Species/Strain	Dog/Beagle	
Number of animals/Gender	4/M	4/M
Feeding condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	MK-6482-F1 Tablet[a]	MK-6482-F3 Tablet[b]
Method of administration	P.O.	P.O.
Dose (mg/dog)	40	40
Normalized Dose (mg/kg)	3.80 ± 0.35	3.91 ± 0.18
Sample	Plasma	Plasma
Analyte	PT3317	PT3317
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters		
$t_{1/2}$ (h)	13.4 ± 5.0	NR
T_{max} (h)	1.8 ± 0.5	3.5 ± 1.0
C_{max}(μg/mL)	0.79 ± 0.31	0.57 ± 0.14
AUC_{0-t} (μg·h/mL)	10.5 ± 8.3	7.0 ± 1.3
AUC_{0-inf} (μg·h/mL)	11.9 ± 11.6	NR
PT3317 C_{max}/MK-6482 C_{max}	0.23 ± 0.06	0.24 ± 0.07
PT3317 AUC_{0-t}/MK-6482 AUC_{0-t}	0.23 ± 0.13	0.20 ± 0.04

Abbreviations: M = male; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; $t_{1/2}$ = terminal half-life; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable concentration; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; C_{max} = maximum concentration; T_{max} = time to maximum concentration; NR = not reported (could not determine due to the second peak in plasma concentration-time profiles); PK = pharmacokinetics.

Values represent mean ± standard deviation (n = 4).

[a] F1 tablet: [redacted].

[b] F3 tablet: [redacted].

Additional Information: PK parameters from parent compound MK-6482 from this study are summarized in [2.6.5.6.3 項]. The mean amounts of PT3317 excreted in urine (0-48 h post-dose) were 13% and 5% of the administered dose following a single oral tablet administration of MK-6482-F1 and MK-6482-F3 at 40 mg/dog, respectively. In a separate study [4.2.2.4.1: PK027], following a single oral administration of one 40 mg tablet of MK-6482-F1 or MK-6482-F3, dog urine samples collected up to 48 h were combined. The metabolite PT3317 was isolated from pooled dog urine by liquid-liquid extraction followed by flash chromatography purification. The structure of PT3317 was elucidated from liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopic data to be an O-glucuronide of MK-6482. The structure was further confirmed by comparison with chemical synthetic standard of PT3317.

C Confidential

2.6.5.11.6　サルに MK-6482を単回投与した際の PT3317の薬物動態パラメータ

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.2.12: PK016]	
Species/Strain	Monkey/Cynomolgus	
Number of animals/Gender	3/M	3/M
Feeding condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	20% Ethanol, 40% PEG 400, 40% water (v/v/v)	0.5% methylcellulose and 0.5% Tween 80 (w/v) in water
Method of administration	IV[a]	P.O.
Dose (mg/kg)	1	5
Sample	Plasma	Plasma
Analyte	PT3317	PT3317
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK parameters		
$t_{1/2}$ (h)	10.5	4.0
T_{max} (h)	NA	4.0
MRT (h)	11.3	10.3
C_{max}(µg/mL)	NA	0.51
AUC_{0-t} (µg·h/mL)	0.7	3.4
AUC_{0-inf} (µg·h/mL)	0.7	3.4
PT3317 C_{max}/MK-6482 C_{max}	NA	0.56
PT3317 AUC_{0-t} / MK-6482 AUC_{0-t}	0.15	0.28

Abbreviations: M = male; PEG 400 = polyethylene glycol 400; IV = intravenous; P.O. = per oral; h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; $t_{1/2}$ = terminal half-life; AUC_{0-t} = area under the concentration-time curve from 0 to the last quantifiable concentration; AUC_{0-inf} = area under the concentration-time curve from 0 to infinity; C_{max} = maximum concentration; MRT = mean residence time; T_{max} = time to maximum concentration; NA = not applicable; PK = pharmacokinetics.
Values represent the mean of PK parameters calculated from individual animal (n=3).
[a] IV bolus.
Additional Information: PK parameters from parent compound MK-6482 from this study are summarized in [2.6.5.7 項]. The amounts of PT3317 excreted in urine (0-48 h post-dose) were 1.18 and 1.13% of the administered dose following a single 1 mg/kg IV and 5 mg/kg P.O. administration of MK-6482.

Confidential

2.6.5.12　薬物動態：In vitro 代謝

2.6.5.12.1　血液中での MK-6482の安定性

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.4.3: PK022]				
Study System	In vitro				
Species/Matrix	Mouse, Rat, dog, monkey and human blood				
Method	MK-6482 (1 µM) was incubated with blood from mouse, rat, dog, monkey and human at 37°C for up to 240 min.				
Analyte	MK-6482				
Assays	LC-MS/MS				
Percent of MK-6482 Remaining					
Time point (min)	Mouse	Rat	Dog	Monkey	Human
10	99.9	106.5	96.7	100.5	101.2
30	99.9	102.1	98.0	96.7	100.0
60	94.6	96.6	106.6	97.4	104.5
120	99.0	101.7	112.4	94.2	102.4
240	101.6	98.7	110.0	96.0	102.5
Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography – tandem mass spectrometry; min = minute.					

C Confidential

2.6.5.12.2　肝ミクロソームでの MK-6482の代謝安定性

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.4.4: PK023]			
Study System	In vitro			
Species/Matrix	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes			
Method	MK-6482 (1 µM) was incubated with liver microsomes at 37°C for up to 30 min in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mg/mL microsomal protein and NADPH regenerating system.			
Analyte	MK-6482			
Assays	LC-MS/MS			
Matrix	Liver Microsomes			
Species	Q_h (mL/min/kg)	CL_h (mL/min/kg)	$t_{1/2}$ (min)	ER
Mouse	90	22	97	0.25
Rat	55.2	<6	>197	<0.10
Dog	30.9	<5	>197	<0.10
Monkey	43.6	<4	>197	<0.13
Human	20.7	4[a]	144[a]	0.21[a]

Abbreviations: CL_h = hepatic clearance; ER = hepatic extraction ratios; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography – tandem mass spectrometry; min = minute; $t_{1/2}$ = terminal half-life; Q_h = hepatic blood flow rate.
Values represent mean (n = 2 experiments, excepted where noted).
[a] Values represent n=1.
Additional information: CL_h was calculated using the “well stirred liver model”. An additional experiment was conducted with MK-6482 (3 µM) in mouse, rat, dog, monkey, and human cryopreserved hepatocytes [4.2.2.4.5: PK024]. Similar to liver microsomes, MK-6482 showed low turnover in cryopreserved hepatocytes with ER value <0.3 across species.

C Confidential

2.6.5.12.3　肝細胞での in vitro 代謝

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.4.7: PK038]		
Study System	In vitro		
Species/Matrix	Rat, dog, and human hepatocytes		
Method for Hepatocytes	[^{14}C]-MK-6482 (5 µM, 0.29 µCi/mL) was incubated with hepatocytes (2 x 10^6 viable cells/mL) from rat, dog and human at 37°C for 2 h		
Analyte	MK-6482 and metabolites		
Assays	LC-MS/MS and on-line radiometric detection		
Prominent Metabolites Detected in Hepatocytes[a]			
Metabolite	Rat	Dog	Human
MK-6482	+	+	+
M8 (Oxidative defluorination, glutathione conjugation)	+	-	-
M9 (Oxidation)	+	-	+
M16 (PT3317, Direct glucuronide)	+	+	+
M20 (Oxidative defluorination)	+	+	+

Abbreviations: h = hour; LC-MS/MS = liquid chromatography – tandem mass spectrometry; + = detected by mass spectrometry; - = Not detected.

[a] All metabolites were detected only by LC-MS/MS due to low metabolic turnover across species.

Additional information: In previous study conducted with cold MK-6482 at 3 µM in mouse, rat, dog, monkey and human hepatocytes [4.2.2.4.6: PK026], the metabolites identified by LC-MS/MS were qualitatively similar to those presented in the table, however, M16 (PT3317) was not detected.

C Confidential

2.6.5.12.4　HEPATOPAC®での in vitro 代謝

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.4.7: PK038]		
Study System	In vitro		
Species/Matrix	Rat, dog and human HEPATOPAC® co-culture		
Method for Hepatocytes	[^{14}C]-MK-6482 (5 µM, 0.29 µCi/mL) was incubated with co-cultured rat, dog and human hepatocytes (23,000 cells/well for rat and human, 50,000 cells/well for dog) at 37°C with 5% CO_2 for 7 days.		
Analyte	[^{14}C]-MK-6482 and metabolites		
Assays	LC-MS/MS with on-line radiometric detection		
Prominent Metabolites Detected in HEPATOPAC®			
Metabolite	Rat	Dog	Human
MK-6482	+	+	+
M9 (Oxidation)	+	-	-
M16 (PT3317, Direct glucuronide)	+	+	+
M24[a]	+	-	+
M25[a]	+	-	+

Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography – tandem mass spectrometry; + = detected; - = Not detected.

[a] M24 and M25 both have a mass of 580 were identified by mass spectrometry and radiometric detection. The mass (580) is consistent with a dual cysteine conjugate in mass. based on the fact that the HEPATOPAC® assay media was supplemented with cysteine and the absence of this analyte in hepatocyte suspensions [2.6.5.12.3 項], this is suspected to be an artifact of the assay.

Confidential

2.6.5.13　薬物動態：In vitro 及び in vivo で予想された代謝経路

被験物質：MK-6482
Report Number: [4.2.2.5.2: PK021] [4.2.2.4.7: PK038] [4.2.2.4.2: PK058]



Abbreviations: Gluc = glucuronidation; GSH = glutathione; Cys = cysteine; Gly = glycine; NAC = N-acetylcysteine; HP = human plasma; HU = human urine; HF = human feces; RP = rat plasma, RU = rat urine; RB = rat bile; RF = rat feces; RH, DH, HH = rat, dog and human hepatocytes; RHPAC, DHPAC, HHPAC = rat, dog, human HEPATOPAC.

2.6.5.14　薬物動態：ラットにおける排泄

被験物質：MK-6482

Report Number		[4.2.2.5.2: PK021]			
Species/Strain		Rat/Sprague Dawley (intact)		Rat/ Sprague Dawley (BDC)	
Gender / Number of animals		M/3	F/3	M/3	F/3
Feeding conditions		Fasted			
Vehicle / Formulation		20% DMSO, 40% PEG 400, 40% RO Water (v/v/v)			
Method of administration		P.O.	P.O.	P.O.	P.O.
Dose (mg/kg)		10	10	10	10
Radionuclide		^{14}C	^{14}C	^{14}C	^{14}C
Specific activity (µCi/mg)		149.75	149.75	149.75	149.75
Radioactivity of dose solution (µCi/mg)		20.3	20.3	20.3	20.3
Analyte(s)/Assay		Total Radioactivity/Liquid Scintillation Counting			
Matrix	Collection Time (h)	Percent of Dose Recovered			
Urine	Predose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	4	NS	NS	6.30 ± 1.99	8.80 ± 1.04
	8	12.9 ± 4.15	11.7 ± 1.60	1.93 ± 0.489	2.42 ± 0.614
	24	3.14 ± 0.845	6.05 ± 1.59	0.950 ± 0.543	1.61 ± 0.418
	48	0.964 ± 0.103	0.999 ± 0.311	0.312 ± 0.119	0.537 ± 0.286
	72	0.312 ± 0.143	0.338 ± 0.125	0.100 ± 0.0530	0.145 ± 0.0242
	96	0.140 ± 0.0358	0.194 ± 0.0995	0.0452 ± 0.0150	0.0604 ± 0.00925
	120	0.0868 ±0.0433	0.102 ± 0.0491	0.0359 ± 0.00258	0.0471 ± 0.0124
	144	0.0764 ± 0.0131	0.0759 ± 0.0328	0.0248 ± 0.00961	0.0416 ± 0.00558
	168	0.0527 ± 0.0121	0.0888 ± 0.0615	0.0184 ± 0.00688	0.0233 ± 0.00812
	Subtotal	17.7 ± 3.50	19.5 ± 2.84	9.72 ± 0.975	13.7 ± 0.849
Feces	Predose	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	24	56.2 ± 6.64	55.0 ± 5.74	0.560 ± 0.218	0.478 ± 0.140
	48	16.7 ± 10.4	12.9 ± 1.51	0.612 ± 0.236	0.713 ± 0.291
	72	0.562 ± 0.0352	1.34 ± 0.118	0.164 ± 0.0419	0.175 ± 0.0669
	96	0.191 ± 0.0507	0.295 ± 0.157	0.0733 ± 0.0113	0.0827 ± 0.0184
	120	0.127 ± 0.0316	0.120 ± 0.0134	0.0421 ± 0.00666	0.0438 ± 0.00520
	144	0.0813 ± 0.00348	0.0934 ± 0.0192	0.0277 ± 0.00888	0.0316 ± 0.0115
	168	0.0698 ± 0.0102	0.0729 ± 0.0625	0.0187 ± 0.00161	0.0191 ± 0.00414
	Subtotal	74.0 ± 4.45	69.8 ± 4.32	1.50 ± 0.491	1.54 ± 0.317

C Confidential

2.6.5.14　薬物動態：ラットにおける排泄（続き）

被験物質：MK-6482

Matrix	Collection Time (h)	Percent of Dose Recovered			
Bile	Predose	NA	NA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	2	NA	NA	28.6 ± 8.12	24.9 ± 3.68
	4	NA	NA	21.8 ± 4.02	23.0 ± 2.03
	8	NA	NA	22.0 ± 3.57	22.1 ± 0.878
	24	NA	NA	10.0 ± 6.51	7.10 ± 3.23
	48	NA	NA	2.27 ± 2.00	2.81 ± 2.64
	72	NA	NA	0.163 ± 0.108	0.151 ± 0.0877
	96	NA	NA	0.0441 ± 0.0130	0.0487 ± 0.00369
	120	NA	NA	0.0260 ± 0.00707	0.0339 ± 0.00554
	144	NA	NA	0.0189 ± 0.00550	0.0250 ± 0.00392
	168	NA	NA	0.0114 ± 0.0101	0.0119 ± 0.0109
	Subtotal	NA	NA	85.0 ± 0.830	80.2 ± 0.264
Cage rinse	144	0.940 ± 0.0968	1.19 ± 0.473	0.160 ± 0.0335	0.255 ± 0.0145
Cage wash	168	0.157 ± 0.0228	0.251 ± 0.112	0.0456 ± 0.0190	0.0544 ± 0.0323
Cage wipe	168	0.822 ± 0.422	2.46 ± 2.59	0.314 ± 0.296	0.116 ± 0.0172
Bile canula	168	NA	NA	0.0193 ± 0.00464	0.0608 ± 0.0257
Jacket rinse	168	NA	NA	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Carcass	168	0.969 ± 0.123	0.698 ± 0.0323	0.376 ± 0.0574	0.224 ± 0.0815
Total Recovered		94.6 ± 0.481	93.9 ± 2.69	97.1 ± 0.852	96.2 ± 1.00

Abbreviations: BDC = bile duct-cannulated; F = female; M = male; DMSO = dimethyl sulfoxide; PEG 400 = polyethylene glycol 400; RO = reverse osmosis; P.O. = per oral; NA = not applicable; NS = no sample collected; h = hour.
Values represent mean ± standard deviation (n = 3).

C Confidential

2.6.5.15　薬物動態：CYP 代謝分子種の同定

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.4.8: PK001]												
Type of Study	CYP reaction phenotyping												
Methods	[^{14}C]-MK-6482 (5 µM, 0.14 µCi/mL) was incubated with HLM (1 mg/mL) and recombinant CYPs (0.2 nmol/mL) in the presence of NADPH (1 mg/mL) at 37°C for 60 min.												
Analyte	[^{14}C]-MK-6482												
Assay(s)	LC-MS/MS with on-line radiometric detection												
Metabolite	Human CYP Isozymes												
	HLM	1A1	1A2	1B1	2A6	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4	3A5
MK-6482	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Abbreviation: CYP = cytochrome P450; HLM = human liver microsomes; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; + = detected by mass spectrometry and radioactivity; - = not detected. Additional information: The metabolic turnover of MK-6482 was low in HLM and recombinant CYP. A single hydroxylated metabolite was observed following incubation with CYP2C19 and CYP3A4.													

Confidential

2.6.5.16 薬物動態：UGT 代謝分子種の同定

被験物質：MK-6482

Type of Study	Recombinant UGT phenotyping	
Methods	1. MK-6482 (50 µM) was incubated with recombinant human UGT isoforms (0.4 mg/mL) treated with alamethicin (25 µg/mL) in the presence of UDPGA at 37°C for 60 min. The formation of PT3317 was monitored by LC-MS/MS [4.2.2.4.9: PK025]. 2. [^{14}C]-MK-6482 (5 µM, 0.29 µCi/mL) was incubated with recombinant human UGT isoforms (2 mg/mL) treated with alamethicin (50 µg/mg microsomal protein) in the presence of UDPGA at 37°C for 120 min. The formation of PT3317 was monitored by LC-MS/MS with on-line radiometric detection [4.2.2.4.7: PK038].	
Analyte	MK-6482 and [^{14}C]-MK-6482	
Assay(s)	LC-MS/MS, LC-MS/MS with on-line radiometric detection	
Report Number	[4.2.2.4.9: PK025]	[4.2.2.4.7: PK038]
Human UGT Isoform	PT3317/IS Peak Area Ratio (x100)[a]	PT3317
UGT1A1	ND	ND
UGT1A3	ND	ND
UGT1A4	ND	ND
UGT1A6	ND	ND
UGT1A7	ND	ND
UGT1A8	ND	ND
UGT1A9	ND	ND
UGT1A10	ND	ND
UGT2B4	NA	ND
UGT2B7	ND	ND
UGT2B10	NA	ND
UGT2B15	ND	ND
UGT2B17	0.39	+
Control supersomes	ND	ND

Abbreviation: UGT = uridine 5'- diphosphoglucuronosyl transferase; UDPGA = uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable; ND = Not detected; IS = internal standard; min = minute; + = detected by mass spectrometry and radioactivity.
Values represent means (n= 2).
[a] Peak area ratio was calculated relative to the internal standard.

Confidential

2.6.5.17　薬物動態：MK-6482及び PT3317によるヒト CYP 分子種の阻害作用

2.6.5.17.1　MK-6482及び PT3317によるヒト CYP 分子種の可逆的阻害作用

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Type of Study	Reversible inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4 by MK-6482 and PT3317		
Methods	Individual probe substrate of CYP enzymes was incubated with human liver microsomes in the presence of NADPH regenerating system with MK-6482 or PT3317 (0.39-300 μM) or positive control inhibitors.		
Analytical Method	LC-MS/MS		
Report Number		[4.2.2.6.2: PK053]	[4.2.2.6.3: PK054]
CYP Isoform	Probe Reaction	IC_{50} (μM)	
		Control Inhibitor	MK-6482	PT3317
1A2	Phenacetin *O*-Deethylation	0.007 ± 0.0005 α-Naphthoflavone	>300	>300
2B6	Bupropion Hydroxylation	0.262 ± 0.037 Ticlopidine	>300	250.55 ± 17.05
2C8	Amodiaquine N-Deethylation	0.128 ± 0.017 Montelukast	>300	203.89 ± 44.49
2C9	Diclofenac 4′-Hydroxylation	0.681 ± 0.025 Sulfaphenazole	>300	>300
2C19	*S*-Mephenytoin 4′-Hydroxylation	0.179 ± 0.004 (S)-(+)-N-3-Benzylnirvanol	280.54 ± 21.84	>300
2D6	Dextromethorphan *O*-Demethylation	0.085 ± 0.008 Quinidine	>300	>300
3A4	Midazolam 1′-Hydroxylation	0.024 ± 0.002 Ketoconazole	>300	166.56 ± 12.55
3A4	Testosterone 6β-Hydroxylation	0.031 ± 0.002 Ketoconazole	>300	>300

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition.
IC_{50} values were reported as mean ± standard error (n=3).

C Confidential

2.6.5.17.2　MK-6482及び PT3317によるヒト CYP3A4の時間依存的阻害作用

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Report Number	[4.2.2.6.4: PK055] [4.2.2.6.5: PK056]						
Type of Study	Time-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A by MK-6482 and PT3317 in human liver microsomes						
Methods	Probe substrates of CYP isoforms were incubated in human liver microsomes enriched with NADPH in the presence of MK-6482 or PT3317 (10 and 300 µM) or the positive control inhibitors to assess the potential of TDI for CYP isoforms						
Analytical Method	LC-MS/MS						
CYP Isoform	K_{obs} (min^{-1})						
	Negative control inhibitor (methanol)	Positive control inhibitor		MK-6482 (10 µM)	MK-6482 (300 µM)	PT3317 (10 µM)	PT3317 (300 µM)
CYP1A2	0.013	Furafyline	0.027 (0.5 µM) 0.088 (8 µM)	0.019	0.029	0.010	0.015
CYP2B6	0.005	Thio-TEPA	0.046 (9.4 µM) 0.058 (150 µM)	0.005	0.018	0.004	0.002
CYP2C8	0.000 [c]	Gemfibrozil glucuronide	0.000 [c] (3.1 µM) 0.049 (50 µM)	0.000 [c]	0.016	0.000 [c]	0.000 [c]
CYP2C9	0.004	Tienilic acid	0.114 (1.25 µM) 0.099 (20 µM)	0.006	0.012	0.006	0.004
CYP2C19	0.003	S-Fluoxetine	0.005 (15.6 µM) 0.033 (250 µM)	0.003	0.006	0.004	0.003
CYP2D6	0.012	Paroxetine	0.050 (0.63 µM) 0.102 (10 µM)	0.020	0.017	0.014	0.015
CYP3A[a]	0.009	Erythromycin	0.021 (3 µM) 0.042 (48 µM)	0.009	0.016	0.006	0.019
CYP3A[b]	0.004	Erythromycin	0.006 (3 µM) 0.024 (48 µM)	0.004	0.012	0.007	0.011

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; NADPH = reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; LC-MS/MS = liquid chromatography - tandem mass spectrometry; K_{obs} = rate constant; min = minute; TDI = time-dependent inhibition.

[a] Midazolam was used as the probe substrate.

[b] Testosterone was used as the probe substrate.

[c] The calculated line for inactivation exhibited a positive slope; therefore, the K_{obs} value was reported as 0.

Additional Information: The enzyme activities that were used to evaluate MK-6482 and PT3317 inhibition of CYPs included phenacetin O-deethylase (CYP1A2), efavirenz 8'-hydroxylase (CYP2B6), amodiaquine N-deethlylase (CYP2C8), diclofenac 4'-hydroxylase (CYP2C9), (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19), bufuralol 1'-hydroxylase (CYP2D6), midazolam 1'-hydroxylase (CYP3A), and testosterone 6β-hydroxylase (CYP3A). MK-6482 or PT3317 was preincubated with human liver microsomes (1 mg/mL for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A testosterone; 2 mg/mL for CYP2C19; 0.5 mg/mL for CYP3A midazolam) enriched with NADPH in 100 mM phosphate buffer at 37°C at selected time points from 0 to 30 min. At each time point, aliquots of the reaction mixture were diluted with the same buffer containing probe substrates. The incubation was continued for an additional time for each specific isoform from 1 to 25 min at 37°C.

C Confidential

2.6.5.18 薬物動態：MK-6482及び PT3317によるヒト UGT の阻害作用

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Type of Study	UGT Inhibition by MK-6482 and PT3317					
Methods	In vitro evaluation of MK-6482 or PT3317 (0.3 -300 µM) as an inhibitor of human UGT1A1, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B7 and UGT2B17 in human liver microsomes (0.01 mg/mL) or cDNA-derived recombinant enzymes (0.05 mg/mL) in the presence of UDPGA (5 mM) and alamethicin (25 µg/mL).					
Analytical Method	LC-MS/MS					
Report Number			[4.2.2.6.6: PK050]		[4.2.2.6.7: PK051]	
UGT Isoform	Test System	Probe Substrate	MK-6482		PT3317	
			IC_{50} (µM)	Inhibition at Highest Concentration Tested	IC_{50} (µM)	Inhibition at Highest Concentration Tested
1A1	HLM	17β-Estradiol (10 µM)	>300	41% at 300 µM	149	62% at 300 µM
1A4	HLM	Trifluoperazine (10 µM)	>300	23% at 300 µM	>300	-43% at 300 µM
1A6	HLM	Deferiprone (10,000 µM)	>300	8% at 300 µM	>300	13% at 300 µM
1A9	HLM	Propofol (10 µM)	>300	13% at 300 µM	>300	32% at 300 µM
2B7	HLM	Zidovudine (500 µM)	>300	25% at 300 µM	>300	45% at 300 µM
2B17	cDNA-expressed	Scopoletin (100 µM)	45	88% at 300 µM	>300	51% at 300 µM

Abbreviations: UGT = uridine 5'- diphosphoglucuronosyl transferase; UDPGA = uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; HLM = human liver microsomes; cDNA = complementary deoxyribonucleic acid; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry.
Values represent means (n=3).
Additional information: Known inhibitors of the respective UGT isoforms were included as positive controls. The IC_{50} values for positive control inhibitors were within acceptance criteria, confirming the functionality of the assay.

C Confidential

2.6.5.19　薬物動態：MK-6482によるヒト CYP 分子種の誘導作用

2.6.5.19.1　MK-6482によるヒト CYP1A2の誘導作用

被験物質：MK-6482

Report Number		[4.2.2.6.8: PK031]					
Type of Study		CYP1A2 Induction					
Methods		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with MK-6482 (0.1 to 30 µM), or the positive control inducer omeprazole (50 µM) for 72 h.					
Analytical Methods		mRNA quantitation by real time PCR.					
Donor ID		HC10-10		HC10-8		HC7-8	
Treatment	µM	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]
Omeprazole	50	73.8	100	43.9	100	39.1	100
MK-6482	0.1	1.14	0.19	0.96	-0.084	1.12	0.32
	0.3	1.20	0.28	1.02	0.056	1.40	1.05
	1	1.40	0.55	1.08	0.19	1.53	1.40
	3	1.36	0.50	0.81	-0.45	1.50	1.31
	10	1.59	0.81	0.88	-0.27	1.33	0.86
	30	1.39	0.54	0.86	-0.34	1.14	0.35

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; h = hour; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction.

[a] Fold change represents the mean fold change of treated samples compare to vehicle control samples (n =3).

[b] The level of mRNA expression relative to the positive control (n =3).

Additional Information: Under the condition tested, MK-6482 did not induce CYP1A2 mRNA across the three lots. Omeprazole was used as the positive control.

C Confidential

2.6.5.19.2　MK-6482によるヒトCYP2B6の誘導作用

被験物質：MK-6482

Report Number		[4.2.2.6.8: PK031]					
Type of Study		CYP2B6 Induction					
Methods		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with MK-6482 (0.1 to 30 µM), or the positive control inducer phenobarbital (750 µM) for 72 h.					
Analytical Methods		mRNA quantitation by real time PCR					
Donor ID		HC10-10		HC10-8		HC7-8	
Treatment	µM	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]
Phenobarbital	750	10.4	100	10.4	100	20.1	100
MK-6482	0.1	0.70	-3.22	1.01	0.15	0.67	-1.74
	0.3	0.63	-3.93	0.91	-0.99	0.91	-0.50
	1	0.66	-3.65	0.99	-0.15	1.16	0.83
	3	0.63	-3.99	0.81	-2.04	1.31	1.63
	10	0.81	-2.03	0.89	-1.17	1.53	2.78
	30	1.49	5.24	1.44	4.70	2.64	8.61

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; h = hour; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction.

[a] Fold change represents the mean fold change of treated samples compare to vehicle control samples (n =3).

[b] The level of mRNA expression relative to the positive control (n =3).

Additional Information: Under the condition tested, MK-6482 showed a concentration-dependent induction response of CYP2B6 mRNA in one donor (HC7-8), with a maximal 2.64-fold increase and 8.61% of the positive control at 30 µM. Phenobarbital was used as the positive control.

Confidential

2.6.5.19.3　MK-6482によるヒト CYP3A4の誘導作用

被験物質：MK-6482

Report Number		[4.2.2.6.8: PK031]					
Type of Study		CYP3A4 Induction					
Methods		Plated cryopreserved human hepatocytes from three donors were incubated with MK-6482 (0.1 to 30 µM), or the positive control inducer rifampin (20 µM) for 72 h.					
Analytical Methods		mRNA quantitation by real time PCR					
Donor ID		HC10-10		HC10-8		HC7-8	
Treatment	µM	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]	mRNA Fold Change[a]	Percent Positive Control[b]
Rifampicin	20	7.35	100	7.67	100	95.6	100
MK-6482	0.1	1.28	4.47	1.08	1.20	0.86	-0.15
	0.3	1.46	7.27	1.20	2.95	1.06	0.06
	1	1.75	11.8	1.13	2.01	1.66	0.70
	3	2.57	24.7	1.26	3.85	2.65	1.75
	10	4.91	61.5	2.27	19.1	6.20	5.50
	30	8.87	124	3.40	35.9	16.1	16.0

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; h = hour; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction.

[a] Fold change represents the mean fold change of treated samples compare to vehicle control samples (n =3).

[b] The level of mRNA expression relative to the positive control (n =3).

Additional Information: Under the condition tested, MK-6482 showed a concentration-dependent induction response in CYP3A4 mRNA levels across the three donors with a maximal 3.4 to 16.1-fold increase and 16 to 124% the positive control at 30 µM. The CYP3A4 induction risk was further assessed by determining the Relative Induction Score (RIS) [2.6.5.19.4 項].

Confidential

2.6.5.19.4　ヒト CYP3A4の誘導作用（Relative Induction Score 法）

被験物質：MK-6482

Report Number		[4.2.2.6.9: PK045]			
Type of Study		CYP3A4 Induction			
Methods		Plated cryopreserved human hepatocytes from two donors were incubated with MK-6482 (0.25 to 250 µM), or the positive control inducer rifampin (10 µM) for 48 h			
Analytical Methods		mRNA quantitation by real time PCR			
Lot#		Lot 336		Lot 385	
Treatment	µM	CYP3A4 mRNA		CYP3A4 mRNA	
		Fold change[a]	% of PC[b]	Fold change[a]	% of PC[b]
Rifampicin	10	47.6	100.0	58.1	100.0
MK-6482	0.25	1.5	1.0	2.2	2.0
	1.25	2.6	3.5	2.3	2.3
	2.5	3.3	4.8	3.5	4.4
	12.5	10.4	20.1	13.6	22.1
	25	15.1	30.2	25.1	42.2
	50	16.2	32.6	33.3	56.6
	75	15.8	31.7	32.0	54.3
	100	16.0	32.3	28.6	48.3
	125	16.1	32.4	24.1	40.4
	150	15.2	30.4	19.1	31.7
	200	12.2	24.1	14.5	23.7
	250	13.2	26.1	11.7	18.7

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; h = hour; mRNA = messenger ribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; PC = positive control; EC_{50}=concentration achieving 50% maximal induction; E_{max} = maximal observed inductive response; RIS = relative induction score.

[a] Fold represents the mean fold change of treated samples compared to vehicle control samples.

[b] % of PC represents the percent of induction relative to positive control rifampin corrected for vehicle control.

Values represent means (n=3).

Additional Information: CYP3A4 induction potential of MK-6482 was evaluated in two lots of human hepatocytes calibrated for RIS assessment. EC_{50} and E_{max} values were determined from the concentration-dependent response of MK-6482 (0.25 to 250 µM) for RIS calculation. Rifampin (0.01 to 50 µM) was used as a positive control, confirming functionality of the assay.

C Confidential

2.6.5.19.4 ヒト CYP3A4の誘導作用（Relative Induction Score 法）（続き）

被験物質：MK-6482

Donor	Compound	$C_{max,u}$ (μM)	EC_{50} (μM)	E_{max} (fold increase over solvent control)	RIS	Projected decrease MDZ AUC (%)[a]
Lot 336	MK-6482	2.6	5.4 ± 1.6	15.2 ± 0.75	4.9	92.8
	Rifampicin	3.6	1.3 ± 0.23	60.8 ± NA[b]	44.8	93.7
Lot 385	MK-6482	2.6	13.1 ± 2.0	29.5 ± 2.0	4.9	81.5
	Rifampicin	3.6	0.39 ± 0.14	67.6 ± 5.0	61.3	93.9

Abbreviations: C_{max} = maximum plasma concentration, $C_{max,u}$ = unbound C_{max}; $F_{u,p}$ = fraction of unbound in plasma; EC_{50} = concentration achieving 50% maximal induction, E_{max} = maximal observed inductive response; RIS = relative induction score; MDZ = midazolam; AUC = area under the concentration-time curve; NA = not available.

[a] MDZ AUC decrease ≥20% does indicate a potential clinical drug-drug interaction risk.

[b] No discernible plateau for E_{max} is obtained. The E_{max} was constrained with maximum induction observed to estimate the EC_{50}.

Data represent mean ± standard error (n=3).

Additional Information: The EC_{50} and E_{max} values of MK-6482 obtained in vitro together with the $C_{max,u}$ value at 120 mg dose (total C_{max} =4.67 μM (1.79 μg/mL) [2.7.2.2 項], $F_{u,p}$ 0.55 and $C_{max,u}$ 2.6 μM) were used to calculate the RIS (RIS = $(E_{max} \times C_{max,u})/ (EC_{50} + C_{max,u})$). The RIS modeling in both lots predicted 92.8% and 81.5% reduction in the AUC of midazolam at the anticipated clinical exposure, indicating a potential clinical drug-drug interaction risk for this compound at 120 mg.

C Confidential

2.6.5.20　薬物動態：MK-6482及び PT3317の in vitro での MDCK 細胞単層膜透過性

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Report Number	[4.2.2.2.13: PK003]			
Type of Study	Permeability			
Methods	In vitro permeability of MK-6482 and PT3317 across MDCK-MDR1 cell monolayers. Digoxin was used as a positive control.			
Analytical Method	LC-MS/MS			
Compound	Concentration (μM)	P_{app} A-B (x 10^{-6} cm/s)	P_{app} B-A (x 10^{-6} cm/s)	Efflux Ratio
MK-6482	1	34.36	49.95	1.5
PT3317	2	0.40	0.13	0.3
PT3317	5	0.20	0.17	0.9
Digoxin	1	0.44	17.94	40.5
Digoxin	5	0.7	26.5	39.4

Abbreviations: MDCK-MDR1 = Madin darby canine kidney cell line stably expressing human multidrug resistance P-glycoprotein; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; P_{app} = apparent permeability; P-gp = P-glycoprotein.
Values represent means.
Additional Information: MK-6482 exhibited high permeability in MDCK-MDR1 cell monolayers (34.36 × 10^{-6} cm/s). PT3317 exhibited low permeability in MDCK-MDR1 cell monolayers (0.2-0.4 × 10^{-6} cm/s). The efflux ratios of MK-6482 and PT3317 across MDCK-MDR1 cells were all less than 2, suggesting neither compound is a substrate of P-gp.

C Confidential

2.6.5.21 薬物動態：薬物トランスポーターの基質としての MK-6482及び PT3317の評価

2.6.5.21.1 ヒト及びラット P-糖蛋白質の基質としての MK-6482の評価

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]					
Type of Study	Transporter phenotyping					
Methods	Bi-directional transport of MK-6482 across LLC-PK1, LLC-PK1-MDR1 and LLC-PK1-Mdr1a Cell Monolayers.					
Analyte	MK-6482					
Analytical Method	LSC					
Compound	Concentration (µM)	Inhibitor (CsA, 10 µM)	BA/AB Efflux Ratio			LLC-PK1 P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)
			LLC-PK1	LLC-PK1- MDR1	LLC-PK1-Mdr1a	
[^{14}C]-MK-6482	0.1	-	0.9	2.4	8.3	29.4
		+	0.8	1.0	1.0	30.2
	1	-	0.9	2.5	5.4	29.2
		+	0.7	0.7	0.8	29.6
[^{3}H]-Verapamil	1	-	0.8 [a]	6.5	6.7	26.8
		+	0.7 [a]	0.9	0.8 [a]	25.6

Abbreviations: LLC-PK1 = Lilly Laboratories Cell Porcine Kidney 1 cells; LLC-PK1-MDR1 = LLC-PK1 cells stably expressing human multidrug resistance P-glycoprotein; LLC-PK1- Mdr1a = LLC-PK1 cells stably expressing rat multidrug resistance P-glycoprotein; CsA = cyclosporin A; LSC = liquid scintillation counting; - = without inhibitor; + = with inhibitor.

[a] Average % mass balance of [^{3}H]verapamil was 66.5%, 69.6%, and 66.9% in LLC-PK1 without CsA, LLC-PK1 with CsA, and LLC-PK1-Mdr1a cells with CsA respectively.

Values represent means (n = 3).

Additional Information: Bi-directional transport of MK-6482 was evaluated in LLC-PK1 cells and LLC-PK1 cells stably expressing human MDR1 or rat Mdr1a. [^{3}H]verapamil (1.0 µM) was used as a positive control substrate and CsA (10 µM) as a positive control inhibitor. Under the conditions tested, MK-6482 was a substrate of rat Mdr1a and a weak substrate of human MDR1 P-gp.

C Confidential

2.6.5.21.2 ヒト BCRP の基質としての MK-6482及び PT3317の評価

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Report Number	[4.2.2.2.13: PK003]					
Type of Study	Transporter phenotyping					
Methods	Bi-directional transport of MK-6482 and PT3317 in MDCKII-BCRP cells					
Analytical Method	LC-MS/MS					
Compound	Concentration (μM)	Inhibitor (Concentration)	P_{app} B-A (x 10^{-6} cm/s)	P_{app} A-B (x 10^{-6} cm/s)	Efflux Ratio (P_{app} B-A)/(P_{app} A-B)	Inhibition (%)
MK-6482	1	-	22.2 ± 2.36	23.2 ± 3.98	0.96 ± 0.10	-
	1	Ko143 (1 μM)	21.6 ± 2.84	26.4 ± 4.53	0.82 ± 0.11	ND
PT3317	1	-	0.83 ± 0.019	0.40 ± 0.095	2.09 ± 0.048	-
	1	Ko143 (1 μM)	0.92 ± 0.057	0.42 ± 0.063	2.20 ± 0.14	ND
Prazosin	2	-	58.0 ± 4.67	3.37 ± 0.433	17.2 ± 1.39	-
	2	Ko143 (1 μM)	28.0 ± 0.38	12.0 ± 0.210	2.32 ± 0.032	91.8 ± 0.195

Abbreviations: MDCKII = Madin Darby canine kidney cell line II; BCRP = breast cancer resistance protein; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; P_{app} = apparent permeability; Ko143 = tert-butyl 3-[(3S,6S,12aS)-9-methoxy-6-(2-methylpropyl)-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12a-octahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-3yl]propanoate; - = without inhibitor; ND = not determined due to lack of inhibition.
Values represent mean ± standard deviation (n =3).
Additional Information: Bi-directional transport of MK-6482 and PT3317 (1 μM) was measured across monolayers of MDCKII cells stably expressing human BCRP in the presence or absence of the BCRP inhibitor Ko143 (1 μM). Bi-directional transport prazosin (2 μM) was measured as a positive control substrate. No directional transport of MK-6482 and PT3317 observed in MDCKII-BCRP cells, indicating that neither compound is a substrate of BCRP.

C Confidential

2.6.5.21.3　ヒト BCRP 及びラット Bcrp の基質としての MK-6482の評価

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]					
Type of Study	Transporter phenotyping					
Methods	Bi-directional transport of MK-6482 across MDCKII, MDCKII-BCRP and MDCKII-Bcrp Cell Monolayers.					
Analyte	MK-6482					
Analytical Method	LSC					
Compound	Concentration (μM)	Inhibitor (Ko143, 5 μM)	BA/AB Efflux Ratio			MDCKII P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)
			MDCKII	MDCKII- BCRP	MDCKII-Bcrp	
[^{14}C]-MK-6482	0.1	-	1.2	1.7	0.8	25.7
		+	1.3	1.1	0.8	25.2
	1	-	0.9	1.3	0.8	24.4
		+	1.0	1.0	1.0	27.9
[^{3}H]-Prazosin	1	-	1.0	19.5	35.5	28.5
		+	1.0	0.9	0.7	27.3

Abbreviations: MDCKII = Madin Darby canine kidney cell line II; BCRP = human breast cancer resistance protein; Bcrp = rat breast cancer resistance protein; LSC = liquid scintillation counting; P_{app} = apparent permeability; Ko143 = tert-butyl 3-[(3S,6S,12aS)-9-methoxy-6-(2-methylpropyl)-1,4-dioxo-1,2,3,4,6,7,12,12a-octahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indol-3yl]propanoate; - = without inhibitor; + = with inhibitor.
Values represent mean (n = 3).
Additional Information: Bi-directional transport of MK-6482 (0.1 and 1 μM) was measured across monolayers of MDCKII cells stably expressing human BCRP in the presence or absence of the BCRP inhibitor Ko143 (5 μM). Bi-directional transport of prazosin (1 μM) was measured as a positive control substrate. No directional transport of MK-6482 in MDCKII-BCRP MDCKII-Bcrp cells, indicating that MK-6482 is not a substrate of BCRP, consistent with the results presented in [2.6.5.21.2 項].

C Confidential

2.6.5.21.4　ヒト凍結肝細胞における MK-6482の取込み能

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Method	In vitro uptake of [^{14}C]-MK-6482 at 0.5 µM in cryopreserved human hepatocytes with or without hepatic transporter cocktail inhibitors in the presence of 1 % BSA				
Analyte	MK-6482				
Analytical Method	LSC				
Substrate	Concentration (µM)	Time (min)	(-) Cocktail inhibitors (pmoles/10^6 cells)	(+) Cocktail inhibitors (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]
[^{14}C]-MK-6482	0.5	0	4.556 ± 0.251	4.711 ± 1.245	1.0
		0.5	5.658 ± 0.413	6.244 ± 0.294	0.9
		1	6.317 ± 0.792	6.923 ± 0.758	0.9
		2	6.749 ± 0.361	8.190 ± 0.449	0.8
		5	8.113 ± 1.230	8.282 ± 1.139	1.0
[^{3}H]-$E_2$17βG	1.0	5	10.578 ± 0.421	3.916 ± 0.129	2.7
[^{3}H]-CCK8	0.005	5	0.019 ± 0.001	0.004 ± 0.001	5.1
[^{3}H]-TCA	1.0	5	42.610 ± 0.743	4.862 ± 0.258	8.8
[^{14}C]-TEA	1.0	5	7.835 ± 0.094	2.117 ± 0.247	3.7

Abbreviations: BSA = Bovine serum albumin; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; $E_2$17βG = estradiol-17β-D-glucuronide; CCK8 = Cholecystokinin octapeptide; TCA = taurocholic acid; TEA = tetraethylammonium; CsA = cyclosporin A; TCDC = taurochenodeoxycholate; OATP1B1 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1; OATP1B3 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3; OCT1 = Organic Cation Transporter 1; NTCP = Sodium/Taurocholate Co-transporting Polypeptide.

[a] Fold difference is calculated by dividing the hepatic uptake without cocktail inhibitors by that with cocktail inhibitors.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

Additional Information: The hepatic transporter inhibitor cocktail was composed of CsA (10 µM), rifamycin SV (10 µM), rifampin (100 µM), quinidine (50 µM), and TCDC (50 µM). In cryopreserved human hepatocytes, there is no difference in the uptake of [^{14}C]-MK-6482 (0.5 µM) with and without transporter cocktail inhibitors. These data suggest that OATP1B1 and OATP1B3 have limited impact on uptake of MK-6482 in human hepatocytes. Active uptake was observed in human hepatocytes with positive control substrates, $E_2$17βG (1 µM, OATP1B1/OATP1B3), CCK8 (5 nM, OATP1B3), TCA (1 µM, NTCP) and TEA (1 µM, OCT1), and was inhibited by inhibitor cocktail, confirming the presence of functional uptake transporters in the human hepatocytes tested. Similar results were observed with [^{14}C]-MK-6482 at 1 µM.

C Confidential

2.6.5.21.4 ヒト凍結肝細胞における MK-6482の取込み能（続き）

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]								
Type of Study	Transporter phenotyping								
Methods	In vitro uptake of [^{14}C]-MK-6482 at 0.5 µM in cryopreserved human hepatocytes with or without hepatic transporter cocktail inhibitors or unlabeled MK-6482 in the presence of 1 % BSA								
Analyte	MK-6482								
Analytical Method	LSC								
Substrate	Concentration (µM)	Time (min)	(-) Cocktail inhibitors (pmoles/10^6 cells)	(+) Cocktail inhibitors (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]	(+) 100 µM unlabeled MK-6482	Fold difference of uptake[b]	(+) 200 µM unlabeled MK-6482	Fold difference of uptake[c]
[^{14}C]-MK-6482	0.5	0	4.447 ± 1.386	4.712 ± 0.786	0.9	4.512 ± 0.281	1.0	5.126 ± 0.515	0.9
		0.5	4.605 ± 1.389	6.313 ± 0.201	0.7	4.660 ± 1.036	1.0	5.039 ± 1.010	0.9
		1	6.274 ± 1.122	5.364 ± 0.557	1.2	3.728 ± 0.323	1.7	5.906 ± 0.641	1.1
		2	5.565 ± 0.734	6.695 ± 0.803	0.8	6.099 ± 0.828	0.9	5.974 ± 0.923	0.9
		5	6.796 ± 1.237	7.114 ± 1.051	1.0	6.542 ± 0.508	1.0	6.656 ± 1.183	1.0
[^{3}H]-$E_2$17βG	1.0	5	8.688 ± 0.568	2.179 ± 0.237	4.0	NA			
[^{3}H]-CCK8	0.005	5	0.090 ± 0.003	0.002 ± 0.0003	49.1				
[^{3}H]-TCA	1.0	5	38.791 ± 0.731	4.032 ± 0.224	9.6				
[^{14}C]-TEA	1.0	5	7.193 ± 0.414	1.882 ± 0.090	3.8				

Abbreviations: BSA = Bovine serum albumin; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; $E_2$17βG = estradiol-17β-D-glucuronide; CCK8 = Cholecystokinin octapeptide; TCA = taurocholic acid; TEA = tetraethylammonium; CsA = cyclosporin A; TCDC = taurochenodeoxycholate; OATP1B1 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1; OATP1B3 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3; OCT1 = Organic Cation Transporter 1; NTCP = Sodium/Taurocholate Co-transporting Polypeptide; NA = not applicable.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

[a] Fold difference is calculated by dividing the hepatic uptake without cocktail inhibitors by that with cocktail inhibitors.

[b] Fold difference is calculated by dividing the hepatic uptake without cocktail inhibitors and unlabeled MK-6482 by that with 100 µM unlabeled MK-6482.

[c] Fold difference is calculated by dividing the hepatic uptake without cocktail inhibitors and unlabeled MK-6482 by that with 200 µM unlabeled MK-6482.

Additional Information: The hepatic transporter inhibitor cocktail was composed of CsA (10 µM), rifamycin SV (10 µM), rifampin (100 µM), quinidine (50 µM), and TCDC (50 µM). In cryopreserved human hepatocytes, there is no difference in the uptake of [^{14}C]-MK-6482 (0.5 µM) with and without transporter cocktail inhibitors. Active uptake was observed in human hepatocytes with positive control substrates, $E_2$17βG (1 µM, OATP1B1/OATP1B3), CCK8 (5 nM, OATP1B3), TCA (1 µM, NTCP) and TEA (1 µM, OCT1), and was inhibited by inhibitor cocktail, confirming the presence of functional uptake transporters in the human hepatocytes tested. Additionally, there is no difference in the uptake profiles of 0.5 µM [^{14}C]-MK-6482 in the presence or absence of 100 or 200 µM unlabeled MK-6482.

C Confidential

2.6.5.21.5 ヒト凍結肝細胞における PT3317の取込み能

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	In vitro uptake of PT3317 at 2 µM in cryopreserved human hepatocytes with or without hepatic transporter cocktail inhibitors				
Analyte	PT3317				
Analytical Method	LC-MS/MS, LSC				
Substrate	Concentration (µM)	Time (min)	(-) Cocktail inhibitors (pmoles/10^6 cells)	(+) Cocktail inhibitors (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]
PT3317	2	0	0.134 ± 0.029	0.117 ± 0.040	1.1
		0.5	0.256 ± 0.022	0.099 ± 0.003	2.6
		1	0.306 ± 0.020	0.120 ± 0.019	2.5
		2	0.405 ± 0.052	0.171 ± 0.009	2.4
		5	0.465 ± 0.041	0.219 ± 0.017	2.1
[^{3}H]-Pitavastatin	0.1	5	20.172 ± 1.433	3.667 ± 0.145	5.5
[^{3}H]-CCK8	0.005	5	0.025 ± 0.001	0.004 ± 0.001	5.9
[^{3}H]-TCA	1.0	5	24.253 ± 3.041	1.483 ± 0.365	16.4
[^{14}C]-TEA	1.0	5	2.469 ± 0.121	0.633 ± 0.049	3.9

Abbreviations: LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; CCK8 = Cholecystokinin octapeptide; TCA = taurocholic acid; TEA = tetraethylammonium; CsA = cyclosporin A; TCDC = taurochenodeoxycholate; OATP1B1 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1; OATP1B3 = Organic Anion Transporting Polypeptide 1B3; OCT1 = Organic Cation Transporter 1; NTCP = Sodium/Taurocholate Co-transporting Polypeptide.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

[a] Fold difference is calculated by dividing the hepatic uptake without cocktail inhibitors by that with cocktail inhibitors.

Additional information: Uptake of PT3317 was evaluated in cryopreserved human hepatocytes. The hepatic transporter inhibitor cocktail was composed of CsA (10 µM), rifamycin SV (10 µM), rifampin (100 µM), quinidine (50 µM), and TCDC (50 µM). Under the conditions tested, PT3317 was a substrate of OATP1B1 and OATP1B3. A time-dependent and inhibitors-sensitive uptake of PT3317 in human hepatocytes was observed, suggesting the presence of active hepatic uptake of PT3317. Active uptake was observed in human hepatocytes with positive control substrates, pitavastatin (0.1 µM, OATP1B1/OATP1B3), CCK8 (5 nM, OATP1B3), TCA (1 µM, NTCP) and TEA (1 µM, OCT1), and was inhibited by inhibitor cocktail, confirming the presence of functional uptake transporters in the human hepatocytes tested.

C Confidential

2.6.5.21.6　ヒト OATP1B1の基質としての MK-6482の評価

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	In vitro uptake of [^{14}C]-MK-6482 in HEK293 cells stably transfected with OATP1B1 transporter in the presence of 1% BSA				
Analyte	MK-6482				
Analytical Method	LSC				
Substrate	Inhibitor	Time (min)	HEK293 cells (pmoles/10^6 cells)	HEK293-OATP1B1 cells (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]
[^{14}C]-MK-6482 (0.5 µM)	-	0	1.271 ± 0.157	1.580 ± 0.157	1.2
	-	0.5	1.236 ± 0.052	1.752 ± 0.186	1.4
	-	1	1.168 ± 0.149	1.700 ± 0.236	1.5
	-	2	1.168 ± 0.166	2.009 ± 0.472	1.7
	-	5	1.305 ± 0.297	2.370 ± 0.402	1.8
	CsA	5	1.399 ± 0.274	1.778 ± 0.337	NA[b]
[^{3}H]-Pitavastatin (0.1 µM)	-	5	0.122 ± 0.015	4.454 ± 0.153	36.5
	CsA	5	0.277 ± 0.020	0.417 ± 0.012	NA[b]

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; BSA = Bovine serum albumin; LSC = Liquid scintillation counting; min = minute; CsA = cyclosporin A; NA = not applicable.

[a] Fold difference is calculated by dividing the uptake in transporter-transfected cells by the uptake in control cells.

[b] Fold difference is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

Additional Information: Under the conditions tested in this study, time-dependent uptake of [^{14}C]-MK-6482 was observed in HEK293-OATP1B1 cells, suggesting that MK-6482 is a weak substrate of OATP1B1 in vitro. CsA (10 µM) strongly inhibited OATP1B1-mediated [^{3}H]-pitavastatin uptake, confirming the functionality of the assays. The uptake data from cryopreserved hepatocytes suggested that OATP1B1 has limited impact on uptake of MK-6482 in human hepatocytes [2.6.5.21.4 項].

C Confidential

2.6.5.21.7　ヒト OATP1B1の基質としての PT3317の評価

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	In vitro uptake of PT3317 in HEK293 cells stably transfected with OATP1B1 transporter				
Analyte	PT3317				
Analytical Method	LC-MS/MS, LSC				
Substrate	Inhibitor	Time (min)	HEK293 cells (pmoles/10^6 cells)	HEK293-OATP1B1 cells (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]
PT3317 (2 µM)	-	0	0.098 ± 0.000 [c]	0.098 ± 0.000[c]	1.0
	-	0.5	0.098 ± 0.000[c]	0.149 ± 0.012	1.5
	-	1	0.098 ± 0.000[c]	0.236 ± 0.033	2.4
	-	2	0.098 ± 0.000 [c]	0.424 ± 0.005	4.3
	-	5	0.098 ± 0.000[c]	0.780 ± 0.070	8.0
	CsA	5	0.098 ± 0.000[c]	0.098 ± 0.000[c]	NA[b]
[^{3}H]-Pitavastatin (0.1 µM)	-	5	0.478 ± 0.029	17.676 ± 0.393	37.0
	CsA	5	0.864 ± 0.059	1.706 ± 0.015	NA[b]

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; CsA = cyclosporin A; NA = not applicable.

[a] Fold difference is calculated by dividing the uptake in transporter-transfected cells by the uptake in control cells.

[b] Fold difference is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] Uptake was below the limit of quantification (LOQ), therefore LOQ value (0.122 nM) was used for calculation.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

Additional Information: Under the conditions tested, time-dependent uptake of PT3317 was observed in HEK293-OATP1B1 cells, suggesting that PT3317 is a substrate of OATP1B1 in vitro. CsA (10 µM) strongly inhibited OATP1B1-mediated [^{3}H]-pitavastatin uptake, confirming the functionality of the assays.

C Confidential

2.6.5.21.8　ヒト OATP1B3の基質としての MK-6482の評価

被験物質：MK-6482

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	In vitro uptake of [^{14}C]-MK-6482 in HEK293 cells stably transfected with OATP1B3 transporter in the presence of 1% BSA				
Analyte	MK-6482				
Analytical Method	LSC				
Substrate	Inhibitor	Time (min)	HEK293 cells (pmoles/10^6 cells)	HEK293-OATP1B3 cells (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]
[^{14}C]-MK-6482 (0.5 µM)	-	0	1.303 ± 0.144	1.466 ± 0.163	1.1
	-	0.5	1.122 ± 0.113	1.955 ± 0.356	1.7
	-	1	1.521 ± 0.144	2.263 ± 0.166	1.5
	-	2	1.231 ± 0.219	2.209 ± 0.031	1.8
	-	5	1.611 ± 0.031	2.951 ± 0.166	1.8
	CsA	5	1.852 ± 0.136	1.726 ± 0.300	NA[b]
[^{3}H]-CCK8 (5 nM)	-	5	0.0054 ± 0.0007	0.1877 ± 0.0067	35.1
	CsA	5	0.0038 ± 0.0005	0.0038 ± 0.0001	NA[b]

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; BSA = Bovine serum albumin; CCK8 = Cholecystokinin octapeptide; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; CsA = cyclosporin A; NA = not applicable.

[a] Fold difference is calculated by dividing the uptake in transporter-transfected cells by the uptake in control cells.

[b] Fold difference is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

Additional Information: Under the conditions tested in this study, time-dependent uptake of [^{14}C]-MK-6482 was observed in HEK293-OATP1B3 cells, suggesting that MK-6482 is a weak substrate of OATP1B3 in vitro. CsA (10 µM) strongly inhibited OATP1B3-mediated [^{3}H]-CCK8, confirming the functionality of the assays. The uptake data from cryopreserved hepatocytes suggested that OATP1B3 has limited impact on uptake of MK-6482 in human hepatocytes [2.6.5.21.4 項].

C Confidential

2.6.5.21.9　ヒト OATP1B3の基質としての PT3317の評価

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]				
Type of Study	Transporter phenotyping				
Methods	In vitro uptake of PT3317 in HEK293 cells stably transfected with OATP1B3 transporter				
Analyte	PT3317				
Analytical Method	LC-MS/MS, LSC				
Substrate	Inhibitor	Time (min)	HEK293 cells (pmoles/10^6 cells)	HEK293-OATP1B3 cells (pmoles/10^6 cells)	Fold difference of uptake[a]
PT3317 (2 µM)	-	0	0.098 ± 0.000 [c]	0.137 ± 0.010	1.4
	-	0.5	0.098 ± 0.000[c]	0.407 ± 0.043	4.2
	-	1	0.098 ± 0.000[c]	0.598 ± 0.032	6.1
	-	2	0.098 ± 0.000 [c]	0.984 ± 0.104	10.1
	-	5	0.098 ± 0.000[c]	2.028 ± 0.281	20.8
	CsA	5	0.098 ± 0.000[c]	0.098 ± 0.000 [c]	NA[b]
[^{3}H]-CCK8 (5 nM)	-	5	0.0073 ± 0.0006	0.2039 ± 0.0098	27.9
	CsA	5	0.0055 ± 0.0003	0.0083 ± 0.0004	NA[b]

Abbreviations: HEK293 = human embryonic kidney 293 cells; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; CsA = cyclosporin A; CCK8 = Cholecystokinin octapeptide; NA = not applicable.

[a] Fold difference is calculated by dividing the uptake in transporter-transfected cells by the uptake in control cells.

[b] Fold difference is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control cells.

[c] Uptake was below the limit of quantification (LOQ), therefore LOQ value (0.122 nM) was used for calculation.

Values represent mean ± standard deviation (n =3).

Additional Information: Under the conditions tested, time-dependent uptake of PT3317 was observed in HEK293-OATP1B3 cells, suggesting that PT3317 is a substrate of OATP1B3 in vitro. CsA (10 µM) strongly inhibited OATP1B3-mediated [^{3}H]-CCK8, confirming the functionality of the assays.

C Confidential

2.6.5.21.10　ヒト MRP2の基質としての MK-6482及び PT3317の評価

被験物質：MK-6482 及び PT3317

Report Number	[4.2.2.2.14: PK004]					
Type of Study	Transporter phenotyping					
Methods	Uptake transport of MK-6482 and PT3317 across MRP2 vesicles.					
Analytical Method	LC-MS/MS					
Compound	Concentration (μM)	Inhibitor (Concentration)	ATP (pmol/min/mg protein)	AMP (pmol/min/mg protein)	Net Vesicular Accumulation (pmol/min/mg protein)	Inhibition (%)
MK-6482	10	-	3.46 ± 1.14	4.28 ± 0.87	-0.82 ± 1.14	-
	10	Benzbromarone (300 μM)	4.10 ± 1.74	4.23 ± 1.64	-0.13 ± 1.74	ND
PT3317	10	-	40.1 ± 4.02	1.84 ± 0.98	38.3 ± 4.02	-
	10	Benzbromarone (300 μM)	0.77 ± 0.21	0.91 ± 0.47	-0.15 ± 0.21	100 ± 0.56
$E_2$17βG	50	-	3590 ± 229	256 ± 26.9	3340 ± 229	-
	50	Benzbromarone (300 μM)	229 ± 40.5	211 ± 14.8	17.7 ± 40.5	99.5 ± 1.21

Abbreviations: AMP = adenosine monophosphate; ATP = adenosine triphosphate; $E_2$17βG = estradiol-17β-D-glucuronide; MRP2 = multidrug resistance protein 2; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; ND = not determined due to lack of inhibition; - = without inhibitor.
Values represent mean ± standard deviation.
Additional Information: ATP-dependent uptake of the MK-6482 and PT3317(10 μM) into membrane vesicles containing human MRP2 was measured. $E_2$17βG (50 μM) was used as a positive control substrate and benzbromarone (300 μM) as a positive control inhibitor. Under the conditions tested, no ATP-dependent uptake was observed with MK-6482 in vesicles containing BCRP. However, ATP-dependent uptake was observed with PT3317 at concentration of 10 μM, and was abolished in the presence of benzbromarone, indicating that PT3317 is a substrate of MRP2.

C Confidential

2.6.5.21.11 ヒト MRP2の基質としての PT3317の評価

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]						
Type of Study	Transporter phenotyping						
Methods	Uptake transport of PT3317 across MRP2 vesicles.						
Analytical Method	LC-MS/MS and LSC						
Compound	Inhibitor	Time (min)	Control vesicles		MRP2 vesicles		Fold difference between ATP and AMP[a]
			AMP (pmoles/mg protein)	ATP (pmoles/mg protein)	AMP (pmoles/mg protein)	ATP (pmoles/mg protein)	
PT3317	-	0	1.268 [c]	3.184 ± 0.211[e]	3.685 ± 1.563[d]	3.027 ± 0.202[e]	0.8
	-	1	2.200 ± 0.856[d]	2.929 [c]	1.746 ± 1.116	8.162 ± 0.534	4.7
	-	2	2.053 ± 0.501[d]	3.215 ± 2.164	2.073 ± 1.182	11.158 ± 1.614	5.4
	-	5	3.050 ± 0.981	2.228 ± 0.532	2.506 ± 1.001	23.433 ± 9.086	9.3
	Bromosulfophthalein (200 µM)	5	3.560 ± 1.088[e]	1.573 ± 0.898[e]	BLQ	4.854 ± 1.549[e]	NA[b]
[^{14}C]-EA-SG	-	5	37.331 ± 4.224	91.359 ± 6.225	66.409 ± 4.607	513.823 ± 42.478	7.7
	Bromosulfophthalein (200 µM)	5	7.673 ± 0.578	9.675 ± 1.156	9.341 ± 1.529	12.844 ± 1.609	NA[b]

Abbreviations: AMP = adenosine monophosphate; ATP = adenosine triphosphate; MRP2 = multidrug resistance protein 2; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; BLQ = below limit of quantification; EA-SG = Ethacrynic acid-glutathione conjugate; - = without inhibitor;
NA = not applicable.
Values represent mean ± standard deviation (n = 3 except where noted).
[a] Fold difference was calculated by dividing the uptake in the presence of ATP by that in the presence of AMP in MRP2 vesicles.
[b] Fold difference is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control vesicles.
[c] N=1 and [d] N=2 because the rest of sample concentrations were below limit of quantification of 0.244 nM which is equivalent to 0.097 pmoles/mg protein.
[e] N=2 because one data point was excluded due to the abnormal internal standard intensity.
Additional Information: ATP-dependent uptake of the PT3317(2 µM) into membrane vesicles containing human MRP2 was measured. [^{14}C]-EA-SG (1 µM) was used as a positive control substrate and bromosulfophthalein (200 µM) as a positive control inhibitor. Under the conditions tested, PT3317 was a substrate of human MRP2, consistent with the results presented in [2.6.5.21.10 項].
Bromosulfophthalein strongly inhibited ATP-dependent uptake of EA-SG in MRP2-containing vesicles, confirming the functionality of the assay.

Confidential

2.6.5.21.12 ヒト MRP3の基質としての PT3317の評価

被験物質：PT3317

Report Number	[4.2.2.6.10: PK032]						
Type of Study	Transporter phenotyping						
Methods	Uptake transport of PT3317 across MRP3 vesicles.						
Analytical Method	LC-MS/MS and LSC						
Compound	Inhibitor	Time (min)	Control vesicles		MRP3 vesicles		Fold difference between ATP and AMP[a]
			AMP (pmoles/mg protein)	ATP (pmoles/mg protein)	AMP (pmoles/mg protein)	ATP (pmoles/mg protein)	
PT3317	-	0	1.061 ± 0.308[c]	1.085 ± 0.707	1.674 ± 1.050	15.221 ± 4.015	9.1
	-	1	0.824 ± 0.235	0.504[d]	1.929 ± 0.139	103.241 ± 13.985	53.5
	-	2	1.273 ± 0.316	1.362 ± 0.569[c]	3.332 ± 0.847	168.387 ± 3.719	50.5
	-	5	0.905 ± 0.093	1.155 ± 0.115	12.335 ± 2.106	402.398 ± 30.111	32.6
	Bromosulfophthalein (100 µM)	5	1.830 ± 0.056	1.303 ± 0.362	1.184 ± 0.253	4.854 ±1.355	NA[b]
[^{3}H]-E$_2$17βG	-	5	14.583 ± 0.883	17.872 ± 1.753	20.401 ± 1.281	93.765 ± 8.923	4.6
	Bromosulfophthalein (100 µM)	5	14.326 ± 0.561	15.026 ± 0.622	14.284 ± 1.181	21.001 ± 0.293	NA[b]

Abbreviations: AMP = adenosine monophosphate; ATP = adenosine triphosphate; MRP3 = multidrug resistance protein 3; LC-MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; min = minute; E$_2$17βG = estradiol-17β-D-glucuronide; - = without inhibitor; NA = not applicable.
Values represent mean ± standard deviation (n =3 except where noted).
[a] Fold difference was calculated by dividing the uptake in the presence of ATP by that in the presence of AMP in MRP3 vesicles.
[b] Fold difference is not calculated in the presence of inhibitor, as inhibitor may affect the endogenous transport in control vesicles.
[c] N=2 and [d] N=1 because the rest of sample concentrations were below limit of quantification of 0.122 nM which is equivalent to 0.049 pmoles/mg protein.
Additional Information: ATP-dependent uptake of the PT3317 (2 µM) into membrane vesicles containing human MRP3 was measured. [^{3}H]-E$_2$17βG (1 µM) was used as a positive control substrate and bromosulfophthalein (100 µM) as a positive control inhibitor. Under the conditions tested, PT3317 was a substrate of human MRP3. Bromosulfophthalein strongly inhibited ATP-dependent uptake of E$_2$17βG in MRP3-containing vesicles, confirming the functionality of the assay.

C Confidential

2.6.5.22　薬物動態：MK-6482によるヒト薬物トランスポーターの阻害作用

被験物質：MK-6482

Type of Study	Inhibition potential on transporter proteins				
Methods	In vitro evaluation of MK-6482 as an inhibitor of human OATP1B1, OATP1B3, BSEP, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1, MATE2-K, P-gp and BCRP transporters				
Analytical Method	LSC				
Transporter	Cell Lines	Probe Substrate	IC_{50} (µM)	Inhibition at Highest Concentration Tested	Report Number
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	[^{3}H]-Pitavastatin (0.1 µM)	149.2 ± 11.9	49% at 150 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	[^{3}H]-BSP (0.1 µM)	>150	21% at 150 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
BSEP	S*f*9-BSEP	[^{3}H]-TCA (1 µM)	>300	19% at 300 µM	[4.2.2.6.12: PK046]
OCT1	CHO-K1-OCT1	[^{14}C]-Metformin (10 µM)	46.9 ± 5.8	84% at 300 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
OCT2	HEK293-OCT2	[^{14}C]-Metformin (5 µM)	173.4 ± 4.0	70% at 300 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
OAT1	MDCKII-OAT1	[^{3}H]-Cidofovir (1 µM)	>300	17% at 300 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
OAT3	MDCKII-OAT3	[^{3}H]-ES (1 µM)	99.2 ± 24.8	77 % at 300 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
MATE1	CHO-K1-MATE1	[^{14}C]-Metformin (5 µM)	39.0 ± 9.7	75% at 300 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
MATE2-K	MDCKII-MATE2-K	[^{14}C]-Metformin (5 µM)	0.7 ± 0.1	93% at 30 µM	[4.2.2.6.11: PK033]
P-gp	MDCKII-MDR1	[^{3}H]-Quinidine (0.1 µM)	>100	11% at 100 µM	[4.2.2.6.14: PK034]
P-gp	LLC-PK1-MDR1	[^{3}H]-Digoxin (0.1 µM)	>100	18% at 100 µM	[4.2.2.6.15: PK048]
BCRP	MDCKII-BCRP	[^{3}H]-Prazosin (2 µM)	>100	-30% at 100 µM	[4.2.2.6.14: PK034]
BCRP	S*f*9-BCRP	[^{3}H]-MTX (10 µM)	>300	28% at 300 µM	[4.2.2.6.11: PK033]

Abbreviations: LSC = liquid scintillation counting; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2K; BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP =bile salt export pump; P-gp = P-glycoprotein; MDR1 = multidrug resistance protein; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; DDI = drug-drug interaction; HEK293 = human embryonic kidney 293; CHO-K1 = Chinese hamster ovary-K1 cells; LLC-PK1 = Lilly Laboratories cell porcine kidney; S*f*9 = *Spodoptera frugiperda;* MDCKII = Madin-Darby canine kidney cells; BSP = bromosulfophthalein; ES = estrone sulfate; MTX = methotrexate; TCA = taurocholic acid; . FDA = Food and Drug Administration; EMA = European Medicines Agency; PMDA = Pharmaceuticals and Medical Devices Agency.
Values represent means ± standard error where as best-fit.
Additional information: An assessment of DDI risk between MK-6482 and co-administered substrates of these transporters, based on the 2020 FDA, 2012 EMA and 2019 PMDA guidance, is provided in [2.6.5.23 項], [2.6.5.24 項], and [2.6.5.25 項], respectively.

C Confidential

2.6.5.23　薬物動態：FDA の薬物相互作用ガイダンスに基づく MK-6482によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

被験物質：MK-6482

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between MK-6482 and co-administered substrates of various transporters, based on the FDA guidance (2020)[a]							
Transporter	Report Number	$I_{max,u}$ (μM)	$I_{in,max,u}$ (μM)	I_{gut} (μM)	IC_{50} (μM)	$[I]^b/IC_{50}$	Threshold Cutoff For Potential DDI
Systemic							
OATP1B1	[4.2.2.6.11: PK033]	-	14.67	-	149.2 ± 11.9	0.098	$I_{in,max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OATP1B3	[4.2.2.6.11: PK033]	-	14.67	-	>150	<0.098	$I_{in,max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OCT2	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	173.4 ± 4.0	0.015	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OAT1	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	>300	<0.009	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OAT3	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	99.2 ± 24.8	0.026	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
MATE1	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	39.0 ± 9.7	0.066	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
MATE2-K	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	0.7 ± 0.1	3.7	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
Intestinal							
P-gp	[4.2.2.6.15: PK048]	-	-	1252.1	>100	<12.5	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$
BCRP	[4.2.2.6.11: PK033]	-	-	1252.1	>300	<4.2	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$

Abbreviations: FDA = Food and Drug Administration; DDI = drug-drug interaction; $I_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 120 mg MK-6482, 2.57 μM (MK-6482 total I_{max} = 4.67 μM (1.79 μg/mL) [2.7.2.2 項] and unbound fraction (f_u) = 0.55); $I_{in,max,u}$ = estimated unbound maximum plasma concentration at the inlet to the liver, 14.67 μM ($I_{in,max,u} = f_u \times (I_{max} + (F_a \times F_g \times K_a \times \text{Dose})/Qh/R_B)$, where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (K_a) = 0.1 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, blood-to-plasma ratio(R_B) = 0.88; f_u = 0.55); I_{gut} = theoretical maximum gastrointestinal drug concentration, calculated as the highest clinical dose on a molar basis in a volume of 250 mL, 1252.1 μM; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition;OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2K; P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; - = not applicable.

[a] In Vitro Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter- Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. Issued by U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Jan 2020.

[b] [I] refers to $I_{in,max,u}$ for OATP1B1 and OATP1B3, $I_{max,u}$ for OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 and MATE2-K, and I_{gut} for P-gp and BCRP.

C Confidential

2.6.5.24 薬物動態：EMA の薬物相互作用ガイドラインに基づく MK-6482によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

被験物質：MK-6482

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between MK-6482 and co-administered substrates of various transporters, based on the EMA guideline (2012)[a]						
Transporter	Report Number	K_i[b] (μM)	50 × $C_{max,u}$ (μM)	25 × $I_{u,inlet,max}$ (μM)	0.1 × Dose/ 250 mL (μM)[c]	Threshold Cutoff For Potential DDI
Systemic						
OATP1B1	[4.2.2.6.11: PK033]	149.2 ± 11.9	-	367	-	$K_i \leq (25 \times I_{u,inlet,max})$
OATP1B3	[4.2.2.6.11: PK033]	>150	-	367	-	$K_i \leq (25 \times I_{u,inlet,max})$
OCT1[d]	[4.2.2.6.11: PK033]	46.9 ± 5.8	-	367	-	$K_i \leq (25 \times I_{u,inlet,max})$
OCT2	[4.2.2.6.11: PK033]	173.4± 4.0	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT1	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT3	[4.2.2.6.11: PK033]	99.2 ± 24.8	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE1	[4.2.2.6.11: PK033]	39.0 ± 9.7	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE2-K	[4.2.2.6.11: PK033]	0.7 ± 0.1	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
P-gp	[4.2.2.6.15: PK048]	>100	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
BCRP	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	129	-	-	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
Intestinal						
P-gp	[4.2.2.6.15: PK048]	>100	-	-	125.2	$K_i \leq (0.1 \times Dose/250)$
BCRP	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	-	-	125.2	$K_i \leq (0.1 \times Dose/250)$

Abbreviations: EMA = European Medicines Agency; DDI = drug-drug interaction; K_i = inhibition constant; $C_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 120 mg of MK-6482, 2.57 μM (MK-6482 total C_{max} = 4.67 μM (1.79 μg/mL) [2.7.2.2 項] and unbound fraction (f_u) = 0.55); $I_{u,inlet,max}$ = estimated unbound maximum plasma concentration at the inlet to the liver, 14.67 μM ($I_{max,u} = f_u \times (C_{max} + (F_a F_g \times K_a \times Dose)/Q_h/R_B)$, where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (K_a) = 0.1 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, blood-to-plasma ratio (R_B) = 0.88; unbound fraction (f_u) = 0.55); P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K; - = not applicable.

[a] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. In: CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. London, England: European Medicines Agency; 2012.

[b] $K_i = IC_{50}$, given that the concentration of the probe substrate for each transporter was << K_m value.

[c] Calculated using the clinical dose (120 mg), on a molar basis.

[d] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as OATP1B1 and OATP1B3.

C Confidential

2.6.5.25 薬物動態：本邦の薬物相互作用ガイドラインに基づく MK-6482によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

被験物質：MK-6482

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between MK-6482 and co-administered substrates of various transporters, based on the PMDA guideline (2019)[a]							
Transporter	Report Number	$C_{max,u}$ (μM)	$I_{inlet,max,u}$ (μM)	I_{gut} (μM)	IC_{50} (μM)	$[I]^b/IC_{50}$	Threshold Cutoff For Potential DDI[c]
Systemic							
OATP1B1	[4.2.2.6.11: PK033]	-	14.67	-	149.2 ± 11.9	0.098	$I_{inlet,max,u}/K_i \geq 0.1$
OATP1B3	[4.2.2.6.11: PK033]	-	14.67	-	>150	<0.098	$I_{inlet,max,u}/K_i \geq 0.1$
OCT1[d]	[4.2.2.6.11: PK033]	-	14.67	-	46.9 ± 5.8	0.313	$I_{inlet,max,u}/K_i \geq 0.1$
OCT2	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	173.4 ± 4.0	0.015	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OAT1	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	>300	<0.009	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OAT3	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	99.2 ± 24.8	0.026	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
MATE1	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	39.0 ± 9.7	0.066	$C_{max,u}/K_i \geq 0.02$
MATE2-K	[4.2.2.6.11: PK033]	2.57	-	-	0.7 ± 0.1	3.7	$C_{max,u}/K_i \geq 0.02$
Intestinal							
P-gp	[4.2.2.6.15: PK048]	-	-	1252.1	>100	<12.5	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$
BCRP	[4.2.2.6.11: PK033]	-	-	1252.1	>300	<4.17	$I_{gut}/IC_{50} \geq 10$

Abbreviations: PMDA = Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; DDI = drug-drug interaction; $C_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 120 mg MK-6482, 2.57 μM (MK-6482 total I_{max} = 4.67 μM (1.79 μg/mL) [2.7.2.2 項] and unbound fraction (f_u) = 0.55); $I_{inlet,max,u}$ = estimated unbound maximum plasma concentration at the inlet to the liver, 14.67 μM ($I_{in,max,u} = (f_u/R_B) \times ((C_{max} \times R_B) + (F_a F_g \times K_a \times Dose)/Qh)$, where fraction absorbed (F_a) =1, fraction escaping gut metabolism (F_g) =1, observed absorption rate constant (K_a) = 0.1 min^{-1}, hepatic blood flow (Q_h) = 1617 mL/min, blood-to-plasma ratio(R_B) = 0.88; f_u = 0.55); I_{gut} = theoretical maximum gastrointestinal drug concentration, calculated as the highest clinical dose on a molar basis in a volume of 250 mL, 1252.1 μM; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; K_i = inhibition constant; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K; P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein; - = not applicable.

[a] Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information. Issued by Ministry of Health, Labour and Welfare, Feb 2019.

[b] [I] refers to $I_{inlet,max,u}$ for OATP1B1, OATP1B3 and OCT1, $C_{max,u}$ for OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 and MATE2-K, and I_{gut} for P-gp and BCRP.

[c] $K_i = IC_{50}$, given that the concentration of the probe substrate for each transporter was << K_m value.

[d] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as for OATP1B1 and OATP1B3.

C Confidential

2.6.5.26 薬物動態：PT3317によるヒト薬物トランスポーターの阻害作用

被験物質：PT3317

Type of Study	Inhibition potential on transporter proteins				
Methods	In vitro evaluation of PT3317 as an inhibitor of human OATP1B1, OATP1B3, BSEP, OCT1, OCT2, OAT1, OAT3, MATE1, MATE2-K, P-gp and BCRP transporters				
Analytical Method	LSC				
Transporter	Cell Lines	Probe Substrate	IC_{50} (μM)	Inhibition at Highest Concentration Tested	Report Number
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	[^{3}H]-Pitavastatin (0.1 μM)	32.6 ± 3.5	80% at 150 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	[^{3}H]-BSP (0.1 μM)	74.1 ± 13.4	62% at 150 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
BSEP	S*f*9-BSEP	[^{3}H]-TCA (1 μM)	>300	-4% at 300 μM	[4.2.2.6.13: PK047]
OCT1	CHO-K1-OCT1	[^{14}C]-Metformin (10 μM)	215.1 ± 34.4	56% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
OCT2	HEK293-OCT2	[^{14}C]-Metformin (5 μM)	>300	-10% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
OAT1	MDCKII-OAT1	[^{3}H]-Cidofovir (1 μM)	>300	-26% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
OAT3	MDCKII-OAT3	[^{3}H]-ES (1 μM)	>300	21% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
MATE1	CHO-K1-MATE1	[^{14}C]-Metformin (5 μM)	74.0 ± 17.2	83% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
MATE2-K	MDCKII-MATE2-K	[^{14}C]-Metformin (5 μM)	14.9 ± 1.3	92% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]
P-gp	MDCKII-MDR1	[^{3}H]-Quinidine (0.1 μM)	>100	-14% at 100 μM	[4.2.2.6.14: PK034]
P-gp	LLC-PK1-MDR1	[^{3}H]-Digoxin (0.1 μM)	>300	33% at 300 μM	[4.2.2.6.16: PK049]
BCRP	MDCKII-BCRP	[^{3}H]-Prazosin (2 μM)	>100	-47% at 100 μM	[4.2.2.6.14: PK034]
BCRP	S*f*9-BCRP	[^{3}H]-MTX (10 μM)	>300	12% at 300 μM	[4.2.2.6.11: PK033]

Abbreviations: LSC = liquid scintillation counting; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2K; BCRP = breast cancer resistance protein; BSEP =bile salt export pump; P-gp = P-glycoprotein; MDR1 = multidrug resistance protein; IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; DDI = drug-drug interaction; HEK293 = human embryonic kidney 293; CHO-K1 = Chinese hamster ovary-K1 cells; LLC-PK1 = Lilly Laboratories cell porcine kidney; S*f*9 = *Spodoptera frugiperda;* MDCKII = Madin-Darby canine kidney cells; BSP = bromosulfophthalein; ES = estrone sulfate; MTX = methotrexate; TCA = taurocholic acid; FDA = Food and Drug Administration; EMA = European Medicines Agency; PMDA = Pharmaceuticals and Medical Devices Agency.
Values represent means ± standard error where as best-fit.
Additional information: An assessment of DDI risk between PT3317 and co-administered substrates of these transporters, based on the 2020 FDA, 2012 EMA and 2019 PMDA guidance, is provided in [2.6.5.27 項], [2.6.5.28 項] and [2.6.5.29 項], respectively.

C Confidential

2.6.5.27　薬物動態：FDA の薬物相互作用ガイダンスに基づく PT3317によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

被験物質：PT3317

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between PT3317 and co-administered substrates of various transporters, based on the FDA guidance (2020)[a]					
Transporter	Report Number	$I_{max,u}$ (μM)	IC_{50} (μM)	$[I]^b/IC_{50}$	Threshold Cutoff For Potential DDI
Systemic[c]					
OATP1B1	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	32.6 ± 3.5	0.014	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OATP1B3	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	74.1 ± 13.4	0.006	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OCT2	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	>300	<0.002	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OAT1	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	>300	<0.002	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
OAT3	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	>300	<0.002	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
MATE1	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	74.0 ± 17.2	0.006	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$
MATE2-K	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	14.9 ± 1.3	0.032	$I_{max,u}/IC_{50} \geq 0.1$

Abbreviations: FDA = Food and Drug Administration; DDI = drug-drug interaction; $I_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 120 mg MK-6482 (PT3317 total I_{max} = 1 μM (0.58 μg/mL) [2.7.2.2項] and unbound fraction (f_u) = 0.47 at 1 μM); IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K.

[a] In Vitro Drug Interaction Studies – Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter -Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. Issued by: U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Jan 2020.

[b] [I] refers to $I_{max,u}$.

[c] PT3317 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.

C Confidential

2.6.5.28　薬物動態：EMA の薬物相互作用ガイドラインに基づく PT3317によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

被験物質：PT3317

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between PT3317 and co-administered substrates of various transporters, based on the EMA guideline (2012)[a]				
Transporter	Report Number	K_i[b] (μM)	50 × $C_{max,u}$ (μM)	Threshold Cutoff For Potential DDI
Systemic[c]				
OATP1B1	[4.2.2.6.11: PK033]	32.6 ± 3.5	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OATP1B3	[4.2.2.6.11: PK033]	74.1 ± 13.4	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OCT1[d]	[4.2.2.6.11: PK033]	215.1 ± 34.4	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OCT2	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT1	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
OAT3	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE1	[4.2.2.6.11: PK033]	74.0 ± 17.2	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
MATE2-K	[4.2.2.6.11: PK033]	14.9 ± 1.3	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
P-gp	[4.2.2.6.16: PK049]	>300	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$
BCRP	[4.2.2.6.11: PK033]	>300	23.5	$K_i \leq (50 \times C_{max,u})$

Abbreviations: EMA = European Medicines Agency; DDI = drug-drug interaction; K_i = inhibition constant; $C_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 120 mg of MK-6482 (PT3317 total C_{max} = 1 μM (0.58 μg/mL) [2.7.2.2 項] and unbound fraction (f_u) = 0.47 at 1 μM); OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; OCT2 = organic cation transporter 2; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K; P-gp = P-glycoprotein; BCRP = breast cancer resistance protein.

[a] Committee for Human Medicinal Products (CHMP). Guideline on the investigation of drug interactions. In: CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2. London, England: European Medicines Agency; 2012.

[b] $K_i = IC_{50}$, given that the concentration of the probe substrate for each transporter was << K_m value.

[c] PT3317 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.

[d] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as OATP1B1 and OATP1B3.

C Confidential

2.6.5.29 薬物動態：本邦の薬物相互作用ガイドラインに基づく PT3317によるトランスポーター阻害に関する薬物相互作用

被験物質：PT3317

Summary Results: Assessment of risk for in vivo DDI's between PT3317 and co-administered substrates of various transporters, based on the PMDA guideline (2019)[a]					
Transporter	Report Number	$C_{max,u}$ (μM)	IC_{50} (μM)	$[I]^b/IC_{50}$	Threshold Cutoff For Potential DDI[c]
Systemic[d]					
OATP1B1	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	32.6 ± 3.5	0.014	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OATP1B3	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	74.1 ± 13.4	0.006	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OCT1[e]	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	215.1 ± 34.4	0.002	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OCT2	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	>300	<0.002	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OAT1	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	>300	<0.002	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
OAT3	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	>300	<0.002	$C_{max,u}/K_i \geq 0.1$
MATE1	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	74.0 ± 17.2	0.006	$C_{max,u}/K_i \geq 0.02$
MATE2-K	[4.2.2.6.11: PK033]	0.47	14.9 ± 1.3	0.032	$C_{max,u}/K_i \geq 0.02$

Abbreviations: PMDA = Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; DDI = drug-drug interaction; $C_{max,u}$ = unbound maximum plasma concentration in humans treated with 120 mg MK-6482 (PT3317 total C_{max} = 1 μM (0.58 μg/mL) [2.7.2.2 項] and unbound fraction (f_u) = 0.47 at 1 μM); IC_{50} = concentration required for 50% inhibition; K_i = inhibition constant; OATP1B1 = organic anion transporter polypeptide 1B1; OATP1B3 = organic anion transporter polypeptide 1B3; OCT1 = organic cation transporter 1; OCT2 = organic cation transporter 2; OAT1 = organic anion transporter 1; OAT3 = organic anion transporter 3; MATE1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MATE2-K = multidrug and toxin extrusion protein 2-K.

[a] Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information. Issued by Ministry of Health, Labour and Welfare, Feb 2019.

[b] [I] refers to $C_{max,u}$.

[c] $K_i = IC_{50}$, given that the concentration of the probe substrate for each transporter was << K_m value.

[d] PT3317 was not dosed orally; therefore, only systemic DDIs are assessed.

[e] OCT1 is a hepatic uptake transporter; therefore, used the same criteria as for OATP1B1 and OATP1B3.

C Confidential