目次

略語一覧 4
2.6.4 薬物動態試験の概要文 7
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 14
2.6.4.2.1 血漿中 setmelanotide 濃度 14
2.6.4.2.1.1 GLP 非適用の試料分析 14
2.6.4.2.1.2 GLP 適用の試料分析 14
2.6.4.2.2 ラット乳汁中 setmelanotide 濃度 15
2.6.4.2.3 抗 setmelanotide 抗体 15
2.6.4.2.3.1 C57BL/6J マウス 15
2.6.4.2.3.2 C57BL/6J マウスの追加バリデーション 16
2.6.4.2.3.3 マウスの電気化学発光免疫測定 17
2.6.4.2.3.4 Sprague-Dawley ラット及びカニクイザル 18
2.6.4.2.3.5 New Zealand White ウサギ 18
2.6.4.2.4 PK 又は TK 解析 19
2.6.4.3 吸収 19
2.6.4.3.1 ラットを用いた吸収試験 19
2.6.4.3.1.1 単回投与試験 19
2.6.4.3.1.1.1 [^{14}C]-Setmelanotide の単回投与 ADME 試験 19
2.6.4.3.1.1.2 mPEG-DSPE による単回皮下投与 PK 試験 20
2.6.4.3.1.2 反復投与試験 21
2.6.4.3.1.2.1 28 日間皮下投与用量設定試験（１） 21
2.6.4.3.1.2.2 28 日間皮下投与用量設定試験（２） 21
2.6.4.3.1.2.3 26 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 22
2.6.4.3.1.2.4 雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験 24
2.6.4.3.1.2.5 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 24
2.6.4.3.1.2.6 幼若ラットを用いた用量設定試験 25
2.6.4.3.1.2.7 幼若ラットを用いた 7 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験 25
2.6.4.3.2 ウサギを用いた吸収試験 26
2.6.4.3.2.1 反復投与試験 26
2.6.4.3.2.1.1 忍容性及び胚・胎児発生用量設定試験 26
2.6.4.3.2.1.2 胚・胎児発生に関する試験 27
2.6.4.3.3 サルを用いた吸収試験 27
2.6.4.3.3.1 単回投与試験 27
2.6.4.3.3.1.1 カニクイザルを用いた単回皮下投与 PK 試験 27
2.6.4.3.3.1.2 カニクイザルを用いた保存料添加及び非添加製剤のクロスオーバー薬物動態試験 28

2.6.4.3.3.2 反復投与試験.....28
2.6.4.3.3.2.1 カニクイザルを用いた 28 日間皮下投与用量設定試験.....28
2.6.4.3.3.2.2 カニクイザルを用いた 39 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験.....29
2.6.4.3.4 マウスにおける試験.....30
2.6.4.3.4.1 反復投与試験.....30
2.6.4.3.4.1.1 野生型 rasH2-Wt マウスの 28 日間皮下投与用量設定試験.....30
2.6.4.3.4.1.2 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（１）.....31
2.6.4.3.4.1.3 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（２）.....32
2.6.4.3.4.1.4 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（３）.....33
2.6.4.4 分布.....34
2.6.4.4.1 In vitro 組織分布試験.....34
2.6.4.4.1.1 ヒト血漿タンパク結合試験.....34
2.6.4.4.1.2 ヒト、ラット、マウス及びサル血漿タンパク結合試験.....34
2.6.4.4.1.3 ラット及びウサギ血漿タンパク結合試験.....35
2.6.4.4.2 In vivo 組織分布試験.....35
2.6.4.4.2.1 ラットの定量的全身オートラジオグラフィー試験.....35
2.6.4.4.2.2 [^{14}C]-mPEG-DSPE を単回及び反復皮下投与時の PK、マスバランス及び組織分布試験.....36
2.6.4.5 代謝.....37
2.6.4.5.1 In vitro 代謝.....37
2.6.4.5.1.1 ヒト肝細胞における代謝安定性.....37
2.6.4.5.1.2 ヒト肝ミクロソームにおける代謝安定性.....38
2.6.4.5.1.3 ヒト皮膚線維芽細胞における代謝安定性.....38
2.6.4.5.1.4 ヒト、ラット及びサルの肝、腎ミクロソーム並びに肝細胞における代謝安定性.....38
2.6.4.5.2 In vivo でのラット代謝プロファイル.....39
2.6.4.5.2.1 [^{14}C]-Setmelanotide の単回投与 ADME 試験.....39
2.6.4.6 排泄.....42
2.6.4.6.1 ラットを用いた排泄試験.....42
2.6.4.6.1.1 [^{14}C]-Setmelanotide の単回投与 ADME 試験.....42
2.6.4.6.1.2 妊娠中又は授乳中ラットにおける乳汁中排泄.....43
2.6.4.7 薬物動態学的相互作用.....43
2.6.4.7.1 In vitro 試験.....43
2.6.4.7.1.1 In vitro チトクローム P450 に対する阻害作用.....43
2.6.4.7.1.2 ヒト肝ミクロソームを用いたチトクローム P450 に対する阻害作用.....44
2.6.4.7.1.3 ヒト肝ミクロソームを用いたチトクローム P450 に対する時間依存的阻害作用.....44
2.6.4.7.1.4 ヒト肝細胞を用いたチトクローム P450 に対する誘導作用.....45
2.6.4.7.1.5 Setmelanotide の膜透過性.....45
2.6.4.7.1.6 トランスポーターの基質認識性及び阻害作用.....46

2.6.4.7.1.7 MATE の基質認識性及び阻害作用.....47
2.6.4.8 その他の薬物動態試験.....47
2.6.4.8.1 その他の試験の要約.....48
2.6.4.8.2 ラットにおける単回投与試験.....48
2.6.4.8.2.1 ラットにおける生理食塩液による単回皮下投与試験.....48
2.6.4.8.3 サルにおける単回投与試験.....49
2.6.4.8.3.1 肥満アカゲザルにおける単回投与試験.....49
2.6.4.8.3.2 肥満アカゲザルにおける各種製剤による反復投与試験.....49
2.6.4.9 考察及び結論.....51

表一覧

表 2.6.4-1 ヒトでの setmelanotide/mPEG-DSPE の投与を裏付ける in vitro 及び in vivo 非臨床薬物動態試験.....8
表 2.6.4-2 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における最高臨床用量 3 mg/日に対する安全域.....14
表 2.6.4-3 生理食塩液及び他の製剤による setmelanotide の in vivo PK 試験.....48
表 2.6.4-4 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における血漿中曝露量及び最高臨床用量 3 mg/日に対する安全域.....54

図一覧

図 2.6.4-1 Sprague-Dawley ラットにおける setmelanotide の代謝経路.....42

略語一覧

略語	定義（英語）	定義（日本語）
ADA	Anti-drug antibody	抗薬物抗体
ADME	Absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AP-BL	Apical-to-basolateral	頂端側から基底側
$AUC_{0\text{-}24}$	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 to 24 hours postdose	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
$AUC_{0\text{-}\tau}$	Area under the plasma concentration-time curve during a time interval	投与間隔の血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{∞}	Area under the plasma concentration-time curve from time 0 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
AUC_{last}	Area under the concentration-time curve from time 0 to the last measurable timepoint	投与後 0 時間から最終測定可能時点までの濃度－時間曲線下面積
BL-AP	Basolateral-to-apical	基底側から頂端側
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BDC	Bile-duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BFC	7-Benzyloxy-4-(trifluoromethyl)-coumarin	7-ベンジルオキシ-4-(トリフルオロメチル)-クマリン
BLQ	Below the limit of quantitation	定量下限未満
BQ	7-Benzyloxyquinoline	7-ベンジルオキシキノロン
C_0	Estimated concentration immediately following intravenous administration	静脈内投与時の投与時点の血漿中濃度の推定値
C_{avg}	Average plasma concentration	平均血漿中濃度
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate	3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート
CL_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
CL/F	Apparent plasma clearance	見かけの血漿クリアランス
CL_{ss}/F	Apparent plasma clearance at steady state	定常状態における見かけの血漿クリアランス
C_{max}	Maximum observed concentration	最高濃度
$C_{max,ss}$	Maximum plasma concentration at steady state	定常状態における最高血漿中濃度
C_{min}	Minimum plasma concentration	最低血漿中濃度
CSF	Cerebral spinal fluid	脳脊髄液
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	Dose range-finding	用量設定
ECLIA	Electrochemiluminescence immunoassay	電気化学発光免疫測定法
EFD	Embryo-fetal development	胚・胎児発生
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
7-HC	7-Hydroxycoumarin	7-ヒドロキシクマリン
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胚腎
HLM	Human liver microsomes	ヒト肝ミクロソーム
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー

略語	定義（英語）	定義（日本語）
HRP	Horseradish peroxidase	西洋ワサビペルオキシダーゼ
IC_{50}	50% Inhibitory concentration	50%阻害濃度
Ig	Immunoglobulin	免疫グロブリン
K_2EDTA	Dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
$K_{i,u}$	Unbound inhibitory constant	非結合型薬物の阻害定数
KLH	Keyhole limpet hemocyanin	キーホールリンペットヘモシアニン
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	—
MATE	Multidrug and toxin extrusion	多剤排出輸送体
MC1R	Melanocortin type 1 receptor	メラノコルチン 1 型受容体
MC3R	Melanocortin type 3 receptor	メラノコルチン 3 型受容体
MC4R	Melanocortin type 4 receptor	メラノコルチン 4 型受容体
MDCK	Madin-Darby canine kidney	—
mPEG-DSPE	N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine	N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000)-1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H tetrazolium, inner salt	3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルフォフェニル)-2H-テトラゾール-3-イウム
NA	Not applicable	該当なし
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NC	Negative control	陰性対照
NMU	N-nitrosomethylurea	N-ニトロソメチル尿素
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NZW	New Zealand White	—
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OD	Optical density	光学密度
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PARR	Peak area response ratio	希釈倍率で補正した内部標準に対するピーク面積比
PBS	Phosphate-buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PPD	Pre/postnatal development	出生前及び出生後の発生
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
R_{ac}	Systemic accumulation ratio	曝露量の蓄積比
RM-493	Setmelanotide	—
ROI	Region of interest	関心領域
SD	Sprague-Dawley	—
$t_{1/2}$	Half-life	半減期
Tg	Transgenic	トランスジェニック

略語	定義（英語）	定義（日本語）
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TMB	Tetramethylbenzidine	テトラメチルベンジジン
UV	Ultraviolet	紫外線
V_z/F	Apparent volume of distribution	見かけの分布容積
[redacted]	[redacted]	—

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

非臨床試験で用いた動物種における setmelanotide（別名 RM-493）の薬物動態（PK）、トキシコキネティクス（TK）、吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）の特徴を明らかにするための試験を実施した。使用した動物種及び系統は、概して setmelanotide の毒性評価に使用した動物であることから、ヒトへの安全な投与を裏付けるための毒性試験における曝露量を評価することができる。非臨床試験で用いた動物種であるマウス、ラット、ウサギ及びサルに、setmelanotide を静脈内ボーラス、皮下ボーラス投与又は皮下持続投与により単回又は反復投与した。開発過程において、setmelanotide の製剤及び投与方法はその安全性及び投与の簡便さのために変更された。当初は生理食塩液で調製した setmelanotide（setmelanotide/生理食塩液）を 24 時間皮下持続投与したが、製剤及び投与方法の変更により、生理食塩液、N-(カルボニル-メトキシポリエチレングリコール-2000)-1,2-ジステアロイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン（mPEG-DSPE）及び保存料を含有又は非含有の 5%マンニトールで 1:10 に希釈した mPEG-DSPE 製剤が皮下ボーラス投与に用いられた。いずれの開発段階においても、setmelanotide は mPEG-DSPE と抱合化することはなく、mPEG-DSPE は製剤の一成分として用いられた。重要な臨床試験に用いられた最終製剤は、皮下ボーラス投与用の保存料添加及び非添加の 5%マンニトールで 1:10 に希釈した mPEG-DSPE である。したがって、本項では mPEG-DSPE を媒体とした setmelanotide（setmelanotide/mPEG-DSPE）を使用した主要な試験又は mPEG-DSPE の使用を裏付ける試験の結果を示す。また、2.6.4.8 項に開発初期における投与経路及び製剤に関するデータを示す。

全ての動物種における血漿中 setmelanotide 濃度は、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）法を用いて測定した。一部の試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）非適用試験として実施したが、大部分の重要な TK 試験では特に、血漿中 setmelanotide 濃度は、バリデートされた分析法により GLP に準拠して測定した。Setmelanotide に対する抗薬物抗体（ADA）は、該当する場合、バリデートされた酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）及び電気化学発光免疫測定法（ECLIA）により、GLP に準拠して測定した。ADA の分析法は setmelanotide に対する抗体に特異的であった。

保存料添加及び非添加の 5%マンニトールで 1:10 に希釈した mPEG-DSPE の皮下用製剤をヒトに用いることを裏付ける in vitro 及び in vivo の PK、TK 及び ADME 試験を表 2.6.4-1 に要約した。全ての試験結果の概要表は 2.6.5 に示す。全体的な結果の要約を以下に示す。

表 2.6.4-1　ヒトでの setmelanotide/mPEG-DSPE の投与を裏付ける in vitro 及び in vivo 非臨床薬物動態試験

Species	Purpose	Formulation	Study Number/ Location in eCTD	GLP?
In Vivo Studies				
Single Dose - Rat				
SD Rat	A Pharmacokinetic, Mass Balance, and Tissue Distribution of [^{14}C]-Setmelanotide following IV or SC Administration to Rats	Setmelanotide in Saline	RM-493-PK-008/ 4.2.2.2-1	No
SD Rat	Pharmacokinetic Study in Males Following a Single Subcutaneous Dose	Setmelanotide in mPEG-DSPE (Undiluted and Diluted 1:1 with 5% Mannitol)	RM-493-PK-004/ 4.2.2.2-2	No
Multiple Dose - Rat				
SD Rat	28-Day DRF	Setmelanotide in Saline and Setmelanotide in mPEG-DSPE (Undiluted)	RM-493-TOX-026/ 4.2.3.2-1	No
SD Rat	28-Day DRF	Setmelanotide in Saline and Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-036/ 4.2.3.2-2	No
SD Rat	26-Week Toxicity with a 4-Week Recovery Period	Setmelanotide in Saline and Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-023/ 4.2.3.2-3	Yes
SD Rat	Fertility and Embryo-fetal Development	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-029/ 4.2.3.5.1	Yes
SD Rat	Pre-/Postnatal Developmental Toxicity	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-033/ 4.2.3.5.3	Yes
Juvenile Rat	DRF in the Juvenile Rat	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-034/ 4.2.3.5.4-1	No
Juvenile Rat	7-Week Juvenile Rat with a 4-Week Recovery Period	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-035/ 4.2.3.5.4-2	Yes
Multiple Dose – Rabbit				
NZW Rabbit	Tolerability and DRF Embryo-fetal Development	Setmelanotide in mPEG-DSPE Undiluted and Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-030/ 4.2.3.5.2-1	No
NZW Rabbit	Embryo-fetal Development Study of Setmelanotide by Subcutaneous Injection in Rabbits	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-031/ 4.2.3.5.2-2	Yes
Single Dose - Monkey				
Cynomolgus Monkey	PK Study	Setmelanotide in mPEG-DSPE and Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:1 with 5% Mannitol	RM-493-PK-006/ 4.2.2.2-3	No

表 2.6.4-1 ヒトでの setmelanotide/mPEG-DSPE の投与を裏付ける in vitro 及び in vivo 非臨床薬物動態試験（続き）

Species	Purpose	Formulation	Study Number/ Location in eCTD	GLP?
Cynomolgus Monkey	PK Crossover Study: Clinical Formulations with and without Preservative	Setmelanotide in Clinical Formulations with and without Preservative	RM-493-PK-007/ 4.2.2.2-4	No
Multiple Dose – Monkey				
Cynomolgus Monkey	A 28-Day DRF	Setmelanotide in Saline and Setmelanotide in mPEG-DSPE (Undiluted)	RM-493-TOX-027/ 4.2.3.2-4	No
Cynomolgus Monkey	39-Week SC Injection Toxicity Study with a 4-Week Recovery Period	Setmelanotide in Saline and Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-024/ 4.2.3.2-5	Yes
Multiple Dose – Mouse Model of Carcinogenicity				
rasH2 Mouse	28-Day DRF in Wild Type rasH2 Mice	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-041/ 4.2.3.4.2-2	Yes
rasH2 Mouse	6-Month Carcinogenicity Study in rasH2-Tg Mice	Setmelanotide in mPEG-DSPE	RM-493-TOX-042/ 4.2.3.4.2-3	Yes
rasH2 Mouse	6-Month Carcinogenicity Study in rasH2-Tg Mice	Setmelanotide in mPEG-DSPE	RM-493-TOX-044/ 4.2.3.4.2-4	Yes
rasH2 Mouse	6-Month Carcinogenicity Study in rasH2-Tg Mice	Setmelanotide in mPEG-DSPE	RM-493-TOX-045/ 4.2.3.4.2-5	Yes
Distribution				
In vitro	Binding of Setmelanotide to Human Plasma Proteins	NA/ In vitro	T0106/ 4.2.2.3-1	No
In vitro	Binding of Setmelanotide to Human, Rat, Mouse and Monkey Plasma Proteins	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP4R1/ 4.2.2.3-2	No
In vitro	Binding of Setmelanotide to Rat and Rabbit Plasma Proteins	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP5/ 4.2.2.3-3	No
In vivo	In vivo Tissue Distribution (QWBA)	Setmelanotide in Saline	RM-493-PK-008/ 4.2.2.2-1	No
In vivo	In vivo Tissue Distribution of [^{14}C]-mPEG-DSPE (QWBA)	[^{14}C]-mPEG-DSPE in 5% Mannitol in Water	RM-493-PK-013/ 4.2.2.3-4	No
Metabolism				
In vitro	Metabolic Stability of Setmelanotide Using Human Cryopreserved Hepatocytes	NA/ In vitro	T0059/ 4.2.2.4-1	No
In vitro	In vitro Assessment of Metabolism of Setmelanotide by Human Liver Microsomes	NA/ In vitro	T0076/ 4.2.2.4-2	No
In vitro	Stability of Setmelanotide in Human Fibroblasts	NA/ In vitro	T0115/ 4.2.2.4-3	No

表 2.6.4-1 ヒトでの setmelanotide/mPEG-DSPE の投与を裏付ける in vitro 及び in vivo 非臨床薬物動態試験（続き）

Species	Purpose	Formulation	Study Number/ Location in eCTD	GLP?
In vitro	Metabolic Stability in Human, Rat, Mouse and Monkey Liver Microsomes, Kidney Microsomes and Hepatocytes	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP1/ 4.2.2.4-4	No
In vivo	In vivo Tissue Distribution (ADME)	Setmelanotide in Saline	RM-493-PK-008/ 4.2.2.2-1	No
Excretion				
In vivo	In vivo Tissue Distribution (ADME)	Setmelanotide in Saline	RM-493-PK-008/ 4.2.2.2-1	No
SD Rats	Pre/Postnatal Development: Excretion During Lactation	Setmelanotide in mPEG-DSPE Diluted 1:10 with 5% Mannitol	RM-493-TOX-033/ 4.2.3.5.3	Yes
PK Drug Interactions				
In vitro	In vitro Cytochrome Inhibition Assessment of Setmelanotide	NA/ In vitro	T0063/ 4.2.2.6-1	No
In vitro	Evaluation of the Potential for Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes in Liver Microsomes by Setmelanotide	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP2_CYP Inhibition/ 4.2.2.6-2	No
In vitro	Evaluation of the Potential for Time-dependent Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes in Liver Microsomes by Setmelanotide	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP2_CYP TDI/ 4.2.2.6-3	No
In vitro	Evaluation of the Potential for Induction of Cytochrome P450 Enzymes in Human Hepatocytes by Setmelanotide	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP2_CYP Induction/ 4.2.2.6-4	No
In vitro	ADME-Tox: AP-BL and BL-AP Permeability Study of Setmelanotide (Caco-2 Cells)	NA/ In vitro	791312/ 4.2.2.6-5	No
In vitro	Substrate and Inhibitor Potential of Setmelanotide for Efflux and Uptake Transporters	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP1/ 4.2.2.6-6	No
In vitro	Substrate and Inhibitor Potential of Setmelanotide for Efflux Transporters MATE1 andMATE2K	NA/ In vitro	[redacted]RHYTP3/ 4.2.2.6-7	No

ADME = absorption, distribution, metabolism, and excretion; AP-BL = apical-to-basolateral; BL-AP = basolateral-to-apical; DRF = dose range-finding; eCTD = electronic Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; IV = intravenous; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; MATE = multidrug and toxin extrusion; NA = not applicable; NZW = New Zealand White; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; PK = pharmacokinetic; SC = subcutaneous; SD = Sprague-Dawley; Tg = transgenic.

ラット及びサルに setmelanotide/mPEG-DSPE を単回及び反復皮下投与したとき、見かけの血漿クリアランス（CL/F）及び見かけの分布容積（V_z/F）は高く、半減期（$t_{1/2}$）は比較的短かった。ラットを用いた 26 週間毒性試験において、ラットの定常状態における見かけの血漿クリアランス（CL_{ss}/F）は雄で 0.338～0.512 L/hr/kg、雌で 0.742～1.54 L/hr/kg であった。V_z/F は雄で 5.06～14.7 L/kg、雌で 3.22～9.44 L/kg であり、$t_{1/2}$ は雄で 7.20～19.9 時間、雌で 1.55～5.69 時間であった。サルを用いた 39 週間毒性試験において、CL_{ss}/F の平均値は 0.0842～0.216 L/hr/kg、V_z/F は 0.563～1.19 L/kg 及び $t_{1/2}$ は 2.49～17.6 時間であった。

全身曝露量はおおむね用量に比例して増加した。マウス、ラット及びサルにおいて、全身曝露量に一貫した性差はみられなかった。蓄積には変動がみられたが、より高用量での反復投与によりわずかに蓄積した。

放射性標識体を用いた PK 試験において、ラットに 2 mg/kg（約 100 μCi/kg）で皮下投与したときの生物学的利用率は、静脈内投与時との比較から 76～85%と高いことが示された。

In vitro 試験による血漿タンパク結合率（4 時間インキュベーション）は、マウスで 82.4%、ラットで 82.1%、ウサギで 76.3%及びサルで 78.3%であった。同様に 4 時間インキュベーションでヒトの血漿タンパク結合率は 79.1%であった。したがって、血漿タンパク結合率は評価した動物種間で類似していた。

ラットにおける setmelanotide の組織分布試験の結果から、setmelanotide の主要な消失経路は尿中排泄であることが確認された。定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）を用いた試験では、[^{14}C]-setmelanotide 由来の放射能の最高濃度（C_{max}）及び投与後 0 時間から最終測定可能時点までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）は、雌雄共に腎臓（全ての部位）で最も高く、次いで肝臓及び肺、並びに雌の子宮及び卵巣で血漿及び全血と同程度の比較的高濃度の曝露がみられた。放射能に対する曝露量が最も低値を示したのは脳及び眼であった。AUC_{last} に基づいて算出した腎臓の組織／血漿比は最大 37 であり、[^{14}C]-setmelanotide 及び／又はその代謝物が腎臓に高濃度で存在することが確認された。他の全ての組織／血漿比から、他の組織への分布は限定的であることが示された。また、有色皮膚と白色皮膚への分布に差異はみられなかった。

ラットに[^{14}C]-setmelanotide を投与した試験において、ラット血漿試料のラジオ高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による分析の結果、setmelanotide 未変化体の放射能の関心領域（ROI）は測定された放射能の 76～95%であった。

In vitro 試験及びラットでの in vivo 試験により、setmelanotide は肝臓で代謝されないことが示され、併用薬との薬物相互作用の可能性は低いことが示唆された。これらの試験の詳細は後述するが、setmelanotide の代謝には主要なチトクローム P450（CYP）は関与しないこと、及び主要な消失経路は尿中排泄であることが示された。ラット尿中には 19 種類の代謝物が検出され、そのうち 4 種類の代謝物は一部の試料で投与量の 5%以上であった。ラット尿中で投与量の 5%以上を占める 4 種類の代謝物のうち 2 種類は、臨床試験（RM-493-026 試験［5.3.3.1.4］）で採取した尿中でも検出された。被験者数は 6 例と少なく、データに変動がみられたが、主要なヒト尿中代謝物である M19 は投与した 3 mg の約 2%、もう 1 種類の代謝物 M7 は投与量 3 mg の 1%未満に相当すると推定された。Setmelanotide 未変化体は投与量 3 mg の 20～40%に相当すると推定された。Setmelanotide の主要な代謝経路は、C 末端アミドの加水分解による[redacted]（代謝

物 M19 として同定）への変換であった。さらに主要代謝物は加水分解により代謝される。尿中代謝物の生成メカニズムは不明であるが、in vitro 及び in vivo データから肝代謝ではないことが示唆された。

ラットに[^{14}C]-setmelanotide を投与した試験において、糞試料の分析の結果、検出された放射能は 1 種類の代謝物であり、その代謝物は主要代謝物からの加水分解（[redacted]が[redacted]に変換された代謝物の加水分解）、さらに[redacted]の切断及び[redacted]からの[redacted]側鎖の脱離によって生成した代謝物であった。これらのデータ及び放射能の高い尿中排泄率から、ラットにおいて setmelanotide は肝臓で代謝されないことが示された。

臨床試験（RM-493-026 試験［5.3.3.1.4］）において、尿中 setmelanotide 及び代謝物の測定のため一部の被験者から経時的に尿を採取した。ラットでは尿中から複数の代謝物が検出され、投与量の 5%以上の代謝物は 4 種類のみであったのに対し、ヒトにおけるこれら 4 種類の代謝物に絞った探索的評価では、尿中で定量可能であった代謝物は M19 及び M7 のみであった。M19 は C 末端アミドの加水分解により[redacted]に変換された代謝物であり、M7 は[redacted]－[redacted]間の結合の切断及び[redacted]のさらなる脱離によって生成する。

肝代謝に関する in vitro 試験において、setmelanotide はヒト、ラット及びサルの肝ミクロソーム中で安定であることが示された。腎ミクロソームの安定性評価に用いることができる公知の陽性対照はなく、評価系の妥当性が確認できなかったものの、ヒト、ラット及びサルの腎ミクロソーム中でも安定であることが示された。また、setmelanotide はヒト、ラット及びサルの肝細胞中でも安定であることが示された。さらに実施した in vitro 試験では、setmelanotide は 1.2 µmol/L（臨床用量における曝露量に対して高いマージンを示す濃度）で、CYP3A に対して 18.2%阻害し、他の主要な CYP 分子種に対して阻害作用を示さなかった。また、setmelanotide は CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A を誘導する可能性は低い。なお、1 µmol/L までの濃度で 1 例のドナーから調製したヒト肝細胞に対して細胞毒性はないことが示された。さらに、ヒト肝ミクロソーム（HLM）中で setmelanotide は CYP の時間依存的阻害剤ではないことが示された。Setmelanotide は多剤排出輸送体（MATE）1 及び MATE2K を含む評価したいずれのトランスポーターの基質又は阻害剤ではないことが示された。

排泄に関するデータから、雌雄ラットに[^{14}C]-setmelanotide を単回皮下又は静脈内投与したとき、投与後 168 時間までに投与量の 90%超が尿、糞及びケージ洗浄液中に排泄された。投与経路に関わらず、排泄された[^{14}C]-setmelanotide の大部分は尿中に排泄され、投与量の 10%未満が糞中に排泄された。胆管カニューレ挿入（BDC）動物では、皮下投与後 48 時間までに尿中（ケージ洗浄液を含む）に投与量の 82.7%、糞中に 4.3%及び胆汁中に 1.9%が排泄された。

ラットでは、未変化体及び代謝物は主に尿中に排泄され（85.1%）、糞中排泄率は小さかった（6.2%）。様々な排泄物の抽出物中から未変化体及び 19 種類の代謝物が検出され、代謝物が占める割合が最も高かったのは尿中であった。ラット試験では、試料採取時に安定剤を使用しなかったことに留意する必要があり、臨床試験では血漿試料に市販のプロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤カクテルである Halt®が使用され、尿試料には 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホナート（CHAPS）が使用された。試料前処理中、試料は氷上で操作したが、安定剤の不使用が代謝物プロファイルに影響を与えた可能性がある。いくつかのラッ

ト尿試料で投与量の 5%以上に相当する代謝物は 4 種類認められた。Setmelanotide の主要な代謝経路は、C 末端アミドの加水分解による[redacted]（M19）への変換と同定した。さらに主要代謝物は加水分解により代謝される。尿中で認められた 4 種類の代謝物の探索的試験の結果、遊離[redacted]体である M19 のみが、メラノコルチン 1 型受容体（MC1R）、メラノコルチン 3 型受容体（MC3R）及びメラノコルチン 4 型受容体（MC4R）に対して活性を示したが、その活性は setmelanotide 未変化体の約 10 分の 1～約 3 分の 1 であった。他の代謝物の活性は全体的に 1,000 分の 1 未満であった。

rasH2-トランスジェニック（Tg）マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験（RM-493-TOX-042 試験［4.2.3.4.2-3］）の Day 183 の 2 つの試料を除いて、非臨床毒性試験で用いた全ての動物種で、ADA 陽性と判定された試料は認められなかった。陽性と判定されたいずれの試料も確認アッセイでの阻害率は低く、一方の試料は対照群の試料であり、偽陽性である可能性が高い。もう 1 つの試料は 1 mg/kg 群の雌マウスの試料であったが、カットポイントが 11.1%と非常に低かったため、この試料も偽陽性の可能性がある。評価した全ての動物で TK は、予備試験の結果と比較すると、Day 182 における血漿中 setmelanotide 濃度がわずかに低値を示したことから（それぞれ 478 ng/mL 対 428 ng/mL）、ADA が存在したとしても、TK に影響を与えなかったことが示唆された。

ラットに[^{14}C]-mPEG-DSPE を皮下投与した PK、マスバランス及び組織分布試験（RM-493-PK-013 試験［4.2.2.3-4］）において、単回投与後 336 時間までに投与量の 95～97%が尿、糞及びケージ洗浄液中に排泄された。投与量の 73～75%が尿中（ケージ洗浄液を含む）に、23%が糞中に排泄された。20 mg/kg/日（10 µCi/kg/日）で 7 日間反復投与したとき、投与後 24 時間、2 週間、7 週間及び 12 週間における脈絡叢中濃度は、大部分の動物において定量下限未満（BLQ）であった。単回投与後の血漿での $t_{1/2}$ は雄で 43.2 時間、雌で 30.1 時間であり、反復投与による mPEG-DSPE のわずかな蓄積が示唆された。

臨床試験（RM-493-026 試験［5.3.3.1.4］）で、男性被験者 6 例に setmelanotide を 2 mg で 1 日 1 回 1 週間反復投与し、続いて 3 mg で 1 日 1 回 11 週間投与したときの PK 解析の結果、12 週目における C_{max} の平均値は 37.9 ng/mL で、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（AUC_{∞}）の平均値は 576 ng*hr/mL であった。PK パラメーター及び動物を用いた毒性試験で得られた無毒性量における曝露量に基づいて、最高臨床用量 3 mg における安全域を算出した（2.6.6.9）。非臨床試験（生理食塩液を含む）から得られた安全域を表 2.6.4-2 に示す。これらの毒性試験における安全域は、ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験を除き、setmelanotide の臨床用量 3 mg の曝露量に対して大きな安全域があることが示された。

表 2.6.4-2 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における最高臨床用量 3 mg/日に対する安全域

Study	Setmelanotide Exposure Margins [a]	
	C_{max}	AUC
6-Month Rat [b]	20	9
9-Month Monkey	32	26
Juvenile Rat	21	7
Female Fertility and EFD in Rats	34	11
EFD in Rabbits	1.4	0.4
PPD in Rats	20	7
26-Week Carcinogenicity in rasH2-Tg Mice [c]	81	17

AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximum observed concentration; EFD = embryo-fetal development; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; PPD = pre/postnatal development; SC = subcutaneous.

a. Setmelanotide exposure margins are based on average C_{max} of 37.9 ng/mL and AUC_{∞} of 576 ng*hr/mL (data from Clinical Study RM-493-026 (5.3.3.1.4) with males (n=6) administered 3 mg setmelanotide/mPEG-DSPE subcutaneously once daily for 12 weeks).
b. Includes evaluation of male fertility.
c. Estimated exposure based on Day 28 toxicokinetic data from wild type rasH2 mice (Study RM-493-TOX-041 [4.2.3.4.2-2]) in males and females combined.

毒性試験の結果と共にこれらの非臨床 PK、TK 及び ADME データから、setmelanotide のヒトへの安全な投与が支持された。

2.6.4.2 分析法

2.6.4.2.1 血漿中 setmelanotide 濃度

2.6.4.2.1.1 GLP 非適用の試料分析

初期の GLP 非適用のスクリーニング PK 試験の数試験において、ラット及びサルの血漿中 PK を評価した。分析法を簡潔に示すと、GLP 非適用試験では血液試料を採取し、遠心分離により得られた血漿試料を-80℃で保存した。血漿（200 µL）は、10 µL のギ酸で酸性にし、600 µL のアセトニトリルで除タンパクした。遠心分離により上清を回収し、スピードバキュームで乾燥した。乾固した残渣は 150 µL の 30%アセトニトリルに溶解し、遠心分離後、50 µL を TurboIonSpray®プローブを装備した質量分析装置 API 4000™ を接続した LC-MS/MS 装置で測定した。多重反応モニタリングモードによる分子イオンの検出は、分子イオンピーク 559.5 及び 110.1 を用いた。HPLC による分離は、Luna™ C8(2) 2 × 30 mm、3 µm カラムを使用し、移動相 A は 1%ギ酸水溶液、移動相 B は 1%ギ酸添加アセトニトリルを用いた。移動相 B の比率を 10 分間に 0%から 90%に変化させ、流速は 0.3 mL/min に設定した。定量下限は 5 ng/mL であった。

2.6.4.2.1.2 GLP 適用の試料分析

GLP 試験において、C57BL/6J マウス（rasH2-トラスジェニック［Tg］マウスを含む）、ラット、ウサギ及びサルの Halt®で安定化したエチレンジアミン四酢酸二カリウム（K_2EDTA）添加血漿試料の分析法のバリデーションを実施し、試料中の setmelanotide 濃度を測定した。[redacted]（[redacted]）によってバリデートされた各種分析法は、それぞれ ATM2136

（4.2.2.1-1）、ATM1697（4.2.2.1-2）、ATM1831（4.2.2.1-4）及び ATM1698（4.2.2.1-5）である。これらの分析法は、ヒト血漿で 0.50～2,000 ng/mL、TK 試験で用いた非臨床動物種の血漿では 5～2,000 ng/mL の検量線範囲でバリデートされた。試料は氷上（ベンチトップ）及び 5 回の凍結融解サイクルでも安定であった。

Setmelanotide 及び内部標準である[$^{13}C_{11}$,$^{15}N_2$]-setmelanotide を添加した安定化血漿試料は、アセトニトリルで抽出した。遠心分離後、上清を回収し、蒸発乾固した。再溶解した抽出物の一部を、HPLC カラムを備えた LC-MS/MS（例：Sciex API 5000™）で測定した。Setmelanotide の *m/z* 559 から生成した *m/z* 110 の分子イオンピークの面積を、内部標準である[$^{13}C_{11}$,$^{15}N_2$]-setmelanotide の *m/z* 566 から生成した *m/z* 110 の分子イオンピークの面積と比較して測定した。試料調製日に作成した検量線を用いて、主に $1/x^2$で重み付けされた線形最小二乗回帰分析により定量した。分析時のパラメーターの詳細は、添付した個別の報告書に記載した。

上記の血漿中 setmelanotide 濃度の分析法は、ヒト臨床試料の血漿中 setmelanotide 濃度測定に用いたバリデートされた分析法と同じ分析法である。

2.6.4.2.2 ラット乳汁中 setmelanotide 濃度

ラットの乳汁中濃度測定にも同じ LC-MS/MS 法を用い、GLP に準拠してバリデーションを実施した（ATM2231［4.2.2.1-3］）。本分析法は、ラットを用いた出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験（RM-493-TOX-033 試験［4.2.3.5.3］）において、母動物から採取した乳汁試料の測定で使用した。

2.6.4.2.3 抗 setmelanotide 抗体

以下に示す全ての ADA の分析法のバリデーション及び測定は、GLP に準拠して実施した。

2.6.4.2.3.1 C57BL/6J マウス

C57BL/6J マウス血清の setmelanotide に対する抗体の定性的分析のために、直接法による ELISA（AR6450［4.2.2.1-6］）の精度、感度及び再現性を評価し、分析法をバリデートした。測定試料は、ELISA プレートに固定化した setmelanotide とインキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、結合した抗体はヤギ抗マウス免疫グロブリン（Ig）G/A/M-西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）（陽性対照ではウサギで産生した血液に対するヤギ抗ウサギ IgG-HRP）で検出し、テトラメチルベンジジン（TMB）の基質溶液で発色した。硫酸で発色を停止し、補正波長を 650 nm に設定し、450 nm の発色強度を測定した。

各プレートには、3 段階の希釈倍率（1:1,000、1:20,000 及び 1:50,000 の 5%C57BL/6J マウス血清）の陽性対照 2 セット並びに陰性対照（NC）4 セットを分注し、それぞれ 2 回繰り返し測定した。陽性及び陰性対照は、分析性能をモニターし、プレートの結果の採否及びカットポイントを決定するために用いられた。なお、2 つのウェルはマウス IgG でコートし、ヤギ抗マウス IgG/A/M-HRP の直接の陽性対照とした。

正常な個体別の C57BL/6J マウス試料 30 試料を分析し、試料分析時に使用されるスクリーニ

ングアッセイのカットポイントを決定した。各個別試料を重複して 3 回繰り返して測定し、測定した光学密度（OD）の 2 例の平均値を算出した。rasH2 マウス 1 例も 3 回測定した。JMP®を用いて測定データの外れ値を解析した。外れ値を除去した後、JMP®ソフトウェアを用いてデータの正規性を解析した。データは正規分布していないと判断されたため、JMP®を用いて個別の OD 値は対数変換し、再度外れ値を解析した。その結果、外れ値は存在しなかったため、JMP®ソフトウェアでデータの正規性を解析し、正規分布すると判断した。プールした対数変換した値の平均値及びプールした標準偏差の 1.645 倍を用いてパラメトリック法でバリデーションのカットポイントを算出し、3.408 となった。このカットポイントを用いたところ、いずれの試料からも偽陽性は検出されなかった。結果として、95 パーセンタイルを使用した、より保守的なカットポイントを設定した。外れ値除去後の個別試料の OD 値を使用し、95 パーセンタイルを算出し、NC2 の平均値から 95 パーセンタイルを差し引くことで付加的なカットポイントは 0.100 と算出された。このカットポイントを用いると、バリデーションで分析した個体別試料から偽陽性率は 5%と判断した。試料分析においてこのカットポイント（0.100）を抗マウス NC2 の全体平均値に加えてプレートのカットポイントを決定した。

試料分析において試料を 3 段階に希釈（1:20、1:100 及び 1:500）し、2 回繰り返し測定でスクリーニングし、抗体の有無を判定した。試料はプレートのカットポイントの OD 値で評価し、プレートのカットポイントは抗マウス NC2 の OD 値の平均値にカットポイントファクター0.100 を加えた値とした。1:20 の希釈でカットポイントの OD 値未満の試料は陰性と判定し、<20 と報告した。定義したカットポイントの OD 値以上の試料は、陽性の可能性ありと判定した。定義したカットポイント以上の OD 値を示した陽性の可能性のある全ての試料は、確認アッセイで確認することとした。陽性の可能性ありと判定された試料のタイターは、カットポイントの OD 値以上の OD 値を示した最低希釈倍率の逆数として定義した。スクリーニングアッセイでプレートのカットポイント以上の OD 値の平均値を示し、タイターが 125 以上の試料は、6 段階で希釈（1:20、1:100、1:500、1:2,500、1:12,500 及び 1:62,500）し、再びタイターを測定した。1:62,500 で希釈した試料の OD 値がエンドポイントに到達せず、確認アッセイで陽性が確認された場合、結果は 62,500 超（>62,500）として報告した。1.0%の偽陽性率に基づき、シグナルの阻害が 5.4%以上の試料は陽性とみなした。

Setmelanotide に対する抗体の陽性の判定は、スクリーニングアッセイで陽性の可能性があると判定され、確認アッセイで陽性が確認され、投与後のタイターが投与前のタイターを超えることとした。

2.6.4.2.3.2 C57BL/6J マウスの追加バリデーション

分析法 AR6450（4.2.2.1-6）が改訂された規制ガイダンスに準拠していることを評価するために追加バリデーションを実施した。AR6450 の追補 1 では長期安定性を評価し、追補 2 では変更した分析法をバリデートした。なお、AR6450 の追補 2 の報告書は 149-C1103-[redacted]0057（4.2.2.1-7）とした。

この方法は、C57BL/6J マウス血清中の setmelanotide に対する抗体を検出する直接法による ELISA である。試料は、ELISA プレートに固定化した setmelanotide とインキュベートした。イ

ンキュベーション後、プレートを洗浄し、結合した抗体はヤギ抗マウス IgG/A/M-HRP（陽性対照ではヤギ抗ウサギ IgG-HRP）で検出し、TMB 基質溶液で発色した。2 規定の硫酸で発色を停止し、補正波長を 650 nm に設定し、450 nm の発色強度を測定した。

各プレートには、分析の性能をモニターし、カットポイントを決定するために陽性及び陰性対照（NC1 及び NC2）を用いた。NC は分析用緩衝液で 1:20 に希釈した C57BL/6J マウス血清とした。1:400、1:4,000 及び 1:8,000 の希釈倍率の陽性対照及び抗ウサギ NC は、プレートの結果の採否を決定し、ヤギ抗ウサギ IgG-HRP に関連するバックグラウンドを制御するために使用した。抗マウス NC は、ヤギ抗マウス IgG/A/M-HRP に関連するバックグラウンドをモニターし、プレートのカットポイントの決定に用いた。2 つのウェルはマウス IgG でコートし、通常の分析におけるバックグラウンドのモニターに用い、非特異的結合抗体及びヤギ抗マウス IgG/A/M-HRP コンジュゲートに関連する直接分析の NC とした。

2.6.4.2.3.3 マウスの電気化学発光免疫測定

ADA 測定施設の閉鎖に伴い、新たに [redacted] においてマウス血清中の setmelanotide に対する ADA 測定のための ECLIA（TM3186［4.2.2.1-8］）を開発し、バリデートした。本測定法ではブリッジング法が採用され、酸解離処理したマウス血清試料は、確認アッセイ用の setmelanotide の有無にかかわらず Master Mix で中和された後、setmelanotide でプレコートされた標準 Meso Scale Discovery プレートに移された。インキュベーション中に抗 setmelanotide 抗体は setmelanotide に結合した。各ウェルを十分に洗浄後、ビオチン標識された setmelanotide を添加した。ビオチン標識 setmelanotide は、setmelanotide でコーティングに結合した抗 setmelanotide 抗体に結合し、これにより薬物と抗 setmelanotide 抗体間の免疫複合体を形成した。インキュベーション後、複合体はビオチンーアビジン結合により結合したストレプトアビジンーSulfoTAG 試薬を添加することで検出される。最終インキュベーション後、プレートを読み取った。プレートの読み取り中に生じた電気化学発光シグナルは、試料中に存在する抗 setmelanotide 抗体の量に比例した。

試料分析では、全てのスクリーニングアッセイ及び確認アッセイで、各プレート上に 2 セットの 3 段階の濃度の陽性対照及び 4 セットの陰性対照が含まれた。これらの試料は分析性能をモニターし、プレートの適合性やカットポイントを決定するためのものであり、測定結果との関連性はない。

測定用試料を逐次的アプローチに従って段階的に分析した。最初にスクリーニングアッセイにおいて、2 セットの試料を測定した。2 例の平均値がスクリーニングアッセイのカットポイント未満の場合、その試料は陰性と判定され、それ以上の確認試験は実施しなかった。スクリーニングアッセイのカットポイント以上の応答を示した試料は、陽性の可能性があると判定し、確認アッセイによりさらに評価した。陽性の可能性のある測定試料は、setmelanotide 非添加及び過剰な setmelanotide を添加した条件の両方で分析した。各測定試料の阻害率を算出し、阻害率が確認アッセイ用のカットポイント未満の場合、その試料は陰性と判定され、それ以上の分析は実施しなかった。

2.6.4.2.3.4 Sprague-Dawley ラット及びカニクイザル

[redacted]において Sprague-Dawley（SD）ラット（AR3709［4.2.2.1-9］）及びカニクイザル（AR3708［4.2.2.1-11］）の setmelanotide に対する抗体を測定するための定性的 ELISA を開発し、バリデートした。試料は、ELISA プレートに固定化した setmelanotide とインキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、結合した抗体はペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ラット IgG+IgM-HRP 又はヤギ抗サル IgG、IgA、IgM (H+L)-HRP で検出し、TMB 基質溶液で発色した。続いて酸性の停止溶液を添加し、酵素による基質の変換率を、450 nm の吸光度の測定により決定した（補正波長は 650 nm に設定）。NC は、各動物種の少なくとも 30 例の正常個体から得られた血清試料（[redacted] Inc.、[redacted]、米国ニューヨーク州）を用いた。正常個体 30 例の血清試料のセットは、バリデーション時には 1:10 で希釈して分析した。陽性対照として、setmelanotide のキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）抗原で免疫されたウサギで産生した血液を使用した。陽性対照は、ラットでは 1:5,000、1:10,000 及び 1:100,000、サルでは 1:1,000、1:10,000 及び 1:50,000 の 3 段階に希釈して用いた。

試料分析では、各プレートに各動物種に特有の 10 個体の血清パネルの陰性対照及び 3 段階の濃度の陽性対照を分注し、2 回繰り返し測定した。これらの試料は分析性能をモニターし、プレートの結果の採否及びカットポイントを決定するためのものであり、測定結果との関連性はない。

試料を 1:10 及び 1:70 で希釈し、2 回繰り返し測定によりスクリーニングし、試料が陽性を示すか判断した。1:10 の希釈でカットポイントの OD 値以下の試料は陰性と判定した。定義したカットポイントの OD 値を超えた試料は陽性と判定し、タイター測定用プレートで再度分析した。陽性であった試料のタイターは、カットポイントの OD 値を超えた最大の希釈率の逆数として定義した。陽性試料は、100 ng/mL の setmelanotide 存在下でのカットポイントとした確認アッセイで分析した。シグナル阻害がラットでは 30%以上、サルでは 25%以上である試料は陽性と判定した。

2.6.4.2.3.5 New Zealand White ウサギ

[redacted]において New Zealand White（NZW）ウサギ血清中の setmelanotide に対する抗体を測定するための ELISA（AR4135［4.2.2.1-10］）を開発し、バリデートした。試料は、ELISA プレートに固定化した setmelanotide とインキュベートした。インキュベーション及び洗浄後、結合した抗体はペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG-HRP で検出し、TMB 基質溶液で発色した。続いて酸性の停止溶液を添加し、酵素による基質の変換率を、450 nm の吸光度の測定によって決定した（補正波長は 650 nm に設定）。NC は、NZW ウサギの正常個体 34 例から新たに採取した血清試料（[redacted] Inc.、[redacted]、米国ニューヨーク州）を用いた。この 34 例の正常個体の血清試料のセットは、バリデーション時に 1:50 で希釈して分析した。Setmelanotide-KLH 抗体で免疫されたウサギで産生した血液を陽性対照として使用した。陽性対照は、1:1,000、1:5,000 及び 1:25,000 の 3 段階に希釈して用いた。

試料分析では、各プレートに 10 個体の NZW ウサギ血清パネルを陰性対照及び 3 段階の濃度

の陽性対照を分注し、2 回繰り返し測定で分析した。これらの試料は分析性能をモニターするためのものであり、測定結果との関連性はない。各試料は、プレートのカットポイントの OD 値の評価に用いられ、カットポイントの OD 値は、1:50 で希釈した 10 個体の正常な NZW ウサギ血清の OD 値の平均値及び標準偏差の 1.645 倍と定義した。

抗体の有無を判断するために試料を 1:50 及び 1:250 で希釈し、2 回繰り返し測定でスクリーニングした。1:50 で希釈した試料でカットポイントの OD 値以下の試料は、陰性と判定した。また、OD 値の平均値がカットポイントの OD 値を超えていても、タイターが投与前の試料のタイター以下であれば、陰性と判定した。1:50 で定義したカットポイントの OD 値を超え、1:250 のカットポイントの OD 値以下の場合、50 として報告した。これらの試料のタイターは算出しなかった。定義されたカットポイントの OD 値を超えた試料は、陽性と判断し、タイターを再測定した。陽性と判定した試料のタイターは、カットポイントの OD 値を超えた最小希釈倍率の逆数として定義した。最大希釈率 1:156,250 で陽性のシグナルを示す試料のタイターは、>156,250 と報告した。陽性試料は、10 µg/mL の setmelanotide 存在下での特異性カットポイントとしたアッセイで分析した。0.1%の偽陽性率に基づいてシグナル阻害が 28.6%以上の試料は陽性と判断した。

2.6.4.2.4 PK 又は TK 解析

GLP 試験では、全体的に、経時的な血漿中濃度データは Watson LIMS™ から Phoenix™ WinNonlin®（バージョン 6.4 以上、Pharsight Corporation）に Custom Query Builder オプションを使用して直接転送し、解析した。経時的な血漿中濃度データは WinNonlin®でノンコンパートメント法により解析した。データの要約及び記述統計において、BLQ の血漿中濃度データはゼロ（0.00 ng/mL）とした。全ての PK 又は TK 解析では、Watson LIMS™ の機械精度に基づいた有効数字三桁に丸めていない完全な血漿中濃度データを使用した。

経時的な血漿中濃度データは用量、試験日及び性別ごとに、各設定時点における記述統計（平均、標準偏差、変動係数、最小値、中央値及び最大値）を要約した。各血漿中 setmelanotide 濃度－時間曲線の終末消失相の傾きは、対数線形回帰によって決定した。

各試験における PK 又は TK パラメーターについて、一貫した性差はみられなかったため、データは通常、性別ごと又は雌雄合算した値で要約した。本項の大部分のデータは、雌雄合算した値で示す。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 ラットを用いた吸収試験

2.6.4.3.1.1 単回投与試験

2.6.4.3.1.1.1 [^{14}C]-Setmelanotide の単回投与 ADME 試験

RM-493-PK-008 試験（4.2.2.2-1）

本試験の PK 評価パートにおいて、雌雄 SD ラットにおける[^{14}C]-setmelanotide 由来の放射能の

PK を評価した。血漿試料中の総放射能は液体シンチレーション計数法により測定した。ラットに生理食塩液により[^{14}C]-setmelanotide を 2 mg/kg で単回皮下投与したとき、雄の血漿中 C_{max} は 1.99 µg 等量/g、AUC_{last} は 8.19 µg 等量*hr/mL、雌の血漿中 C_{max} は 1.83 µg 等量/g、AUC_{last} は 7.75 µg 等量*hr/mL であった。最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は、雌雄ともに 1 時間であった。生物学的利用率は、雄で 76%、雌で 85%であった。

ラットに[^{14}C]-setmelanotide を 1 mg/kg で単回静脈内ボーラス投与したとき、雄ラットの静脈内投与時の投与時点の血漿中濃度の推定値（C_0）は 5.60 µg 等量/g、AUC_{last} は 5.38 µg 等量*hr/mL、雌の C_0 は 5.40 µg 等量/g、AUC_{last} は 4.55 µg 等量*hr/mL であった。血漿中の $t_{1/2}$ は、全ての群で算出することはできなかった。

LC-MS/MS で血漿中 setmelanotide 濃度を測定し、総放射能から算出した血漿中[^{14}C]-setmelanotide 濃度データを補完した。皮下投与したとき、setmelanotide は雌雄共に投与後 2 時間まで定量可能であった。循環血中の主要な投与薬物由来化合物は、約 80%又はそれ以上が setmelanotide であった。血漿中 C_{max} は雄で 0.674 µg/mL、AUC_{last} は 1.42 µg*hr/mL で、雌の血漿中 C_{max} は 0.475 µg/mL、AUC_{last} は 0.691 µg*hr/mL であった。t_{max} は雄で 0.5 時間、雌で 1 時間であった。LC-MS/MS による setmelanotide 濃度の測定結果に基づき、生物学的利用率は雄で 79%、雌で 35%であった。雌雄の生物学的利用率の違いは、測定試料の前処理操作における回収率の違いによるものと考えられる。

2.6.4.3.1.1.2 mPEG-DSPE による単回皮下投与 PK 試験

RM-493-PK-004 試験（4.2.2.2-2）

Setmelanotide/mPEG-DSPE の PK を予備的に評価した。雄性 SD ラットに未希釈の setmelanotide/mPEG-DSPE を 5、10 及び 30 mg/kg、又は 5%マンニトールで 1:1 に希釈した mPEG-DSPE を媒体とした setmelanotide（setmelanotide/mPEG-DSPE［1:1］）を 10 mg/kg で単回皮下投与した。

血漿中 setmelanotide 濃度は、setmelanotide の用量増加に伴って増加した。C_{max} は用量比を下回って増加したが、5～10 mg/kg の AUC_{∞}は用量に比例して増加した。AUC_{last} は用量比を上回って増加した。CL/F 及び V_z/F の値は setmelanotide/mPEG-DSPE の 5、10 及び 30 mg/kg 並びに setmelanotide/mPEG-DSPE（1:1）の 10 mg/kg の投与群間でおおむね類似していた。$t_{1/2}$ は 5 及び 10 mg/kg の投与群間で類似しており、4.14～4.56 時間であった。最高用量では少なくとも 24 時間まで吸収が持続し、$t_{1/2}$ を算出できなかった。AUC_{last} 及び AUC_{∞}は異なる製剤／投与媒体を用いた 10 mg/kg の投与群間で同程度であった。t_{max} は setmelanotide/mPEG-DSPE（1:1）10 mg/kg 投与群の方が、未希釈の setmelanotide/mPEG-DSPE 10 mg/kg 群よりも 3 時間早く（2 時間対 5 時間）、C_{max} も高値を示した（704 ng/mL 対 615 ng/mL）。PK データから setmelanotide の持続放出投与に mPEG 製剤の使用が支持された。

2.6.4.3.1.2 反復投与試験

2.6.4.3.1.2.1 28 日間皮下投与用量設定試験（１）

RM-493-TOX-026 試験（4.2.3.2-1）

ラットを用いた長期反復投与毒性試験の setmelanotide の用量選択のためのデータを取得するために、SD ラットに setmelanotide/生理食塩液を 0 及び 30 mg/kg/日又は setmelanotide/mPEG-DSPE を 0、2、10、20 及び 30 mg/kg/日で 28 日間皮下投与したときの TK を評価した。

ラットに setmelanotide/mPEG-DSPE を投与した Day 1 における TK 評価の結果、血漿中 setmelanotide 濃度はおおむね用量増加に伴い増加した。C_{max} は雌雄で類似しており、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_{0-24}）は雌と比較して雄の方がやや高値を示した。2～30 mg/kg/日の用量群の C_{max} は雄で 418～1,620 ng/mL、雌で 351～1,690 ng/mL であった。AUC_{0-24} は、雄で 2,840～32,200 ng*hr/mL、雌で 1,980～24,200 ng*hr/mL であった。C_{max} 及び AUC は反復投与後の方がわずかに高値を示した。

血漿中 setmelanotide 濃度は雄雌共に用量にかかわらず、Day 1 の単回投与時と比較して、反復投与時の方が高値を示した。Setmelanotide の曝露量（C_{max} 及び投与間隔の血漿中濃度－時間曲線下面積［$AUC_{0-\tau}$］）は、同一用量において雌雄で同程度であり、明確な性差はみられなかった。定常状態における最高血漿中濃度（$C_{max,ss}$）はおおむね用量比を下回って増加した。全身曝露量（$AUC_{0-\tau}$）は雌雄ラットでは 2～10 mg/kg/日及び雌では 10～20 mg/kg/日で用量に比例して増加し、雄の 10～20 mg/kg/日及び雌雄の 20～30 mg/kg/日では、用量比をわずかに下回って増加した。全体的に、定常状態における用量比を下回る曝露量の増加は setmelanotide の吸収律速によるものと考えられる。

Setmelanotide/生理食塩液を 30 mg/kg/日で単回投与したときの C_{max} は、setmelanotide/mPEG-DSPE を 30 mg/kg/日で投与したときと比較して雄では 81%、雌では 12%高値を示した。雌雄ラットに setmelanotide/mPEG-DSPE 又は setmelanotide/生理食塩液を 30 mg/kg/日で反復投与したときの血漿中 setmelanotide 濃度は、単回投与時と比較して高値を示した。Setmelanotide/mPEG-DSPE 又は setmelanotide/生理食塩液を 30 mg/kg/日で反復投与したときのそれぞれの C_{max} は雌雄間では同程度であった。また、それぞれの $AUC_{0-\tau}$ は、雌雄共に差はわずかであった。

結論として、2.6.6 に示すように、setmelanotide/生理食塩液（30 mg/kg/日）、setmelanotide/mPEG-DSPE（2、10、20 及び 30 mg/kg/日）あるいは mPEG-DSPE プラセボ（1 又は 3 mL/kg）を 1 日 1 回反復皮下投与したとき、投与部位の状態に基づき忍容性は認められなかった。本試験の TK 及び毒性評価の結果から、代替製剤及び薬液濃度の検討の必要性が示唆された。

2.6.4.3.1.2.2 28 日間皮下投与用量設定試験（２）

RM-493-TOX-036 試験（4.2.3.2-2）

SD ラットを用いた毒性試験で使用する setmelanotide の用量選択のためのデータを取得するために、製剤及び投与薬液濃度の変更による TK を RM-493-TOX-026 試験（4.2.3.2-1）と比較評価した。5%マンニトールで 1:10 に希釈した mPEG-DSPE を媒体とした setmelanotide

（setmelanotide/mPEG-DSPE［1:10］）の用量は 0、1、3 及び 5 mg/kg/日、並びに setmelanotide/生理食塩液の用量は 0、2.5、5、7.5、15 及び 30（15 mg/kg で 1 日 2 回投与）mg/kg/日とした。

Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）及び setmelanotide/生理食塩液の両製剤で TK を評価し、Day 1 及び Day 28 共に setmelanotide 用量増加に伴って C_{max} は増加した。全体的に血漿中 setmelanotide 濃度は、Day 1 と比較して Day 28 の方が高値を示した。

Day 1 において setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）の t_{max} は 0.5～2 時間であった。全体的に、C_{max} は 1～3 mg/kg/日では用量比を下回って増加し、3～5 mg/kg/日では用量に比例して増加した。全体的な全身曝露量（$AUC_{0-\tau}$）は用量に比例して増加した。

Day 28 において t_{max} は 0.5 及び 2 時間であった。C_{max} は 1～3 mg/kg/日で用量比を下回って増加し、3～5 mg/kg/日で用量に比例して増加した。$AUC_{0-\tau}$ は 1～3 mg/kg ではおおむね用量比をわずかに上回って増加し、3～5 mg/kg/日では用量に比例して増加した。

CL_{ss}/F は用量にかかわらず類似しており、0.642～0.737 L/hr/kg であった。V_z/F 及び $t_{1/2}$ は用量増加に伴いわずかに増加した。V_z/F は 1.51～2.57 L/kg、$t_{1/2}$ は 1.42～2.77 時間であった。全身曝露量の蓄積比（R_{ac}）は用量にかかわらず類似しており、1.39～1.80 であり、反復投与による蓄積が示された。

Day 1 において setmelanotide/生理食塩液投与時の t_{max} はいずれの用量でも 0.5 時間であった。全体的に、C_{max} は用量比を下回って増加した。全身曝露量（$AUC_{0-\tau}$）は 2.5～5 mg/kg/日、5～7.5 mg/kg/日及び 7.5～15 mg/kg/日でおおむね用量に比例して増加し、15～30 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。

Day 28 において t_{max} はいずれの用量でも 2 時間であった。C_{max} は 2.5～5 mg/kg/日及び 5～7.5 mg/kg/日ではわずかに用量比を上回って増加し、7.5～15 mg/kg/日及び 15～30 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は 2.5～5 mg/kg で用量比を上回って増加し、5～7.5 mg/kg/日、7.5～15 mg/kg/日及び 15～30 mg/kg/日では用量に比例して増加した。CL_{ss}/F、V_z/F 及び $t_{1/2}$ は用量にかかわらず類似していた。CL_{ss}/F は 0.613～0.847 L/hr/kg、V_z/F は 1.25～2.10 L/kg、$t_{1/2}$ は 1.20～2.32 時間であった。R_{ac} は用量範囲で 2.66～4.81 で変動がみられ、反復投与による蓄積が示された。

Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）の 5 mg/kg/日群と setmelanotide/生理食塩液の 5 mg/kg/日群の C_{max} を比較すると、setmelanotide/生理食塩液を投与したときの方がわずかに高値を示した（1,060 対 880 ng/mL）。また、単回投与時の setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）を 5 mg/kg/日の $AUC_{0-\tau}$ は、setmelanotide/生理食塩液を 5 mg/kg/日の約 2 倍であった（4,340 対 2,140 ng*hr/mL）が、反復投与時はこの傾向はみられなかった。

TK 及び毒性試験の結果（2.6.6）から、投与薬液濃度及び製剤の変更並びにラットの反復投与毒性試験のために選択した用量が裏付けられた。

2.6.4.3.1.2.3 26 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

RM-493-TOX-023 試験（4.2.3.2-3）

雌雄 SD ラットに 26 週間反復皮下投与したときの setmelanotide の毒性を評価し、さらに 4 週間の回復期間を設けて観察された所見の可逆性を検討した。TK パートでは、臨床での安全な

setmelanotide の投与のための安全域を算出するために、非臨床試験で用いた動物種における曝露量データを取得した。用量は setmelanotide/生理食塩液で 3 及び 15 mg/kg/日、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）で 0.5、1.5 及び 3 mg/kg/日とした。

Setmelanotide/生理食塩液（3 及び 15 mg/kg）：Day 1

Day 1 において、t_{max} は 0.5～2 時間であった。Setmelanotide の C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$ は、全体的に雌と比較して雄の方が高値を示した。雌雄共に、3～15 mg/kg/日で C_{max} は用量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は雌では用量に比例して増加したが、雄では 5 倍の用量増加に対して 3.65 倍増加し、用量比をやや下回って増加した。

定常状態における setmelanotide/生理食塩液（3 及び 15 mg/kg）：Day 90 及び Day 180

Day 90 において、t_{max} は 0.5～2 時間であった。$C_{max,ss}$ は setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したとき雌雄で同程度であったが、15 mg/kg/日では雄と比較して雌の方がやや高値を示した。$AUC_{0-\tau}$ は 3 及び 15 mg/kg/日では雌と比較して雄の方が高値を示した。雌雄共に $C_{max,ss}$ は用量に比例して増加した。$AUC_{0-\tau}$ は雄では用量に比例し、雌では用量比を上回って増加した。

$t_{1/2}$ は雌雄で類似しており、3 mg/kg/日と比較して 15 mg/kg/日でわずかに長かった（3 及び 15 mg/kg/日で、雄ではそれぞれ 1.59 及び 2.36 時間、雌ではそれぞれ 1.12 及び 2.71 時間）。

Day 180 の TK パラメーターは Day 90 とおおむね類似していた。t_{max} は 0.5～4 時間であった。Setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したときの setmelanotide の C_{max} は雌雄で同程度であったが、setmelanotide/生理食塩液を 15 mg/kg/日で投与したときの setmelanotide の C_{max} は雄と比較して雌の方がやや高値を示した。$AUC_{0-\tau}$ は、setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したとき、雌と比較して雄の方が高く、setmelanotide/生理食塩液を 15 mg/kg/日で投与したときは雌雄で同程度であった。

C_{max} は雌で用量に比例して増加し、雄ではわずかに用量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は雄で用量に比例し、雌で用量比を上回って増加した。

消失相での定量可能な経時的な血漿中 setmelanotide 濃度データが不足していたため、$t_{1/2}$ は 15 mg/kg/日で投与したときの雄でのみ算出可能であった。この群の $t_{1/2}$ は 3.60 時間で、V_z/F は 2.75 L/kg であった。R_{ac} は 2.78（3 mg/kg/日の雌）～6.48（15 mg/kg/日の雌）であり、反復投与により雌雄で顕著な蓄積が示された。

Setmelanotide/mPEG-DSPE（0.5、1.5 及び 3 mg/kg）：Day 1

Day 1 において、t_{max} は 0.5～2 時間であった。全ての用量群で setmelanotide の C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$ は全体的に雌と比較して雄の方が高値を示した。C_{max} は雌雄で用量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は雌雄でおおむね用量に比例して増加した。

定常状態における setmelanotide/mPEG-DSPE（0.5、1.5 及び 3 mg/kg）：Day 90 及び Day 180

Day 90 において、t_{max} は 0.5～2 時間であった。Setmelanotide の C_{max} は雌雄で同程度であった。また、setmelanotide の $AUC_{0-\tau}$ も雌雄で同程度であった。消失相での定量可能な血漿中

setmelanotide 濃度データが不足していたため、0.5 mg/kg/日の雄及び 1.5 mg/kg/日の雌の $t_{1/2}$ は算出できなかった。$t_{1/2}$ は 1.24 時間（0.5 mg/kg/日の雌）～2.76 時間（1.5 mg/kg/日の雄）であった。

雌雄共に C_{max} はおおむね用量に比例して増加した。雄の $AUC_{0-\tau}$ は 0.5～1.5 mg/kg で用量比を上回って増加し、1.5～3 mg/kg/日で用量に比例して増加した。雌の $AUC_{0-\tau}$ は用量比を上回って増加した。

Day 180 の TK パラメーターは Day 90 とおおむね類似していた。3 mg/kg/日群を除いて、setmelanotide/mPEG-DSPE 投与時の setmelanotide の C_{max} は雌雄で同程度であった。Setmelanotide の $AUC_{0-\tau}$ は雌と比較して雄の方が高値を示した。

雌雄共に、C_{max} はおおむね用量に比例して増加したが、変動がみられた。雄では、$AUC_{0-\tau}$ は 0.5～1.5 mg/kg/日でわずかに用量比を下回って増加し、1.5～3 mg/kg/日で用量に比例して増加した。雌では、$AUC_{0-\tau}$ はわずかに用量比を上回って増加した。

CL_{ss}/F は雄で 0.338～0.512 L/hr/kg、雌で 0.742～1.54 L/hr/kg であった。V_z/F は雄で 5.06～14.7 L/kg、雌で 3.22～9.44 L/kg であった。$t_{1/2}$ は雄で 7.20～19.9 時間、雌で 1.55～5.69 時間であった。

R_{ac} は 1.10（0.5 mg/kg/日の雌）～3.85（0.5 mg/kg/日の雄）であり、雌雄共に反復投与により顕著な蓄積が示された。

Setmelanotide に対する ADA 陽性の血清試料は認められなかった。

2.6.4.3.1.2.4 雌ラットを用いた受胎能及び胚・胎児発生に関する試験

RM-493-TOX-029 試験（4.2.3.5.1）

交配開始 14 日前～妊娠 17 日の期間で、雌性 SD ラットに setmelanotide を反復皮下投与したときの毒性を評価した。Setmelanotide による発情周期、卵管輸送、着床及び胚の着床前段階の発達に対する影響を評価し、着床から硬口蓋閉鎖まで期間の母体曝露による胚及び胎児の発育に対する毒性を評価した。Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）を 0、0.5、3.0 及び 5.0 mg/kg/日で皮下投与し、生理食塩液を陰性対照として用いた。

Day 1 及び妊娠 17 日において、0.5～5.0 mg/kg/日で setmelanotide の用量増加に伴い、血漿中 setmelanotide 濃度の平均値はおおむね増加した。血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は 0.5 mg/kg/日で Day 1 及び妊娠 17 日で同程度であったが、3.0 及び 5.0 mg/kg/日では Day 1 と比較して妊娠 17 日の濃度の方が高値を示した。Day 1 及び妊娠 17 日目において、t_{max} は 0.5～2 時間であった。Day 1 において、C_{max} は 0.5～5.0 mg/kg/日で用量比を下回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は 0.5～3.0 mg/kg/日でわずかに用量比を下回って増加し、3.0～5.0 mg/kg/日では用量に比例して増加した。

Setmelanotide に対する ADA 陽性の血清試料は認められなかった。

2.6.4.3.1.2.5 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

RM-493-TOX-033 試験（4.2.3.5.3）

妊娠、分娩及び授乳期間中の雌性 SD ラットに対する setmelanotide/mPEG-DSPE の毒性を評価し、妊娠 6 日～分娩後 21 日における出生児の発達及び生存、身体的発達、行動及び生殖能に対する影響を評価した。また、妊娠中及び授乳中の母動物並びに出生児の血漿中、母動物の乳汁中 setmelanotide 濃度を測定した。Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）を 0、0.5、3 及び 5 mg/kg/日で投与し、生理食塩液を陰性対照とした。

分娩後 10 日の C_{max} は 0.5～3 mg/kg/日では用量に比例して増加し、3～5 mg/kg/日ではわずかに用量比を上回って増加した。$AUC_{0-\tau}$ は 0.5～5 mg/kg/日で用量比を上回って増加した。用量で正規化した C_{max} は 0.5、3 及び 5 mg/kg/日でそれぞれ 142、142 及び 198 (ng/mL)/(mg/kg)であった。用量で正規化した AUC_{last} は 0.5、3 及び 5 mg/kg/日でそれぞれ 495、781 及び 869 (ng*hr/mL)/(mg/kg)であった。

分娩後 11 日において、母動物に 0.5、3 及び 5 mg/kg/日で投与したとき、乳汁中 setmelanotide 濃度は定量可能であり、乳汁中 setmelanotide 濃度の平均値は 12.0 ng/mL（0.5 mg/kg/日）～106 ng/mL（5 mg/kg/日）であった。分娩後 11 日の投与後 2 時間の乳汁／血漿比は 0.5、3 及び 5 mg/kg/日でそれぞれ 0.39、0.21 及び 0.17 であった。なお、いずれの用量群で出生後 11 日の出生児の血漿中 setmelanotide 濃度は BLQ であった。

2.6.4.3.1.2.6 幼若ラットを用いた用量設定試験

RM-493-TOX-034 試験（4.2.3.5.4-1）

幼若ラットを用いた毒性試験で使用する setmelanotide の用量選択に必要なデータを取得するために、setmelanotide による幼若 SD ラットへの影響を予備的に評価した。本試験における用量は、setmelanotide/生理食塩液は 0 及び 15 mg/kg/日、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）は 0、1、2.5 及び 5.0 mg/kg/日とした。

Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）（薬液濃度 1 mg/mL）投与群では、出生後 7 日及び 34 日の t_{max} はそれぞれ 2 及び 1 時間であった。TK の変動を考慮すると、出生後 7 日及び 34 日において 1～5 mg/kg/日で C_{max} 及び $AUC_{0-\tau}$ はおおむね用量に比例して増加した。Setmelanotide/生理食塩液を 15 mg/kg/日で投与したとき、出生後 7 日及び 34 日の t_{max} はそれぞれ 2 及び 1 時間であった。C_{max} は出生後 7 日において 1,690 ng/mL であり、34 日の 5,300 ng/mL に比べて低値を示した。$AUC_{0-\tau}$ は、評価日間で同程度であった。

2.6.4.3.1.2.7 幼若ラットを用いた 7 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

RM-493-TOX-035 試験（4.2.3.5.4-2）

幼若 SD ラットに setmelanotide を 7 週間（出生後 7～55 日）1 日 1 回反復皮下投与したときの毒性を評価し、さらに 4 週間の回復期間を設けて観察された所見の可逆性を検討した。用量は、setmelanotide/生理食塩液は 0 及び 15 mg/kg/日、setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）は 0、0.5、1.5 及び 3 mg/kg/日とした。

出生後 7 日及び 55 日において、setmelanotide の用量 0.5～15 mg/kg/日で血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は用量増加に伴って増加した。各用量で、出生後 7 日と 55 日の血漿中 setmelanotide

濃度の平均値は同程度であった。全体的に、setmelanotide 濃度は雌雄で同程度であった。

出生後 7 日において、全ての投与群で t_{max} は 1 時間であった。出生後 55 日において、t_{max} は 1～4 時間であった。出生後 7 日において、setmelanotide/mPEG-DSPE を 1.5 及び 3 mg/kg 並びに setmelanotide/生理食塩液を 15 mg/kg で投与したときの $t_{1/2}$ は類似していた（それぞれ 1.21、1.52 及び 1.42 時間）。

出生後 55 日において、$t_{1/2}$ 及び V_z/F は setmelanotide/mPEG-DSPE の 0.5 及び 3 mg/kg/日で類似していた。CL_{ss}/F は用量にかかわらず類似していた。Setmelanotide の R_{ac} は 1.05（0.5 mg/kg/日）～2.04（15.0 mg/kg/日）であり、反復投与によりある程度の蓄積が示された。Setmelanotide の曝露量は、おおむね用量に比例して増加した。

2.6.4.3.2 ウサギを用いた吸収試験

ウサギを用いた単回投与試験は実施しなかった。

2.6.4.3.2.1 反復投与試験

2.6.4.3.2.1.1 忍容性及び胚・胎児発生用量設定試験

RM-493-TOX-030 試験（4.2.3.5.2-1）

本試験において、１）妊娠 NZW ウサギに対する setmelanotide の忍容性の評価、２）ウサギを用いた胚胎児・発生試験で使用する用量選択のためのデータの取得、３）妊娠 NZW ウサギの着床から硬口蓋閉鎖までの期間における setmelanotide/mPEG-DSPE の曝露による胚胎児・発生に対する影響の予備評価を実施した。

忍容性評価において、臨床用製剤と同じ薬液濃度 1 mg/mL に調製した setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）を 0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日で妊娠 7～13 日の 7 日間反復皮下投与し、投与期間後 7 日間の回復期間を設けた。

用量選択評価において、妊娠ウサギに setmelanotide の setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）（薬液濃度 1 mg/mL）を 0、0.05、0.5、3 及び 10 mg/kg/日並びに未希釈の setmelanotide/mPEG-DSPE（薬液濃度 10 mg/mL）を 20 mg/kg/日で投与した。試験動物は 2 つのサブグループに分けられ、サブグループ A では 1 群 3 例のウサギに妊娠 7～13 日に、サブグループ B では別の動物を 1 群 3 例で妊娠 13～19 日に投与した。対照群には妊娠 7～19 日に未希釈の mPEG-DSPE を投与した。

妊娠 7～13 日に投与した動物において、妊娠 7 日の $AUC_{0-\tau}$ の平均値は 0.05～3 mg/kg/日ではわずかに用量比を上回って増加し、3～10 mg/kg/日では用量に比例して増加し、10～20 mg/kg/日では用量比を下回って増加した。妊娠 13 日の $AUC_{0-\tau}$ の平均値は 0.05～0.5 mg/kg/日及び 3～20 mg/kg/日で用量に比例して増加し、0.5～3 mg/kg/日ではわずかに用量比を上回って増加した。Setmelanotide の R_{ac}（妊娠 13 日の $AUC_{0-\tau}$／妊娠 7 日の $AUC_{0-\tau}$）は 0.714（3 mg/kg/日）～1.27（20 mg/kg/日）であったことから、反復投与によりほとんど蓄積しなかったことが示された。

妊娠 13～19 日に投与した動物では、妊娠 13 日の $AUC_{0-\tau}$ の平均値は 0.05～10 mg/kg/日で用量比を上回って増加し、10～20 mg/kg/日で用量比を下回って増加した。妊娠 19 日の $AUC_{0-\tau}$ の平均

値は 0.05～0.5 mg/kg/日及び 10～20 mg/kg/日で用量に比例して増加し、0.5～10 mg/kg/日でわずかに用量比を上回って増加した。Setmelanotide の R_{ac}（妊娠 19 日の $AUC_{0-\tau}$／妊娠 13 日の $AUC_{0-\tau}$）は 0.564（3 mg/kg/日）～0.877（0.05 mg/kg/日）であったことから、反復投与により蓄積しないことが示された。

2.6.4.3.2.1.2 胚・胎児発生に関する試験

RM-493-TOX-031 試験（4.2.3.5.2-2）

妊娠中の NZW ウサギにおける setmelanotide/mPEG-DSPE による毒性及び着床から硬口蓋閉鎖までの胚胎児・発生に対する影響を評価した。被験物質（setmelanotide/mPEG-DSPE [1:10]）及び対照物質（setmelanotide/mPEG-DSPE [1:10]のプラセボ）を、反復皮下投与した。媒体対照群は妊娠 7～19 日、0.05 及び 0.2 mg/kg/日群は妊娠 7～13 日、0.05、0.1 及び 0.2 mg/kg/日群は妊娠 13～19 日に投与した。

Setmelanotide の曝露量は、おおむね用量に比例して増加した。妊娠 7 日及び 13 日において、血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は 0.05～0.2 mg/kg/日への用量増加に伴って増加した。全体的に、各用量（0.05 及び 0.2 mg/kg/日）で、ピークの血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は妊娠 7 日及び 13 日で同程度であった。t_{max} は 1～2 時間であった。妊娠 13 日の $t_{1/2}$ は 0.2 mg/kg/日でのみで算出可能であり、1.77 時間であった。R_{ac} は 0.983（0.2 mg/kg/日）～1.44（0.05 mg/kg/日）であり、最低用量群（0.05 mg/kg/日）ではある程度蓄積し、最高用量群（0.2 mg/kg/日）では蓄積しないことが示された。

妊娠 13 日及び 19 日目の血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は、0.05～0.2 mg/kg/日への setmelanotide の用量増加に伴って増加した。妊娠 19 日の C_{max} は妊娠 13 日と比較してやや低値を示した。0.1 及び 0.2 mg/kg/日では、同一用量で C_{max} は妊娠 13 日及び 19 日で同程度であった。t_{max} は 1～2 時間であった。$t_{1/2}$ は 0.1 mg/kg/日でのみ算出可能であり、妊娠 13 日では 1.02 時間、妊娠 19 日では 1.12 時間であった。Setmelanotide の R_{ac} は 0.743（0.2 mg/kg/日）～0.926（0.05 mg/kg/日）であり、反復投与により蓄積しないことが示された。

Setmelanotide に対する ADA 陽性の血清試料は認められなかった。

2.6.4.3.3 サルを用いた吸収試験

2.6.4.3.3.1 単回投与試験

2 試験（BIM-22493-018 試験［4.2.2.7-2］及び RM-493-PK-002 試験［4.2.2.7-3］）では肥満アカゲザルを用いた（2.6.4.8.3.1 項及び 2.6.4.8.3.2 項）。それ以外のサルの試験では全てカニクイザルを用いた。

2.6.4.3.3.1.1 カニクイザルを用いた単回皮下投与 PK 試験

RM-493-PK-006 試験（4.2.2.2-3）

雄性カニクイザルに setmelanotide/mPEG-DSPE を投与したときの PK を予備的に評価した。Setmelanotide/mPEG-DSPE（薬液濃度 10 mg/mL）を 0.5、1.0、5.0 又は 10 mg/kg 及び

setmelanotide/mPEG-DSPE（1:1）（薬液濃度 10 mg/mL）を 5.0 mg/kg で単回皮下投与した。

Setmelanotide/mPEG-DSPE を投与したときの setmelanotide の C_{max}、AUC_{last} 及び AUC_{∞}は、0.5～10 mg/kg で用量に比例して増加した。t_{max} は 8 時間（0.5 mg/kg）～11.33 時間（5 及び 10 mg/kg）の範囲であった。全体的に、$t_{1/2}$、CL/F 及び V_z/F の平均値は群間で類似していた。$t_{1/2}$ の平均値は 4.83 時間（10 mg/kg）～5.30 時間（5 mg/kg）、CL/F の平均値は 0.076 L/hr/kg（10 mg/kg）～0.107 L/hr/kg（1 mg/kg）、V_z/F の平均値は 0.532 L/kg（10 mg/kg）～0.781 L/kg（1 mg/kg）であった。Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:1）を 5 mg/kg で投与したときの C_{max}（3,220 ng/mL）は、setmelanotide/mPEG-DSPE を 5 mg/kg で投与したときの C_{max}（2,650 ng/mL）よりも 22%高く、より早く C_{max} に到達した。しかし、AUC に基づく吸収量には顕著な差はみられなかった。

2.6.4.3.3.1.2 カニクイザルを用いた保存料添加及び非添加製剤のクロスオーバー薬物動態試験

RM-493-PK-007 試験（4.2.2.2-4）

開発初期において、臨床用の setmelanotide/mPEG-DSPE は単回投与用バイアルを用いたが、開発が進むにつれて複数回使用バイアルが開発された。そこで、本クロスオーバー単回投与試験において、カニクイザルを用いて現在使用されている臨床用製剤と同じ組成の製剤で保存料を添加又は非添加製剤を用いて setmelanotide を 5 mg/kg で皮下投与したときの PK を比較した。保存料添加製剤は、保存料非添加製剤と共に重要な臨床試験で使用された。各投与期で同一の動物を使用し、各投与期の間には少なくとも 7 日間の休薬期間を設定した。

保存料添加製剤投与時の setmelanotide の t_{max} の中央値は 8 時間であり、保存料非添加製剤投与時も同様に 8 時間であった。保存料添加製剤投与時の setmelanotide の $t_{1/2}$ の平均値は 4.59 時間であり、非添加製剤投与時は 4.97 時間であった。C_{max} は保存料添加製剤で 3,350 ng/mL、非添加製剤で 2,990 ng/mL であった。CL/F は、保存料添加製剤で 98.4 mL/hr/kg、保存料非添加製剤で 104 mL/hr/kg であった。これらの PK パラメーター及び各パラメーターの誤差に基づくと、保存料添加製剤と非添加製剤の間には違いはみられなかった。C_{max} の両側 t 検定では、保存料添加製剤と非添加製剤の平均値には有意な差はないことが示された（p 値>0.05）。これらのデータから、保存料は setmelanotide の PK に影響を及ぼさないことが示唆された。

2.6.4.3.3.2 反復投与試験

2.6.4.3.3.2.1 カニクイザルを用いた 28 日間皮下投与用量設定試験

RM-493-TOX-027 試験（4.2.3.2-4）

カニクイザルを用いた 39 週間皮下投与毒性試験の setmelanotide の用量選択のためのデータを取得するために、カニクイザルに setmelanotide/mPEG-DSPE を 28 日間反復皮下投与による影響を予備的に評価した。Setmelanotide/mPEG-DSPE の用量は 0、0.2、0.75 及び 2 mg/kg/日、setmelanotide/生理食塩液は 2 mg/kg/日とした。

Setmelanotide/mPEG-DSPE を 0.2、0.75 及び 2 mg/kg/日で投与したとき、Day 1 及び Day 28 に

おける血漿中 setmelanotide 濃度は用量増加に伴って増加した。C_{max} は Day 1 ではわずかに用量比を下回って増加し、Day 28 では用量に比例して増加した。$AUC_{0-\tau}$ 及び AUC_{last} は Day 1 及び Day 28 でおおむね用量に比例して増加した。

Day 1 において、setmelanotide/mPEG-DSPE を 2 mg/kg/日で投与したときの吸収は、setmelanotide/生理食塩液を 2 mg/kg/日で投与したときと比較して遅かった。Day 1 において、setmelanotide/生理食塩液を 2 mg/kg/日で投与したときの setmelanotide の C_{max} の平均値は、setmelanotide/mPEG-DSPE を 2 mg/kg/日で投与したときの 4.15 倍であった。Day 28 においても、setmelanotide/生理食塩液を投与したときの setmelanotide の C_{max} の平均値は、setmelanotide/mPEG-DSPE を投与したときの 3.7 倍であった。Setmelanotide 濃度の平均値は Day 1 と Day 28 で同程度であった。Setmelanotide/mPEG-DSPE を 2 mg/kg/日で投与したときと比較して、setmelanotide/生理食塩液を 2 mg/kg/日で投与したときの C_{max} は非常に高く、より早く到達したものの、全身曝露量（$AUC_{0-\tau}$）は、mPEG-DSPE による投与と生理食塩液による投与でおおむね同程度であった。このことから、setmelanotide/mPEG-DSPE は、さらなる開発に適していると判断した。

なお、曝露量に関するパラメーターに顕著な性差はみられなかった。

Setmelanotide に対する ADA 陽性の血清試料は認められなかった。

本試験の結果から、カニクイザルの反復投与毒性試験のために選択した用量が裏付けられた。

2.6.4.3.3.2.2 カニクイザルを用いた 39 週間皮下投与毒性試験及び 4 週間回復性試験

RM-493-TOX-024 試験（4.2.3.2-5）

カニクイザルに setmelanotide を 39 週間 1 日 1 回反復皮下投与したときの毒性を評価し、観察された所見の可逆性を検討した。試験期間中に用量を減量したため、初期の用量／減量した用量として示す。未希釈の setmelanotide/mPEG-DSPE 又は setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）（Day 53/54 より投与開始）を 0、0.5/0.25、1.5/0.5 及び 3/1 mg/kg/日、並びに setmelanotide/生理食塩液を 0 及び 3 mg/kg（Day 53/54 投与開始）で投与した。用量を減量（例：0.5 から 0.25 mg/kg/日）したのは、投与媒体（mPEG-DSPE）に起因する投与部位の皮膚肥厚により、複数の動物で投与が困難になったためである。未希釈の mPEG-DSPE による皮膚肥厚のため、Day 53/54 以降、mPEG-DSPE を 5%マンニトールで 1:10 に希釈し、それに応じて投与容量を増量し、生理食塩液対照群及び setmelanotide/生理食塩液群を除いた全群で用量を減量した。

Day 1 において、setmelanotide/mPEG-DSPE を 0.5、1.5 及び 3 mg/kg/日で皮下投与したとき、C_{max} 及び AUC_{last} の平均値は、用量にかかわらず雌雄間で同程度であった。C_{max}、AUC_{last} 及び $AUC_{0-\tau}$ は、雌雄共におおむね用量に比例して増加した。減量した用量（0.25、0.5 及び 1 mg/kg/日）で反復投与したとき、Week 26 及び Week 39 の C_{max} 及び AUC_{last} の平均値は、Week 13 と比較して高値を示し、Week 26 及び Week 39 の C_{max} 及び AUC_{last} の平均値は雌雄で同程度であった。Week 13、Week 26 及び Week 39 の C_{max}、AUC_{last} 及び $AUC_{0-\tau}$ は、0.25～0.5 mg/kg/日ではおおむね用量比を下回って増加したが、0.5～1 mg/kg/日で、雌では C_{max}、AUC_{last} 及び $AUC_{0-\tau}$ は用量比を上回って増加したが、雄では用量に比例して増加した。CL_{ss}/F、V_z/F 及び $t_{1/2}$ の平均値は

変動がみられ、CL_{ss}/F は 0.0842～0.216 L/hr/kg、V_z/F は 0.563～1.19 L/kg、$t_{1/2}$ は 2.49～17.6 時間であった。R_{ac} の平均値は 0.825～3.81 であり、カニクイザルにおいて評価した用量範囲では顕著な蓄積はないか、わずかな蓄積が示唆された。

血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は、全体的に setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したときの方が、setmelanotide/mPEG-DSPE を 3 mg/kg/日と比較して高値を示した。単回投与及び 1 日 1 回反復投与したときの Day 1 の血漿中 setmelanotide 濃度の平均値は、おおむね同程度であった。Setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で反復投与したとき、雌の血漿中濃度の平均値は雄と比較してわずかに高値を示した。

Day 1 において setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したときの t_{max} の中央値は、setmelanotide/mPEG-DSPE を 3 mg/kg/日で投与したときと比較して 7.50～9.50 時間早かった。Setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したとき、t_{max} の中央値は雌雄共に 0.5 時間であり、setmelanotide/mPEG-DSPE を 3 mg/kg/日で投与したときの t_{max} は 8～10 時間であった。Day 1 において setmelanotide/生理食塩液を 3 mg/kg/日で投与したときの C_{max} の平均値は、setmelanotide/mPEG-DSPE を 3 mg/kg/日で投与したときの C_{max} の 3.5～3.75 倍であった。Day 1 における AUC_{last} は両群で同程度であった。

Setmelanotide に対する ADA 陽性の血清試料は認められなかった。

2.6.4.3.4 マウスにおける試験

マウスにおける単回投与試験は実施しなかった。

2.6.4.3.4.1 反復投与試験

2.6.4.3.4.1.1 野生型 rasH2-Wt マウスの 28 日間皮下投与用量設定試験

RM-493-TOX-041 試験（4.2.3.4.2-2）

野生型 rasH2-Wt マウスに setmelanotide を 28 日間 1 日 1 回反復皮下投与したときの毒性及び setmelanotide の曝露量（TK）を評価した。薬液濃度 1 mg/mL に調製した setmelanotide/mPEG-DSPE を 10 mg/kg/日（投与容量 10 mL/kg）、薬液濃度 2 mg/mL で 10 mg/kg/日（投与容量 5 mL/kg）及び薬液濃度 4 mg/mL で 20 mg/kg/日（投与容量 5 mL/kg）で肩甲部及び背胸部に 1 日 1 回反復皮下投与した。

<u>Day 1 における setmelanotide/mPEG-DSPE</u>

Day 1 において、薬液濃度 1 及び 2 mg/mL の setmelanotide/mPEG-DSPE を 10 mg/kg/日で setmelanotide を投与したとき、血漿中 setmelanotide 濃度は雌雄で同程度であった。血漿中 setmelanotide 濃度は、10～20 mg/kg/日で用量増加に伴って増加した。t_{max} は 1～3 時間であった。10～20 mg/kg/日で C_{max} は用量比をやや下回って増加し、$AUC_{0-\tau}$ は用量比を上回って増加した。

雄の C_{max} は 10 mg/kg/日（1 mg/mL）で 2,900 ng/mL、10 mg/kg/日（2 mg/mL）で 2,550 ng/mL 及び 20 mg/kg/日で 3,820 ng/mL であった。雌の C_{max} は各用量でそれぞれ 2,360、2,570 及び 3,620 ng/mL であった。雄の $AUC_{0-\tau}$ は、10 mg/kg/日（1 mg/mL）で 10,700 ng*hr/mL、10 mg/kg/日

（2 mg/mL）で 9,020 ng*hr/mL 及び 20 mg/kg/日で 20,500 ng*hr/mL であった。雌の $AUC_{0-\tau}$ は各用量で、それぞれ 6,710、7,560 及び 16,000 ng*hr/mL であった。

定常状態における setmelanotide/mPEG-DSPE

Day 28 において、薬液濃度 1 及び 2 mg/mL の setmelanotide/mPEG-DSPE を 10 mg/kg/日で setmelanotide を投与したとき、血漿中 setmelanotide 濃度は雌雄で同程度であった。1 日 1 回反復投与したときの血漿中 setmelanotide 濃度は、単回投与時とおおむね同程度であった。t_{max} は 1～2 時間であった。10～20 mg/kg で C_{max} は用量比をやや下回って増加し、$AUC_{0-\tau}$ は用量に比例して増加した。$t_{1/2}$ は 0.883～2.23 時間であった。

雄の C_{max} は 10 mg/kg/日（1 mg/mL）で 3,570 ng/mL、10 mg/kg/日（2 mg/mL）で 3,140 ng/mL 及び 20 mg/kg/日で 4,520 ng/mL であった。雌の C_{max} は各用量でそれぞれ 2,430、3,140 及び 3,250 ng/mL であった。雄の $AUC_{0-\tau}$ は 10 mg/kg/日（1 mg/mL）で 11,800 ng*hr/mL、10 mg/kg/日（2 mg/mL）で 10,400 ng*hr/mL 及び 20 mg/kg/日で 24,300 ng*hr/mL であった。雌の $AUC_{0-\tau}$ は各用量でそれぞれ 9,030、8,850 及び 15,600 ng*hr/mL であった。

CL_{ss}/F は、雌の方が雄よりやや高値を示したが、処方及び用量にかかわらず類似していた。V_z/F は処方間で変動がみられた。R_{ac} は 0.977～1.35 で、28 日間の反復投与によりほとんど又は全く蓄積しなかった。

雌雄を合算した結果

薬液濃度 1 及び 2 mg/mL の setmelanotide/mPEG-DSPE を 10 mg/kg/日で投与したとき、血漿中 setmelanotide 濃度は同程度であった。1 日 1 回反復投与したときの Day 28 の血漿中 setmelanotide 濃度は、おおむね単回投与時と同程度又はわずかに高値を示した。10～20 mg/kg/日で血漿中 setmelanotide 濃度は用量増加に伴って増加した。

Day 1 及び Day 28 において、10～20 mg/kg/日で C_{max} は用量比を下回って増加した。10～20 mg/kg/日で $AUC_{0-\tau}$ は用量に比例して増加した。CL_{ss}/F は群間で類似していたが、V_z/F は群間で変動がみられた。R_{ac} は 1.10～1.19 で、反復投与によりほとんど又は全く蓄積しないことが示された。

全体的に本試験で mPEG-DSPE により setmelanotide を無毒性量である 20 mg/kg/日で投与したときの曝露量（2.6.6）は、rasH2-Tg マウスにおける長期投与試験での setmelanotide の投与を裏付けるものであった。

2.6.4.3.4.1.2 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（１）

RM-493-TOX-042 試験（4.2.3.4.2-3）

rasH2-Tg マウスに setmelanotide を 6 ヵ月間反復皮下投与したときの毒性及びがん原性を評価し、併せて血漿中 setmelanotide 濃度も測定した。生理食塩液対照、mPEG-DSPE 対照並びに setmelanotide/mPEG-DSPE を 1、3 及び 10 mg/kg/日で、肩甲部及び背胸部に少なくとも 26 週間 1 日 1 回反復皮下投与した。また、陽性対照として既知の化学発がん物質である N-ニトロソメチル尿素（NMU）を腹腔内投与し、既知の発がん物質に対する本動物モデルの感受性を確認し

た。

全ての投与群で雌雄各 3 例のマウスから、Day 1 及び Day 182 の投与前及び投与後 1 時間に setmelanotide 濃度測定用の血漿試料を採取し、血漿中 setmelanotide の曝露量を評価した。なお、0 mg/kg/日の生理食塩液対照群及び mPEG-DSPE 対照群の血漿中 setmelanotide 濃度は、全時点で BLQ であった。

Day 1 における setmelanotide/mPEG-DSPE

全ての投与群において、setmelanotide 濃度は、雌雄共に Day 1 の投与後 1 時間で定量可能であった。Setmelanotide を 1 mg/kg/日で投与したとき、血漿中 setmelanotide 濃度は雌の方が雄と比較して低値を示した。Setmelanotide を 3 及び 10 mg/kg/日で投与したとき、血漿中 setmelanotide 濃度は雌雄で同程度であった。血漿中 setmelanotide 濃度は 1～10 mg/kg/日で用量増加に伴って増加した。Setmelanotide 濃度の平均値は雌で 407 ng/mL（1 mg/kg）～2,210 ng/mL（10 mg/kg）、雄で 548 ng/mL（1 mg/kg）～2,190 ng/mL（10 mg/kg）であった。

Day 182 における setmelanotide/mPEG-DSPE

Setmelanotide/mPEG-DSPE を 1、3 及び 10 mg/kg/日で投与したとき、血漿中 setmelanotide 濃度は、雌の方が雄と比較して低値を示した。Setmelanotide 濃度の平均値は雌で 375 ng/mL（1 mg/kg）～1,660 ng/mL（10 mg/kg）、雄で 480 ng/mL（1 mg/kg）～2,140 ng/mL（10 mg/kg）であった。

Day 182 の血漿中 setmelanotide 濃度は、概して Day 1 と比較してわずかに低値を示したが、濃度の差は 1 標準偏差以内であった。これらの結果から setmelanotide を 1、3 又は 10 mg/kg/日で投与した動物は setmelanotide に曝露されることが示された。

44 例の動物から投与前試料及び Day 183 の試料の合計 88 試料を採取し、setmelanotide に対する ADA を評価した。対照群では各性別から 2 例の動物、setmelanotide 投与群では各性別から 6 例の動物で評価した。

Day 183 の試料のうち 5 試料はスクリーニングアッセイで陽性と判定され、さらに確認アッセイで分析した。確認アッセイの結果、3 試料は陰性と判定された。スクリーニングアッセイで陽性と判定された試料のうち、動物番号 2040 及び 3545 の試料で setmelanotide に対する抗体が陽性と判定された。これらの動物における阻害率はそれぞれ 14.2%及び 20.6%であった。これら 2 試料のうち 1 試料は、setmelanotide を投与していない投与媒体対照群の動物（動物番号 2040）から採取したものであった。確認アッセイのカットポイントは 11.1%であったことから、この試料は偽陽性と判定した。また、setmelanotide を 1 mg/kg/日で投与した動物番号 3545 の雌マウスの結果も偽陽性の可能性がある。TK と ADA 解析には別々の動物が使用されたため、ADA の存在と TK への影響の有無の関連性を評価することはできないが、1 mg/kg/日の投与群の Day 182 の血漿中 setmelanotide 濃度は Day 1 よりわずかに低く、それぞれ 428 及び 478 ng/mL であった。

2.6.4.3.4.1.3 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（２）

RM-493-TOX-044 試験（4.2.3.4.2-4）

rasH2-Tg マウスに setmelanotide を 6 ヵ月間反復皮下投与したときの毒性及びがん原性を評価し、併せて血漿中 setmelanotide 濃度も測定した。生理食塩液対照、mPEG-DSPE 対照並びに setmelanotide/mPEG-DSPE を 1、3 及び 10 mg/kg/日で、肩甲部及び背胸部に少なくとも 26 週間 1 日 1 回反復皮下投与した。また、陽性対照として NMU を 75 mg/kg/日で腹腔内投与し、既知の化学発がん物質に対する本動物モデルの感受性を確認した。

全ての投与群で雌雄各 3 例のマウスから、剖検日である Day 182 の投与後 1 時間及び 24 時間に setmelanotide 濃度測定用の血漿試料を採取し、血漿中 setmelanotide の曝露量を評価した。なお、Day 182 の投与後 1 時間及び 24 時間における生理食塩液対照群及び mPEG-DSPE 対照群の血漿中 setmelanotide 濃度は BLQ（5.00 ng/mL 未満）であった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE の 1、3 及び 10 mg/kg/日群では、投与後 1 時間の全ての試料で setmelanotide は定量可能であったが、投与後 24 時間では全て BLQ であった。投与後 1 時間における血漿中濃度は用量増加に伴って増加した。1～3 mg/kg/日で血漿中濃度は用量に比例して増加し、3～10 mg/kg/日では用量比を下回って増加したが、血漿中濃度には変動がみられた。全ての用量で、投与後 1 時間の血漿中濃度は雄と比較して雌の方がわずかに低値を示したが、各測定時点で動物の例数は 3 例と少なかったため、明確な結論は得られなかった。rasH2-Tg マウスにおける Day 182 の setmelanotide の曝露量はおおむね用量増加に伴って増加し、生理食塩液及び mPEG-DSPE 対照群では setmelanotide に曝露していないことが示された。

44 例の動物から Day 183 の試料を採取し、setmelanotide に対する ADA を評価した。各対照群では各性別から 2 例の動物、setmelanotide 投与群ではで各性別から 6 例の動物で評価した。スクリーニングアッセイで 3 試料が陽性と判定され、さらに確認アッセイで分析した。確認アッセイの結果、3 試料は全て陰性と判定された。

2.6.4.3.4.1.4 rasH2-Tg マウスの 6 ヵ月間皮下投与がん原性試験（３）

RM-493-TOX-045 試験（4.2.3.4.2-5）

rasH2-Tg マウスに setmelanotide を 6 ヵ月間反復皮下投与したときの毒性及びがん原性を評価し、併せて血漿中 setmelanotide 濃度も測定した。生理食塩液対照、mPEG-DSPE 対照並びに setmelanotide/mPEG-DSPE を 1、3 及び 10 mg/kg/日で、肩甲部及び背胸部に少なくとも 26 週間 1 日 1 回反復皮下投与した。また、陽性対照として NMU を 75 mg/kg/日で腹腔内投与し、既知の化学発がん物質に対する本動物モデルの感受性を確認した。

全ての投与群で雌雄各 3 例のマウスから、剖検日である Day 182 の投与後 1 時間及び 24 時間に setmelanotide 濃度測定用の血漿試料を採取し、血漿中 setmelanotide の曝露量を評価した。なお、Day 182 の投与後 1 時間及び 24 時間における生理食塩液対照群及び mPEG-DSPE 対照群の血漿中 setmelanotide 濃度は BLQ（5.00 ng/mL 未満）であった。

Setmelanotide/mPEG-DSPE の 1、3 及び 10 mg/kg/日群では、投与後 1 時間の全ての試料で setmelanotide は定量可能であったが、投与後 24 時間では全て BLQ であった。投与後 1 時間における血漿中濃度は用量の増加に伴って増加した。雄では 1～3 mg/kg/日で血漿中濃度はおおむね用量に比例して増加し、3～10 mg/kg/日では用量比を下回って増加したが、血漿中濃度には変動がみられた。雌では、1～10 mg/kg/日でおおむね用量に比例して増加した。10 mg/kg/日では、投

与後 1 時間の血漿中濃度は雄と比較して雌の方がわずかに高値を示したが、各測定時点で動物の例数は 3 例と少なかったため、明確な結論は得られなかった。rasH2-Tg マウスにおける Day 182 の setmelanotide の曝露量はおおむね用量増加に伴って増加し、生理食塩液対照群及び mPEG-DSPE 対照群では setmelanotide に曝露していないことが示された。

44 例の動物から Day 183 の試料を採取し、setmelanotide に対する ADA を評価した。スクリーニングアッセイで 43 例は陰性と判定された。陽性の可能性のある 1 例は確認アッセイの結果、陰性と判定された。

本試験に先行して実施した RM-493-TOX-041 試験（4.2.3.4.2-2）で setmelanotide を 10 mg/kg/日で投与したときの Day 28 の TK データに基づき、雌雄を合算した C_{max} 及び AUC は、最大臨床用量である 3 mg/日におけるヒトでの曝露量のそれぞれ 81 倍及び 17 倍であった。さらに、setmelanotide/mPEG-DSPE の無毒性量から、ヒトにおける mPEG-DSPE の投与量 30 mg（setmelanotide の用量 3 mg における mPEG-DSPE の投与量）に対し、mg/kg/日換算で約 200 倍（mg/m^2/日換算ではヒト臨床用量の 16 倍）のマージンを示した。

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 In vitro 組織分布試験

2.6.4.4.1.1 ヒト血漿タンパク結合試験

T0106 試験（4.2.2.3-1）

Setmelanotide のヒト血漿タンパク質に対する結合率を評価した。ヒト血漿中で 1、10 及び 100 µmol/L の setmelanotide を 37℃で 30 分間インキュベートした。Centrifree®限外ろ過装置を使用した限外ろ過によりタンパク結合画分及び非結合画分に分離し、setmelanotide の濃度を LC-MS/MS により測定した。

Setmelanotide のヒト血漿タンパク質に対する結合率は、1、10 及び 100 µmol/L でそれぞれ 46%、47%及び 53%であった。

2.6.4.4.1.2 ヒト、ラット、マウス及びサル血漿タンパク結合試験

[redacted]RHYTP4R1 試験（4.2.2.3-2）

Setmelanotide の開発後期に、平衡透析によりヒト及び他の動物種の血漿タンパク質に対する結合率を確定する試験を実施し、タンパク結合率を動物種間で比較した。本試験では、平衡透析により setmelanotide のヒト、ラット、マウス及びサル血漿タンパク質に対する結合率を評価した。K_2EDTA で採取した男女のヒト血漿、雄性 SD ラット血漿、雄性 CD-1 マウス血漿及び雄性カニクイザル血漿を [redacted] Inc.から入手して用いた。本試験では Pierce Rapid Equilibrium Dialysis 装置を使用した。被験物質及び対照物質の保存溶液をジメチルスルホキシド（DMSO）で調製した。被験物質は最終濃度 5 µmol/L、共添加する対照物質であるワルファリンは 10 µmol/L になるように、DMSO 保存溶液を 1.0 mL の血漿に添加した。被験物質及び対照物質を添加した血漿（300 µL）を 96 ウェル透析プレートの 2 つのウェルに添加した。対応する緩衝液側のウェルには、500 µL のリン酸緩衝生理食塩液（PBS）を添加した。透析プレートは 37℃

に温められた密閉された恒温装置中で、4 時間インキュベートした。4 時間のインキュベーション後、血漿側及び PBS 側の両側から試料を採取した。

各ウェルから試料（血漿側から 50 µL、PBS 側から 200 µL）を新たな 96 ウェルプレートに分注した。分注した PBS 側のウェルには血漿（50 µL）を添加し、血漿側のウェルには 200 µL の PBS を添加した。さらに各ウェルに 2 倍量のアセトニトリルを添加し、混合後、3,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を分取し、水で 1:1 に希釈し LC-MS/MS で分析した。

タンパク結合率は以下の式に従って算出した。

結合率（%）＝［（血漿側の PARR – PBS 側の PARR）/血漿側の PARR］ × 100
PARR＝ 希釈倍率で補正した内部標準に対するピーク面積比

Setmelanotide のヒト、ラット、マウス及びサル（各 2 例）血漿タンパク質に対する結合率は、それぞれ 79.1%、82.1%、82.4%及び 78.3%であった。対照物質であるワルファリンのヒト、ラット、マウス及びサル（各 2 例）のタンパク結合率は、それぞれ 99.0%、97.8%、91.4%及び 99.3%であり、全ての動物種でワルファリンのタンパク結合率は受け入れ判定基準を満たした。

本試験では、対照物質を使用した最新の手法によりタンパク結合率を評価し、動物種間で比較したため、本試験の結果は確定的なタンパク結合の結果と考えられる。

2.6.4.4.1.3 ラット及びウサギ血漿タンパク結合試験

[redacted]RHYTP5 試験（4.2.2.3-3）

平衡透析により setmelanotide のラット及びウサギ血漿タンパク質に対する結合率を評価した。本試験では雄性 SD ラット血漿及び雄性 NZW ウサギ血漿を用いた。それ以外の評価方法は、[redacted]RHYTP4R1 試験（4.2.2.3-2）と同じである。[redacted]RHYTP4R1 試験（4.2.2.3-2）との直接比較のためにラット血漿を含めた。

Setmelanotide のラット及びウサギ（各 2 例）の血漿タンパク質に対する結合率は、それぞれ 80.6%及び 76.3%であった。対照物質であるワルファリンのラット及びウサギ（各 2 例）のタンパク結合率は、それぞれ 99.3%及び 96.1%であった。いずれの動物種でワルファリンのタンパク結合率は受け入れ判定基準を満たした。ラットの結合率は [redacted]RHYTP4R1 試験（4.2.2.3-2）の結果と同程度であった。[redacted]RHYTP4R1 試験（4.2.2.3-2）との直接比較のためラット血漿の結合率が含まれていたので、ウサギのタンパク結合率は他の評価した動物種と類似していることが示唆された。

2.6.4.4.2 In vivo 組織分布試験

2.6.4.4.2.1 ラットの定量的全身オートラジオグラフィー試験

RM-493-PK-008 試験（4.2.2.2-1）

雌雄 SD ラット並びに雄性 Long-Evans（LE）ラットに[^{14}C]-setmelanotide を単回皮下投与したときの[^{14}C]-setmelanotide 由来の放射能の組織分布及び組織中 PK を、QWBA により評価した。

SD ラット 7 例で構成される雌雄各 1 群及び雄性 LE ラット 9 例で構成される 1 群に、[^{14}C]-setmelanotide を 2 mg/kg（目標投与放射能は 100 μCi/kg）で単回皮下投与した。投与後の各評価時点に、雌雄各 1 例の SD ラット及び 1 例の LE ラットをイソフルラン吸入によって麻酔し、心臓穿刺により血液試料を採取した。血液採取後、動物を CO_2 吸入により安楽死させ、QWBA 分析のためにドライアイス／ヘキサン中で屍体を凍結した。

雌雄 SD ラットに 2 mg/kg で単回皮下投与後、[^{14}C]-setmelanotide 及び／又はその代謝物は広範に分布し、QWBA によって検出された。血漿中濃度は、PK 評価パート（2.6.4.3.1.1.1 項）で得られた結果と類似していた。全血中 C_{max} 及び AUC_{last} は、血漿中 C_{max} 及び AUC_{last} よりわずかに低値を示した。AUC_{last} から算出した血液／血漿比は、SD ラットの雄で 0.89 及び雌で 0.81 であった。

[^{14}C]-Setmelanotide 由来の放射能の C_{max} 及び AUC_{last} は腎臓（全ての部位）で最も高く、雄の腎皮質ではそれぞれ 10,600 ng 等量/g 及び 621,000 ng*hr 等量/g であった。腎臓に次いで、雌雄の肝臓及び肺、並びに雌の子宮及び卵巣で血漿及び全血中濃度と同程度の比較的高濃度の曝露がみられた。放射能濃度が最も低値を示したのは脳及び眼であった（100 ng 等量/g 未満）。それ以外の組織中濃度はおおむね 1,000 ng 等量/g 未満であった。t_{max} は投与後 0.5～1 時間の組織が最も多かったが、腎臓（全腎臓及び腎皮質）の t_{max} は投与後 8 時間であった。AUC_{last} に基づいて算出した雄の腎臓の組織／血漿比は 37 であり、[^{14}C]-setmelanotide 及び／又はその代謝物が腎臓に高濃度で存在することが確認された。他の全ての組織／血漿比から、他の組織への分布は限定的であることが示された。

雄性 LE ラットに 2 mg/kg で単回皮下投与したとき、投与後 168 時間にわたって、血漿又は全血中濃度は SD ラットと比較して、著しい差異はないことが示された。曝露量（AUC_{last}）の違いは、LE ラットにおける試料採取期間が長かったことに起因している可能性がある。有色（LE ラット）又は白色（SD ラット）皮膚への分布に差異はみられなかった。[^{14}C]-Setmelanotide 由来の放射能は、投与後 504 時間まで眼（レンズ）及び脈絡叢で検出された。

2.6.4.4.2.2 [^{14}C]-mPEG-DSPE を単回及び反復皮下投与時の PK、マスバランス及び組織分布試験

RM-493-PK-013 試験（4.2.2.3-4）

ラットに[^{14}C]-mPEG-DSPE を単回又は反復皮下投与したときの PK、マスバランス及び組織分布を評価した。具体的には以下の評価を行った。

- ラットに単回皮下投与したときの液体シンチレーション計数法による[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来放射能の血漿中 PK の評価
- ラットに単回皮下投与したときの[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来放射能の排泄経路及びマスバランスの評価
- ラットに単回皮下投与又は 1 日 1 回 7 日間反復皮下投与したときの QWBA 又は剖検による[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来放射能の組織分布の評価

雌雄ラット（各時点 3 例）に[^{14}C]-mPEG-DSPE を 20 mg/kg（100 μCi/kg）で単回皮下投与した

とき、血漿中で[^{14}C]-mPEG-DSPE への曝露が確認された。投与後 8 時間に血漿中 C_{max} に到達し、雄で 33.3 µg 等量/g、雌で 30.1 µg 等量/g であった。AUC_{last} は雄で 544 µg 等量*hr/g、雌で 508 µg 等量*hr/g であった。[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来の放射能は、雄では投与後 144 時間まで、雌では投与後 168 時間まで血漿中で定量可能であった。$t_{1/2}$ は雄で 43.2 時間、雌で 30.1 時間であった（R^2 は 0.97 以上）。

排泄に関するデータ（雌雄ラット各 3 例）に基づくと、20 mg/kg で単回皮下投与したとき、雌雄ラットから投与量の 95～97%が尿、糞及びケージ洗浄液中に排泄された。投与量の 73～75%が尿中（ケージ洗浄液を含む）に排泄され、残り（23%）は糞中に排泄された。

雌雄ラットに[^{14}C]-mPEG-DSPE を 20 mg/kg/日で単回皮下投与（雌雄各 3 例）又は 1 日 1 回 7 日間反復皮下投与（雌雄各 12 例）後 24 時間に全血、血漿及び組織中濃度を測定した。組織分布評価パートにおける血漿中濃度の平均値は、PK 評価パートの結果と類似しており、単回又は反復投与後 24 時間で、雌雄で 6.23～6.85 µg 等量/g であった。

[^{14}C]-mPEG-DSPE を単回皮下投与後 24 時間において、組織中の[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来の放射能濃度の平均値は投与部位で最も高く、117 µg 等量/g であった。次に高い[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来の放射能濃度は、消化管内容物、副腎、脾臓、腎臓及び肝臓でみられた（おおむね 8～24 µg 等量/g）。放射能濃度が最も低値を示したのは脳、眼及び脂肪であった（1 µg 等量/g 未満）。雌雄で分布に明らかな違いはみられなかった。雌雄共に 7 回目の皮下投与後 24 時間における組織中の[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来の放射能濃度は、最終投与部位で最も高く 96 µg 等量/g であった。次に高い[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来の放射能濃度は、消化管内容物、副腎、脾臓、腎臓及び肝臓でみられた。雌雄で分布に明らかな差異はみられなかったが、反復投与後の放射能濃度はおおむね単回投与時より高く、甲状腺及び副腎で 3 倍、精巣、脾臓、筋肉、腸間膜リンパ節、脂肪、脳、骨及び前立腺で 2 倍又は 2 倍に近い値であった。反復投与時の全血、血漿、消化管及び消化管内容物中の放射能濃度は、単回投与と比較して大きな差はみられなかった。

7 回目の投与後 2 週間及び 7 週間における血液、血漿及び脈絡叢中の[^{14}C]-mPEG-DSPE 由来の放射能濃度も測定した。7 回目の投与後 2 週間及び 7 週間における脈絡叢中濃度は、雌ラット 1 例を除く全ての動物で BLQ であり、1 例の雌では、前時点を含む他の全ての測定値とは異なり、高濃度を示した。全血及び血漿中濃度はおおむね BLQ であった。いずれの測定時点でも屍体から検出された放射能濃度は 1 µg 等量/g 未満であった。

7 回目の投与後 12 週間における全ての組織中放射能濃度を測定し、多くの組織、血液及び血漿中濃度は BLQ であった（7 回目の投与後 12 週間において、平均濃度は 1 µg 等量/g を上回らなかった）。

2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 In vitro 代謝

2.6.4.5.1.1 ヒト肝細胞における代謝安定性

T0059 試験（4.2.2.4-1）

Setmelanotide をヒト凍結肝細胞とインキュベーションしたときの代謝安定性を評価し、代謝物

及び／又は変換生成物を特定した。Setmelanotide 又はテストステロンを最大 120 分間インキュベーションした後、反応を停止し、紫外線（UV）検出による HPLC で分析した。対照物質であるテストステロンの $t_{1/2}$ は 14.1 分であった。

試験条件下（120 分のインキュベーション時間）で、setmelanotide はヒト凍結肝細胞により代謝されなかった（$t_{1/2}$ 120 分超）。Setmelanotide を肝細胞に添加した直後（0 時間）、相対保持時間が 1.1 のピークが検出され、そのピーク面積はインキュベーション中変化しなかった。なお、Setmelanotide は肝細胞との 120 分間のインキュベーションの前後で、細胞毒性を示さなかった。

2.6.4.5.1.2 ヒト肝ミクロソームにおける代謝安定性

T0076 試験（4.2.2.4-2）

HLM による setmelanotide の代謝を評価し、未変化体の $t_{1/2}$ 及び固有クリアランス（CL_{int}）を算出した。トリス緩衝液又はリン酸緩衝液のミクロソーム懸濁液中、37℃で化合物と共に 5 分間インキュベーションした。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）の添加により生化学的反応を開始した。インキュベーション中、所定の時間（0、10、20 及び 40 分）に懸濁液を 200 µL のアセトニトリルを含むマイクロタイタープレートに分注し、4℃で 30 分間保存して反応を停止した。

その後、4℃で 20 分間 1,200 rpm で遠心分離を行い、タンパク残渣を除去した。上清は直後に HPLC-UV システムに注入（50 µL）、又は分析まで-80℃で凍結保存した。In vitro での代謝反応条件下で、setmelanotide は HLM によって代謝されなかった。なお、テストステロンの代謝速度は期待された信頼区間の範囲内であった。

2.6.4.5.1.3 ヒト皮膚線維芽細胞における代謝安定性

T0115 試験（4.2.2.4-3）

ヒト皮膚線維芽細胞存在下における setmelanotide の安定性を評価し、代謝物及び／又は変換生成物を特定した。Setmelanotide は、ヒト皮膚線維芽細胞の系統である Hs68 によって代謝されなかった。なお、対照物質であるサブスタンス P は、ヒト皮膚線維芽細胞 Hs68 の存在下で代謝され、$t_{1/2}$ は 213 分、CL_{int} は 27.6 µL/min/10^6 cells だった。

2.6.4.5.1.4 ヒト、ラット及びサルの肝、腎ミクロソーム並びに肝細胞における代謝安定性

[redacted]RHYTP1 試験（4.2.2.4-4）

ヒト、ラット及びサルの肝及び腎ミクロソーム並びに肝細胞による setmelanotide の安定性の評価及び比較した。

肝及び腎ミクロソームに関する試験条件は以下の通りである。男女のヒト肝又は腎ミクロソーム、雄性 SD ラット肝又は腎ミクロソーム及び雄性カニクイザル肝又は腎ミクロソームを調製し、NADPH を除いて、setmelanotide を最終濃度 1 µmol/L となるように反応混合溶液に添加した。被験物質の評価と並行して、対照物質であるテストステロンの反応も評価した。NADPH 非

添加の反応混合溶液を 37°C の振とう水浴中で 3 分間のプレインキュベーション後、NADPH を添加して反応を開始し、37°C の振とう水浴中でインキュベートした。反応開始後 0、10、20、30 及び 60 分に反応溶液の一部（100 µL）を採取し、setmelanotide 及びテストステロン試料を、0.1%ギ酸及び内部標準を含有する氷冷した 50：50 のアセトニトリル／水溶液 400 µL と直ちに混合し、反応を停止した。停止した反応溶液を混合後、タンパク質を沈殿するために遠心分離した。全ての試料は、エレクトロスプレーイオン化法による LC-MS/MS で測定した。各時点における被験物質濃度を 0 時点における被験物質濃度と比較し、各時点における残存率を算出した。$t_{1/2}$ 及び CL_{int} は単相性の減衰を表す指数関数により算出した。

肝細胞を用いた評価では、男女のヒト凍結肝細胞、雄性 SD ラット凍結肝細胞及び雄性カニクイザル凍結肝細胞を供給元の指示に従って解凍及び調製後、Krebs Henseleit 緩衝液（pH 7.4）に懸濁し、反応開始まで氷上で保管した。肝細胞懸濁液を 37°C の振とう水浴中で 3 分間のプレインキュベーション後、肝細胞懸濁液（1.5×10^6 cells/mL）に被験物質を最終濃度 1 µmol/L となるように添加して反応を開始した。反応混合溶液は 37°C の振とう水浴中でインキュベートした。なお、反応混合溶液中の最終的な DMSO 濃度は 0.1%以下であった。肝細胞の活性を確認するため、陽性対照物質であるテストステロン（1 µmol/L）及び 7-ヒドロキシクマリン（7-HC）（100 µmol/L）の反応も並行して評価した。反応開始後 0、15、30、60 及び 120 分に setmelanotide の反応溶液の一部（各時点 1 例）を採取し、テストステロンの反応溶液の一部は 0、5、15、30、60 及び 120 分（各時点 1 例）に、7-HC の反応溶液の一部は 0 及び 15 分（各時点 1 例）に採取した。採取直後、採取した反応溶液に内部標準を含有する氷冷したアセトニトリルを 3 倍量添加することにより反応を停止した。試料を混合後、タンパク質を沈殿させるために遠心分離し、上清の一部を水で希釈した。全ての試料は LC-MS/MS で測定した。なお、被験物質及び対照物質は、検量線を用いずに定量した。各時点における PARR を 0 時点における PARR と比較し、各時点における残存率を算出した。$t_{1/2}$ 及び CL_{int} は単相性の減衰を表す指数関数により算出した。

Setmelanotide はヒト、ラット及びサルの肝及び腎ミクロソーム中で安定であり、全ての動物種で $t_{1/2}$ は 60 分超、CL_{int} 値は 0.0231 mL/min/mg protein 未満であった。同様に、setmelanotide はヒト、ラット及びサルの肝細胞中でも安定であり、$t_{1/2}$ は 120 分超、CL_{int} は 0.00385 mL/min/10^6 cells 未満であった。

2.6.4.5.2 In vivo でのラット代謝プロファイル

2.6.4.5.2.1 [^{14}C]-Setmelanotide の単回投与 ADME 試験

RM-493-PK-008 試験（4.2.2.2-1）

ラジオ HPLC 及び LC-MS/MS による約 30,000 dpm/g 以上の放射能濃度を含むラットの血漿、胆汁、尿及び糞ホモジネート試料中の[^{14}C]-setmelanotide 由来の代謝物プロファイリングを実施し、特徴を明らかにした（尿及び糞ホモジネート試料は投与した放射能を 5%以上含む試料を分析した）。

代謝物の同定のための血液採取には、雌雄各 6 例の SD ラットで構成される投与群に[^{14}C]-

setmelanotide を 2 mg/kg（設定放射能 100 µCi/kg）で単回皮下投与した。投与後約 0.5、2 及び 3 時間に血液試料を採取した。

血漿、尿及び糞試料は、投与群、性別及び試料採取時点ごとにプールし、抽出（血漿及び糞）又は調製（尿）後、ラジオ HPLC 及び LC-MS/MS で分析した。

ラットから採取したプール血漿から酸性アセトニトリル水溶液で 28～76%の放射能を抽出した。試料を濃縮後再懸濁し、再懸濁した試料の放射能の回収率は、抽出試料の 71～95%であり、元の試料の 26～61%の放射能に相当した。ラジオ HPLC による分析の結果、setmelanotide 未変化体の放射能の ROI は測定した放射能の 76～95%であった。全体的な代謝物プロファイルを図 2.6.4-1 に示す。血漿中の主要な代謝物は M19 で、ROI は 3～12%であった。さらに、尿中には存在しなかった 2 種類の代謝物 M16（ROI は 0.4～7%）及び M17（ROI は 0.1～6%）が認められた。主要代謝物である M19 は、setmelanotide の C 末端アミドの加水分解により遊離[redacted]に変換した構造として同定された。

LC-MS/MS による分析では、皮下及び静脈内投与時の setmelanotide 未変化体の曝露量は、それぞれ総 setmelanotide 相当量の 8.9～17.3%及び 16.6～22.0%であり、ラジオ HPLC による分析で血漿抽出物中では主に未変化体として存在した結果と一致しなかった。この結果の違いの原因は不明である。しかし、LC-MS/MS による分析では定量下限が 25 ng/mL であることを考慮すると、LC-MS/MS による未変化体の定量結果が過小評価されている可能性があることに留意する必要がある。また、臨床試験では血漿試料に添加していたプロテアーゼ阻害剤を、ラットのマスバランス試験では添加していなかった点にも留意する必要がある。血漿試料には HALT®を、尿試料には CHAPS を添加することで分解を最小限にした。安定剤の有無及びラジオ HPLC による分析の抽出手順の違いが、分析結果の違いの原因並びにラット及びヒトで検出された代謝物の違いの原因になっている可能性がある。

排泄評価パートでは、投与した放射能の大部分が尿中（約 75%、ケージ洗浄液は含まない）に排泄された。遠心分離後、尿中から放射能の 95%以上が回収された。尿中で 17 種類の代謝物（M1～M15、M18 及び M19）を同定した（図 2.6.4-1）。投与した放射能の 5%以上に相当する代謝物は 4 種類存在し、M7（投与放射能の 0～15%）、M10（投与放射能の 1～11%）、M12（投与放射能の 2～11%）及び M19（投与放射能の 14～59%）であった。Setmelanotide 未変化体［$(M+H)^+ = 1{,}117$］は、投与量の 4～29%に相当した。Setmelanotide の C 末端アミドの加水分解により遊離[redacted]に変換した代謝物である M19 が同定された。M19 のさらなる加水分解、[redacted]の切断及びアセチル化により生成した代謝物 M12 を同定した。また、M19 のさらなる加水分解、[redacted]の切断及び[redacted]の脱離により生成した代謝物 M7 を同定した。さらに、M19 のさらなる加水分解及びヒスチジン側鎖の脱離により生成した代謝物 M10 を同定した。M14（投与放射能の 1～4%）及び M15（投与放射能の 1～3%）が、[redacted]の異なる位置での加水分解による切断によって生成した。

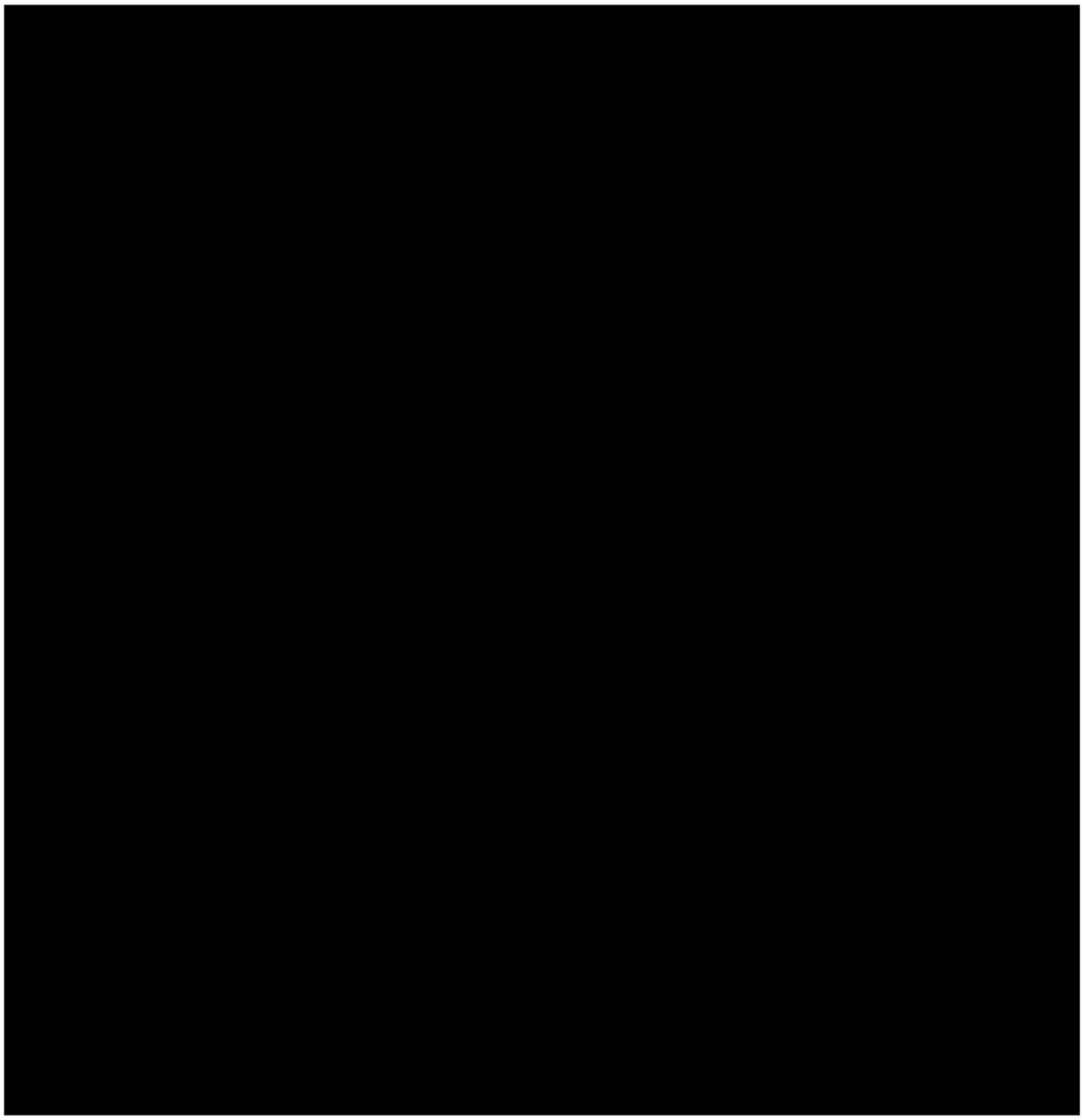
投与した放射能の 10%未満が糞中に排泄された。糞試料の分析では、検出した放射能は 1 種類のみで、代謝物 M6 であった。この代謝物は、M19 のさらなる加水分解、[redacted]の切断及び[redacted]の[redacted]側鎖の脱離によって生成した代謝物である。

上述及び図 2.6.4-1 に示すように、ラットにおける setmelanotide の主要な代謝経路は、C 末端

アミドの加水分解によって[redacted]（M19）への変換である。これに続いて、[redacted]の加水分解及び[redacted]の脱離（M7）又はアセチル化（M12）が生じる。また、[redacted]側鎖の加水分解及び切断によって M6 が生成する。[redacted]の加水分解及びヒスチジン側鎖の脱離によって M10 が生成する。Setmelanotide のペプチド加水分解によって M14 及び M15 も生成する。尿中代謝物は、皮下投与時と静脈内投与時で若干違いがみられた。皮下投与したとき、ラット尿中で存在量の多い 4 種類の代謝物は M7、M10、M12 及び M19 であった。静脈内投与したとき、存在量の多い代謝物は M5、M10、M12 及び M19 であった。4 種類の代謝物 M7、M10、M12 及び M19 の MC1R、MC3R 及び MC4R に対する活性の探索的評価の結果、遊離[redacted]体である M19 のみが、in vitro で MC1R、MC3R 及び MC4R に対して活性を示したが、その活性は MC1R に対して未変化体の約 3 分の 1 並びに MC3R 及び MC4R に対して未変化体の約 10 分の 1 であった。M7 及び M12 の MC1R に対する活性は、それぞれ未変化体の約 500 分の 1 及び約 60 分の 1 であり、M10 の MC1R に対する活性並びに M7、M10 及び M12 の MC3R 及び MC4R に対する活性は未変化体の 1,000 分の 1 未満であった（4.2.2.4-5）。

臨床試験（RM-493-026 試験［5.3.3.1.4］）において、尿中 setmelanotide の測定のため、一部の被験者から経時的に尿を採取した。また、探索的に尿中代謝物を評価した。ラットの試験では複数の尿中代謝物が検出されたが、ヒト尿中で定量可能な代謝物は、M19 及び M7 の 2 種類のみであった（4.2.2.4-6）。M19 は C 末端アミドの加水分解によって[redacted]に変換された代謝物、M7 は M19 の[redacted]－[redacted]間の結合の切断及び[redacted]のさらなる脱離によって生成した代謝物である。被験者数は 6 例と少なく、データに変動がみられたが、M19 は投与した 3 mg の約 2%、M7 は 1%未満、setmelanotide 未変化体は 20～40%に相当すると推定された（4.2.2.4-6）。

図 2.6.4-1　Sprague-Dawley ラットにおける setmelanotide の代謝経路



2.6.4.6　排泄

2.6.4.6.1　ラットを用いた排泄試験

2.6.4.6.1.1　[^{14}C]-Setmelanotide の単回投与 ADME 試験

RM-493-PK-008 試験（4.2.2.2-1）

雌雄 SD ラットに[^{14}C]-setmelanotide を単回皮下又は静脈内投与したときの放射能の排泄経路及び排泄マスバランスを評価した。排泄に関するマスバランス評価では、雌雄 SD ラット各 3 例から構成される投与群 2 群に、[^{14}C]-setmelanotide を 2 mg/kg（設定放射能 100 µCi/kg）で単回皮下投与又は 1 mg/kg で単回静脈内投与した。投与後、プラスチック製の代謝ケージに動物を移し、168 時間まで尿及び糞を別々に採取した。また、BDC 動物の評価では、雌雄 SD ラット各 3 例から構成される投与群 1 群に、[^{14}C]-setmelanotide を 2 mg/kg（設定放射能 100 µCi/kg）で単回皮下

投与した。投与後、プラスチック製の代謝ケージに動物を移し、48 時間まで胆汁、尿及び糞を別々に採取した。胆汁、尿、糞及びケージ洗浄液中の放射能を液体シンチレーション計数法によって測定した。

排泄データに基づくと、[^{14}C]-setmelanotide を 2 mg/kg で単回皮下投与したとき、胆管カニューレ処置していないラットでは、168 時間までに雄では投与放射能の 91.9%及び雌では 90.8%が、尿、糞及びケージ洗浄液に排泄された。皮下投与したとき、尿中（ケージ洗浄液を含む）に雄では投与放射能の 85.2%及び雌では 85.0%が排泄され、糞中に雄では投与放射能の 6.65%及び雌では 5.76%が排泄された。BDC 動物では、投与後 48 時間までに尿中（ケージ洗浄液含む）に雄では投与放射能の 79.1%及び雌では 86.3%が排泄され、糞中に雄では 6.95%及び雌では 1.64%、胆汁中に雄では 1.70%及び雌では 2.05%が排泄された。BDC 動物の総排泄率は、雄で投与放射能の 88.1%、雌で 90.3%であった。

[^{14}C]-Setmelanotide を 1 mg/kg で単回静脈内（ボーラス）投与したとき、168 時間までに雄では投与放射能の 101.7%、雌では 95.5%が尿、糞及びケージ洗浄液に排泄された。静脈内投与したとき、尿中（ケージ洗浄液を含む）に雄では投与放射能の 95.7%及び雌では 87.4%が排泄され、糞中に雄では 5.94%及び雌では 8.00%が排泄された。

Setmelanotide 未変化体の尿中排泄率は、静脈内投与時（雄 10.8%、雌 8.5%）の方が皮下投与時（雄 6.8%、雌 3.8%）より高値を示した。

2.6.4.6.1.2 妊娠中又は授乳中ラットにおける乳汁中排泄

RM-493-TOX-033 試験（4.2.3.5.3）

雌性 SD ラットの妊娠、分娩及び授乳期間中に setmelanotide/mPEG-DSPE 投与による毒性を評価し、妊娠 6 日～分娩後 21 日における出生児の発達、生存、身体的発達、行動及び生殖能に対する影響を評価した。また、妊娠中及び授乳中の母動物並びに出生児の血漿中、母動物の乳汁中 setmelanotide 濃度を測定した。Setmelanotide/mPEG-DSPE（1:10）を 0、0.5、3.0 及び 5.0 mg/kg/日で皮下投与し、生理食塩液を陰性対照とした。本項では、乳汁中濃度のみ示す。

分娩後 11 日において、母動物に setmelanotide を 0.5、3 及び 5 mg/kg/日で投与したとき、乳汁中 setmelanotide 濃度は定量可能であり、乳汁中 setmelanotide 濃度の平均値は 12.0 ng/mL（0.5 mg/kg/日）～106 ng/mL（5 mg/kg/日）であった。分娩後 11 日の投与後 2 時間の乳汁／血漿比は 0.5、3 及び 5 mg/kg/日でそれぞれ 0.39、0.21 及び 0.17 であった。なお、いずれの用量群で出生後 11 日の出生児の血漿中 setmelanotide 濃度は BLQ であった。

2.6.4.7 薬物動態学的相互作用

2.6.4.7.1 In vitro 試験

2.6.4.7.1.1 In vitro チトクローム P450 に対する阻害作用

T0063 試験（4.2.2.6-1）

Setmelanotide（最高濃度 1,000 µmol/L）の各種ヒト CYP 分子種に対する阻害作用を in vitro で評価した。NADPH、setmelanotide 及びプローブ基質（3-シアノ-7-エトキシクマリン［CYP1A2

及び 2C19］、7-メトキシ-4-(トリフルオロメチル)-クマリン［CYP2C9］、3-[2-(N,N-ジエチル-N-メチルアンモニウム)エチル]-7-メトキシ-4-メチルクマリン［CYP2D6］、7-ベンジルオキシキノロン［BQ；CYP3A4/5］、7-ベンジルオキシ-4-(トリフルオロメチル)-クマリン［BFC；CYP3A4/5］）を含有する HLM の混合溶液でアッセイを実施した。

CYP1A2、2C9、2C19 及び 2D6 に対する阻害は認められず（50%阻害濃度［IC_{50}］1,000 µmol/L 超）、CYP3A4/5 に対しては弱い阻害作用が認められた（BQ IC_{50} = 76 µmol/L 及び BFC IC_{50} = 54 µmol/L）。CYP3A4/5 に対する競合阻害並びに血漿中及び HLM 中の非結合型分率が同等であると仮定した場合、非結合型薬物の阻害定数（$K_{i,u}$）は 5.6～15 µmol/L 超と推定され、これは臨床で 3 mg 皮下投与時の非結合型最高血漿中濃度よりも 100 倍を上回る高い値である（表 2.6.4-2、非結合型分率 20.9%［2.6.4.4.1.2 項］又は 55%［2.6.4.4.1.1 項］を使用）。

2.6.4.7.1.2 ヒト肝ミクロソームを用いたチトクローム P450 に対する阻害作用

[redacted]RHYTP2_CYP Inhibition 試験（4.2.2.6-2）

Setmelanotide（1.2 µmol/L）による各種ヒト CYP 分子種に対する阻害作用を評価するため、追加の in vitro 試験を実施した。NADPH、setmelanotide 及びプローブ基質（phenacetin［CYP1A2］、coumarin［CYP2A6］、bupropion［CYP2B6］、amodiaquine［CYP2C8］、ジクロフェナク［CYP2C9］、S-mephenytoin［CYP2C19］、bufuralol［CYP2D6］、chlorzoxazone［CYP2E1］、ミダゾラム［CYP3A4/5］及びテストステロン［CYP3A4/5］）を含有する HLM 混合溶液で評価した。

CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 2E1 に対する阻害作用は認められず（IC_{50} 1.2 µmol/L 超）。CYP3A4/5 に対してはわずかな阻害作用が認められた（阻害率はミダゾラムで 18.2%、テストステロンで 10.2%、IC_{50} 1.2 µmol/L 超）。CYP3A4/5 に対する競合阻害並びに血漿中及び HLM 中の非結合型分率が同等であると仮定した場合、$K_{i,u}$ は 0.13～0.33 µmol/L 超と推定される（非結合型分率 20.9%［2.6.4.4.1.2 項］又は 55%［2.6.4.4.1.1 項］を使用）。

2.6.4.7.1.3 項に示す試験では、NADPH を添加しない条件下でプレインキュベーションしたとき、setmelanotide（最高濃度 2.4 µmol/L）の可逆的阻害は認められず、非結合型分率 20.9%（2.6.4.4.1.2 項）又は 55%（2.6.4.4.1.1 項）のとき、$K_{i,u}$ は 0.26～0.66 µmol/L 超と推定される。

2.6.4.7.1.3 ヒト肝ミクロソームを用いたチトクローム P450 に対する時間依存的阻害作用

[redacted]RHYTP2_CYP TDI 試験（4.2.2.6-3）

Setmelanotide（最高濃度 2.4 µmol/L）による主要なヒト CYP 分子種に対する時間依存的阻害の可能性を IC_{50} シフト法により評価した。NADPH の添加、非添加にかかわらずプレインキュベーションを行った後、プローブ基質（phenacetin［CYP1A2］、coumarin［CYP2A6］、bupropion［CYP2B6］、amodiaquine［CYP2C8］、ジクロフェナク［CYP2C9］、S-mephenytoin［CYP2C19］、bufuralol［CYP2D6］、chlorzoxazone［CYP2E1］、ミダゾラム［CYP3A4/5］及びテストステロン［CYP3A4/5］）を用いて残存 CYP 活性を評価した。

CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4/5 に対する阻害作用は、NADPH の添加、非添加にかかわらず認められなかった（IC_{50} 2.4 µmol/L 超）。IC_{50} シフトは認められなかったことから、不可逆的阻害パラメーター（最大不活性化速度定数、最大不活性化の 50%の速度をもたらす非結合型の阻害薬濃度、不活性化速度定数など）を算出するための追加試験は実施しなかった。

2.6.4.7.1.4 ヒト肝細胞を用いたチトクローム P450 に対する誘導作用

[redacted]RHYTP2_CYP Induction 試験（4.2.2.6-4）

Setmelanotide（0.05、0.2 及び 0.5 µmol/L）によるヒト肝細胞における CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 のメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の発現量及び酵素活性の誘導作用を評価した。凍結保存された培養可能かつ誘導可能なヒト肝細胞を解凍後、0.75×10^6 cells/mL になるように播種し、setmelanotide を添加し、37℃で 3 日間（72 時間）処理した。細胞培養液は毎日交換された。誘導処理後、定量的ポリメラーゼ連鎖反応により CYP の mRNA 発現量を測定し、LC-MS/MS で CYP プローブ基質の代謝物の生成量を測定することにより CYP 酵素活性を評価した。細胞の生存率は 3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルフォフェニル)-2H-テトラゾール-3-イウム（MTS）を用いて評価し、細胞毒性は媒体対照の MTS の吸光度と比較して評価した。

Setmelanotide は最高 1 µmol/L まで細胞毒性を示さず、インキュベーション後に細胞生存率の低下は認められなかった。

ヒト肝細胞いずれの 3 例でも 3 濃度の setmelanotide によって CYP2B6 及び 3A4 の mRNA 発現量及び酵素活性は増加しなかった（媒体対照の 2 倍未満）。CYP1A2 については、最高濃度で mRNA 発現量が増加（媒体対照の 2.38 倍）したドナーが 1 例認められたが、他の 2 例のドナーでは mRNA 発現量の増加は媒体対照の 2 倍未満であった。

なお、ヒト肝細胞の誘導処理 3 日目における肝細胞培養液中の setmelanotide 濃度を測定した結果、誘導処理中において setmelanotide は安定であった。

以上の結果から、setmelanotide は CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導剤ではないが、CYP1A2 については、3 例のヒト肝細胞ドナーの内 1 例で誘導作用が認められたことから、誘導剤である可能性がある。

2.6.4.7.1.5 Setmelanotide の膜透過性

791312 試験（4.2.2.6-5）

Setmelanotide（10 µmol/L）を頂端側から基底側（AP-BL）及び基底側から頂端側（BL-AP）への膜透過性を評価した。Caco-2 細胞のサブクローンである TC7 ヒト腸上皮細胞を用い、頂端側は pH 6.5、基底側は pH 7.4 に設定し、被験物質及び対照物質の膜透過性を評価した。また、フルオレセインを用いた細胞単層膜の完全性を評価した。AP-BL 及び BL-AP の両方の膜透過性評価において、被験物質はドナー側では検出されたが、レシーバー側では BLQ であった。この結果から、setmelanotide の細胞膜の透過性は限定的であることが示唆された。

2.6.4.7.1.6 トランスポーターの基質認識性及び阻害作用

[redacted]RHYTP1 試験（4.2.2.6-6）

P-糖タンパク質（P-gp）、乳癌耐性タンパク（BCRP）、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 及び 1B3、有機アニオントランスポーター（OAT）1 及び 3、並びに有機カチオントランスポーター（OCT）2 に対する setmelanotide の基質認識性及び阻害の可能性を評価した。

各取り込みトランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2）を発現したヒト胚腎（HEK）293 細胞を用いて、被験物質による阻害の可能性を評価した。トランスポーター発現細胞及びベクターを遺伝子導入した対照細胞を用い、被験物質の存在下又は非存在下でトランスポーターに特異的なプローブ基質の取り込みを評価した。被験物質の試験濃度は、OATP1B1 及び OATP1B3 では 0.56 µmol/L、OAT1、OAT3 及び OCT2 では 1.12 µmol/L と設定した。Setmelanotide は OATP1B1 発現 HEK293 細胞ではアトルバスタチンの取り込みを 1.65%阻害し、OATP1B3 発現 HEK293 細胞ではアトルバスタチンの取り込みを阻害せず、OAT1 発現 HEK293 細胞ではパラアミノ馬尿酸の取り込み、OAT3 発現 HEK293 細胞ではフロセミドの取り込み、OCT2 発現 HEK293 細胞では 1-メチル-4-フェニルピリジニウムの取り込みを阻害しなかった。これらの結果から、setmelanotide はこれらの取り込みトランスポーターに対する顕著な阻害剤ではなかった。

各トランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2）を発現した HEK293 細胞及びベクター対照細胞を用いて、setmelanotide の細胞内への取り込みにより setmelanotide の基質認識性を評価した。0.01、0.1 及び 1 µmol/L の setmelanotide を細胞と共に 2、5 及び 10 分間インキュベートした。本試験条件下での取り込み速度の比（トランスポーター発現細胞による取り込み速度をベクター対照細胞による取り込み速度で除した比）は 2.00 未満であったことから、setmelanotide はこれらのトランスポーターの基質である可能性は非常に低い。

MDR1 発現 Madin-Darby canine kidney（MDCK）細胞を用いて AP-BL 及び BL-AP の双方向輸送により、setmelanotide の P-gp に対する阻害作用を評価した。P-gp 活性の指標として P-gp のプローブ基質であるジゴキシン（10 µmol/L）の細胞単層膜の経細胞輸送を評価した。試験濃度 1.12 µmol/L で、setmelanotide は P-gp に対してほとんど阻害作用を示さなかった。試験濃度で P-gp に対する阻害率は 50%未満であったため、setmelanotide は P-gp に対する顕著な阻害剤ではなかった。

同様に、BCRP 発現 MDCK 細胞を用いて AP-BL 及び BL-AP の双方向輸送により、BCRP に対する阻害作用を評価した。BCRP のプローブ基質である cladribine（10 µmol/L）の細胞単層膜の経細胞輸送を評価した。試験濃度 1.12 µmol/L で、setmelanotide の BCRP に対する阻害率は 23.6%であった。阻害率は 50%未満であったため、setmelanotide は BCRP に対する顕著な阻害剤ではなかった。

Setmelanotide の P-gp 及び BCRP による基質認識性は、MDR1 発現 MDCK 細胞、BCRP 発現 MDCK 細胞及びトランスポーター非発現 MDCK 細胞を用いて、AP-BL 及び BL-AP の双方向の輸送により評価した。Setmelanotide の試験濃度は、0.01、0.1 及び 1 µmol/L に設定した。低濃度側の 2 濃度では、setmelanotide のレシーバー側の濃度は定量不可能であったため、efflux ratio

（BL-AP の P_{app}／AP-BL の P_{app}）は算出できなかった。Setmelanotide の BL-AP 方向に輸送された濃度は、AP-BL 方向より高くはなかったため、これらの濃度では setmelanotide は P-gp 及び BCRP の基質ではないことを示している。1 µmol/L では、setmelanotide の efflux ratio は全ての細胞系で 2.00 未満であった。したがって、setmelanotide は P-gp 及び BCRP の基質ではなかった。

In vitro において、setmelanotide は P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 又は OCT2 の顕著な阻害剤ではなく、また基質でもなかった。

2.6.4.7.1.7 MATE の基質認識性及び阻害作用

[redacted]RHYTP3 試験（4.2.2.6-7）

腎排出トランスポーターである MATE1 及び MATE2K を発現した HEK293 細胞を用いて、被験物質の基質認識性及び／又は阻害作用を評価した。各排出トランスポーター（MATE1 又は MATE2K）を発現した HEK293 細胞を用いて、細胞内への setmelanotide の取り込みにより setmelanotide の基質認識性を評価した。トランスポーター発現 HEK293 細胞は、ベクター対照細胞と並行して評価した。Setmelanotide（2.1 µmol/L）と細胞を pH 8.5 の Hank's Balanced Salt Solution 緩衝液中で 2、5 及び 10 分間インキュベートした。本試験条件下において、setmelanotide の MATE1 による輸送速度の比（MATE1 発現 HEK293 細胞による輸送速度をベクター発現 HEK293 細胞による輸送速度で除した比）は 2.0 未満であり、本試験条件下において、setmelanotide は MATE1 の基質ではなかったため、in vivo での MATE1 阻害剤との併用による薬物相互作用試験は必要ないと判断した。2 分間のインキュベーションでは、setmelanotide の MATE2K による輸送速度の比は 2.17 であったが、他の試験条件では全て 2.0 未満であった。したがって、本試験条件下において setmelanotide は MATE2K の基質の判定基準の閾値付近であると考えられる。MATE2K 発現 HEK293 細胞による setmelanotide の輸送活性は低いことを考えると、MATE2K による輸送が飽和する可能性は低い。したがって、in vitro 又は in vivo での setmelanotide の MATE2K 阻害剤との薬物相互作用試験は必要ないと判断した。

MATE1 又は MATE2K を発現した HEK293 細胞を用いて、setmelanotide の阻害作用を評価した。トランスポーター発現細胞及びベクター対照細胞を用いて、setmelanotide の存在下又は非存在下で MATE に特異的なプローブ基質であるメトホルミンの取り込みを評価した。試験濃度 1.1 µmol/L（ヒトにおける C_{max} である約 34 nmol/L の約 30 倍に相当）で、setmelanotide は MATE1 発現 HEK293 細胞でメトホルミンの輸送を 6.83%阻害し、MATE2K 発現 HEK293 細胞では 13.1%阻害したが、阻害率は 50%未満であったため、setmelanotide は MATE1 及び MATE2K のいずれに対しても阻害剤ではないと判断した。

以上の結果から、本試験条件下では 1）setmelanotide は MATE1 の基質ではなく、MATE2K の基質の判定基準の閾値付近であり、2）setmelanotide は MATE1 又は MATE2K の阻害剤ではなかった。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

本項では、皮下投与による様々な製剤を評価する PK 試験の結果を示す。これらの結果は、現

在臨床試験で用いられている mPEG-DSPE に関する試験を裏付けるものである。

2.6.4.8.1 その他の試験の要約

表 2.6.4-3 は、setmelanotide をヒトに安全に投与することを裏付ける追加の in vivo PK 試験の概要である。全ての試験の結果の概要表は 2.6.5 に示す。また、全体的な結果の要約を簡潔に示す。

表 2.6.4-3 生理食塩液及び他の製剤による setmelanotide の in vivo PK 試験

Species	Purpose	Formulation	Study Number/ Location in eCTD	GLP?
Single Dose - Rat				
SD Rat	Pharmacokinetic Study in Males Following a Single SC Dose	Setmelanotide in Saline	RM-493-PK-005/ 4.2.2.7-1	No
Single Dose – Monkey				
Rhesus Macaques Monkey	PK in Obese Monkeys	Setmelanotide dissolved in 0.9% NaCl containing 2% heat inactivated monkey serum	BIM-22493-018/ 4.2.2.7-2	No
Rhesus Macaques Monkey	PK in Obese Monkeys	Setmelanotide dissolved in saline, various microparticle formulations and LY2112688 Infusion	RM-493-PK-002/ 4.2.2.7-3	No

eCTD = electronic Common Technical Document; GLP = Good Laboratory Practice; PK = pharmacokinetic; SC = subcutaneous.
Note: LY2112688 is another potent melanocortin type 4 receptor agonist.

ラットに setmelanotide/生理食塩液を単回皮下投与したとき、V_z/F 及び CL/F は高く、$t_{1/2}$ は比較的短かった。SD ラットに setmelanotide/生理食塩液を 3、10、30 又は 90 mg/kg で単回皮下投与したときの PK を評価した。t_{max} はおおむね 0.5～1 時間であった。AUC_∞及び C_{max} は、おおむね用量比を下回って増加した。3 及び 10 mg/kg 群の $t_{1/2}$ は類似しており、1.01～1.41 時間であった。30 及び 90 mg/kg 群の $t_{1/2}$ は約 3 倍長く、CL/F は用量の増加に伴って増加した。これらのデータから、setmelanotide/生理食塩液を皮下投与したとき、PK は用量に比例しないことが示唆された。

また、肥満アカゲザルに加熱不活化処理したサル血清を 2%含有する setmelanotide/生理食塩液を 0.5 mg/kg で皮下ボーラス投与及び皮下持続投与したときの in vivo での setmelanotide の PK を探索的に比較した。皮下持続投与したときの C_{max} は、皮下ボーラス投与よりも著しく低かった。さらに、肥満アカゲザルに setmelanotide の様々な製剤を投与し、薬力学的反応を探索した。本試験では、生理食塩液、酢酸塩及び微粉化製剤により setmelanotide を 1 日 2 回及び 1 日 1 回投与した。薬理学的評価の結果は情報提供を目的として 2.6.2 に示す。

2.6.4.8.2 ラットにおける単回投与試験

2.6.4.8.2.1 ラットにおける生理食塩液による単回皮下投与試験

RM-493-PK-005 試験（4.2.2.7-1）

雄性 SD ラットに setmelanotide/生理食塩液を 3、10、30 又は 90 mg/kg で単回皮下投与したときの PK を評価した。用量及び濃度は正味の（遊離体）ペプチドとして示し、semelanotide 濃度は 10 mg/mL であった。全体的に、t_{max} は 0.5 時間（3 mg/kg）～1 時間（10 mg/kg）であった。AUC_{∞}及び C_{max} はおおむね用量比を下回って増加した。

3、10、30 及び 90 mg/kg で C_{max} は、それぞれ 741、1,280、2,030 及び 2,850 ng/mL であった。また、全身曝露の指標である AUC_{∞}は、それぞれ 1,515、3,824、7,009 及び 12,960 ng*hr/mL であった。

3 及び 10 mg/kg の $t_{1/2}$ は類似しており、それぞれ 1.01～1.41 時間であった。30 及び 90 mg/kg 群の $t_{1/2}$ は、10 及び 30 mg/kg 群よりも約 3 倍長く、3.59～4.94 時間であった。CL/F は用量の増加に伴って増加し、3、10、30 及び 90 mg/kg でそれぞれ 1.980、2.615、4.280 及び 6.946 L/hr/kg であった。また、V_z/F はそれぞれ 2.887、5.334、22.18 及び 49.52 L/kg であった。

本試験の結果から、setmelanotide/生理食塩液の使用が支持されたが、半減期が短いため、持続投与や徐放性製剤の検討が必要と考えられた。

2.6.4.8.3 サルにおける単回投与試験

2.6.4.8.3.1 肥満アカゲザルにおける単回投与試験

BIM-22493-018 試験（4.2.2.7-2）

肥満アカゲザルにおける setmelanotide の PK を in vivo で予備的に評価した。Setmelanotide を加熱不活化処理したサル血清を 2%の含有する 0.9%NaCl 溶液に溶解し、setmelanotide（450 nmol/kg、約 0.5 mg/kg）をボーラス及び皮下埋め込み型ポンプで皮下投与した。ボーラス投与時の t_{max} は 120 分、C_{max} は 951.2 ng/mL、AUC は 10,870 ng*hr/mL であった。Setmelanotide を輸液ポンプで皮下投与した場合、C_{max} 及び AUC は著しく低く、それぞれ 196.7 ng/mL 及び 3,813 ng*hr/mL であった。輸液ポンプで投与したときの t_{max} は変動がみられ、4 例の動物では 24 時間及び 2 例の動物では 2 時間であった。

2.6.4.8.3.2 肥満アカゲザルにおける各種製剤による反復投与試験

RM-493-PK-002 試験（4.2.2.7-3）

Setmelanotide の酢酸塩及び setmelanotide の微粉化製剤の皮下投与並びに setmelanotide 及び LY2112688 の皮下持続投与

本試験は複数パートで構成される探索的薬理学試験であり、主に setmelanotide を異なる用量及び製剤で投与したときの薬力学的反応を評価した。本項では PK データのみを要約し、薬理学データは 2.6.2 に示す。本試験では、肥満アカゲザルにおける setmelanotide を皮下投与したときの忍容性、心血管反応、食事摂取量及び体重減少への影響を評価した。また、一部のパートでは setmelanotide の PK も評価した。本試験では 1）酢酸塩溶液による 1 日 2 回投与、2）setmelanotide の皮下持続投与、及び 3）微粉化製剤による 1 日 1 回投与を実施した。評価の目的は、1）setmelanotide 酢酸塩を 1 日 2 回皮下投与又は微粉化製剤を 1 日 1 回投与したときの心血管反応の増加の評価、2）食事摂取量の評価、及び 3）PK プロファイルの評価であった。

Setmelanotide 酢酸塩の 1 日 2 回投与時の PK（0.19～0.25 mg/kg/日）

Setmelanotide の酢酸塩を 0.19 mg/kg で 1 日 2 回投与したとき、定常状態における午前及び午後の最低血漿中濃度（C_{min}）の平均値はそれぞれ 22.4 ng/mL 及び 38.3 ng/mL であった。本試験の前に実施した BIM-22493-018 試験（4.2.2.7-2）において、450 nmol/kg/日（約 0.5 mg/kg/日）で皮下持続投与（皮下埋め込み型ポンプを使用）したときの 24 時間にわたる血漿中濃度の平均値は約 200 ng/mL であった。また、各動物における 200 ng/mL 未満となる時間を評価した。酢酸塩により 1 日 2 回投与したとき、午前投与では平均 4.87 時間及び午後投与では平均 6.50 時間にわたって setmelanotide 濃度は 200 ng/mL 未満であった。

Setmelanotide の酢酸塩を 0.25 mg/kg で 1 日 2 回投与したとき、異常な PK を示した 1 例のサルを除外し、C_{min} の平均値は 107 ng/mL であった。C_{min} には著しい変動がみられ、2 例の動物は 100 ng/mL 未満（55.0 及び 65.3 ng/mL）、1 例の動物は約 100 ng/mL（98.8 ng/mL）であり、2 例の動物は 100 ng/mL 超であった（動物番号 20211 は 164 ng/mL、動物番号 22963 は 152 ng/mL）。BIM-22493-018 試験（4.2.2.7-2）では、450 nmol/kg/日（約 0.5 mg/kg/日）で皮下持続投与（埋め込み型ポンプを使用）投与したとき、24 時間にわたって血漿中濃度の平均値は約 200 ng/mL であった。また、各動物における 200 ng/mL 未満となる時間を評価した。酢酸塩による 1 日 2 回投与時の 200 ng/mL 未満であった時間は、午前投与後 8 時間までの期間中、平均 0.045 時間（約 3 分）であった。

埋め込み型ポンプによる皮下持続投与時の PK

埋め込み型浸透圧ミニポンプを使用して皮下持続投与（450 nmol/kg/日 ×3 日間）したときの setmelanotide 及び強力な MC4R 作動物質である LY2112688 の血液及び脳脊髄液（CSF）中濃度を評価した。

<u>Setmelanotide</u>

Setmelanotide を 450 nmol/kg/日（約 0.5 mg/kg/日）で投与したときの個体別の血漿及び CSF 中濃度を測定した。1 例の動物（動物番号 22963）が他の動物よりも著しく高い曝露量（血漿中濃度）を示した。この動物の Day 2（48～72 時間）の血漿中濃度は 800～1,410 ng/mL であった。他の 5 例の動物における血漿中濃度は 127～291 ng/mL であった。試験後に詳細な調査を行ったが、投与には問題は認められず、1 例の動物で顕著に高い血漿中濃度を示した原因を究明することはできなかった。

6 例中 4 例の動物で CSF 中 setmelanotide 濃度は検出可能であった。一方、2 例の動物では CSF 中濃度は BLQ（定量下限値 0.397 ng/mL）であった。定量可能であった 4 例の動物における setmelanotide 濃度の血漿／CSF 比は 198～2,049 の範囲であった。CSF 濃度が BLQ であった 2 例の動物の比は、分母として定量下限値（0.397 ng/mL）を使用して推定した。これら 2 例の動物では、血漿／CSF 比は 350～458 以上であった。したがって、setmelanotide の CSF 中への移行は限定的であり、多くても血漿の約 200 分の 1、あるいはさらに低い可能性が高いと結論づけられた。また、CSF は腰椎穿刺によって採取しため、CSF に末梢血や組織が混入したことも考えら

れ、算出された CSF 中の setmelanotide の曝露量はさらに低いと考えられる。

LY2112688

LY2112688 を 450 nmol/kg/日（約 0.5 mg/kg/日）で投与したときの個体別の血漿及び CSF 中濃度を測定した。他の動物より setmelanotide の高い曝露量を示した 1 例の動物（動物番号 22963）では、他の動物と比較して LY2112688 の曝露量もわずかに高値を示した。この動物では、Day 2（48～72 時間）の血漿中濃度は 352～444 ng/mL であった。他の 5 例の動物における血漿中濃度は 162～316 ng/mL であった。

6 例の全ての動物で、CSF 中 LY2112688 濃度は定量可能であり、CSF 中濃度は 0.742～3.31 ng/mL であった。LY2112688 濃度の血漿／CSF 比は 65～371 の範囲であった。全体的に、CSF 中における LY2112688 の曝露量は、setmelanotide の曝露量よりも高い傾向がみられた。

微粉化製剤による 1 日 1 回投与時の PK

微粉化製剤により setmelanotide を 0.5 mg/kg/日で 3 日間 1 日 1 回投与したときの心血管応答及び摂食量を評価し、併せて Day 4 の投与後 48 時間までの PK を評価した。C_{min} の平均値は 19.9 ng/mL であり、各動物における 200 ng/mL 未満となる時間を評価した。微粉化製剤による 1 日 1 回投与により 1 日平均 9.64 時間（範囲：6.04～14.0 時間）にわたって、setemleanotide 濃度は 200 ng/mL 未満であった。

以後の評価では、動物に 0.5 mg/kg/日で Day 0～Day 30 まで皮下投与した。

本パートの前に [redacted] で実施したサブスタディにおいて、[redacted] で開発した分析法を用いて setmelanotide の徐放性製剤の PK を評価し、主要評価として報告書中に記載した（RM-493-PK-002 試験［4.2.2.7-3］）。RM-493-PK-002 試験の実施期間中に、[redacted]（[redacted]、米国テキサス州）でバリデートした分析法が確立された。[redacted] での分析後、ドライアイス中で血漿試料を [redacted] に輸送し分析した。完全性を保つため、報告書の追補としてこれらのデータを含めた。

動物番号 22963（雄）における setmelanotide 濃度を視覚的に評価したところ、他の全ての動物よりも著しく高値を示したが、この差異の原因は不明である。この動物の setmelanotide 濃度は高値を示したが、摂食量や体重減少との関連はみられなかった。6 例の動物全体の PK パラメーターの平均値（標準偏差）は、C_{max} は 1,290（1,270）ng/mL、t_{max} は 4.7（1.6）時間、C_{min} は 520（807）ng/mL、T_{min} は 0.00（0）時間、平均血漿中濃度（C_{avg}）は 972（1,110）ng/mL、変動係数は 106（35.1）%、$AUC_{0-\tau}$ は 23,300（26,600）ng*hr/mL 及び $t_{1/2}$ は 22.6（9.35）時間であった。高値を示した動物番号 22963 を除いた場合、C_{max} は 775（135）ng/mL、t_{max} は 4.8（1.8）時間、C_{min} は 191（75.9）ng/mL、T_{min} は 0.00（0）時間、C_{avg} は 522（124）ng/mL、変動係数は 116（26.4）%、$AUC_{0-\tau}$ は 12,500（2,970）ng*hr/mL 及び $t_{1/2}$ は 19.1（4.29）時間であった。

2.6.4.9 考察及び結論

マウス、ラット、ウサギ及びサルで setmelanotide（RM-493）の非臨床 PK 及び ADME を評価した。毒性試験で得られた非臨床動物種における setmelanotide の全身曝露量及びヒトにおける

臨床用量での曝露量との比較を表 2.6.4-4 に示す。

主に setmelanotide/mPEG-DSPE を投与したときの PK、TK 及び ADME の結果を以下に示す。

- ラット及びサルに setmelanotide を単回及び反復投与したとき、CL_{ss}/F 及び V_z/F は高く、$t_{1/2}$ は比較的短かった。
  - ラットを用いた 26 週間毒性試験において、CL_{ss}/F は雄で 0.338～0.512 L/hr/kg、雌で 0.742～1.54 L/hr/kg であった。V_z/F は雄で 5.06～14.7 L/kg、雌で 3.22～9.44 L/kg であり、$t_{1/2}$ は雄で 7.20～19.9 時間、雌で 1.55～5.69 時間であった。無毒性量での曝露量は表 2.6.4-4 に要約した。
  - サルを用いた 39 週間毒性試験において、CL_{ss}/F の平均値は 0.0842～0.216 L/hr/kg、V_z/F は 0.563～1.19 L/kg、$t_{1/2}$ は 2.49～17.6 時間であった。無毒性量での曝露量は表 2.6.4-4 に要約した。
- 放射性標識体を用いた PK 試験において、ラットに 2 mg/kg（約 100 μCi/kg）で皮下投与したときの生物学的利用率は、静脈内投与時との比較から 76～85%と高いことが示された。
- 全身曝露量は変動がみられたが、おおむね用量に比例していた。
- マウス、ラット及びサルにおいて、全身曝露量に一貫した性差はみられなかった。
- 蓄積には変動がみられたが、より高用量での反復投与によりわずかに蓄積した。
- rasH2-Tg マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験において、1、3 及び 10 mg/kg を 1 日 1 回皮下投与したとき、Day 1 及び Day 182 の投与後 1 時間の血漿試料を採取して、setmelanotide に対する曝露量を確認した。Day 182 の血漿中濃度は、おおむね Day 1 よりも低く（1 標準偏差以内）、Day 182 の血漿中濃度は雌の方が雄よりわずかに低値を示した。
- In vitro における血漿タンパク結合率（4 時間インキュベーション）は、マウスで 82.4%、ラットで 82.1%、ウサギで 76.3%及びサルで 78.3%であった。ヒトでは、同じ評価方法で 79.1%であった。したがって、血漿タンパク結合率は評価した動物種間で類似していた。
- QWBA による組織分布試験では、雌雄共に腎臓（全ての部位）で最も曝露量が高く、次いで肝臓及び肺、並びに雌の子宮及び卵巣で血漿及び全血と同程度の比較的高濃度の曝露がみられた。放射能に対する曝露量が最も低値を示したのは脳及び眼であった。
- 有色皮膚と白色皮膚への分布に差異はみられなかった。
- 血漿試料のラジオ HPLC による分析により、setmelanotide 未変化体の ROI は 76～95%であった。
- 排泄に関するデータから、雌雄ラットに[^{14}C]-setmelanotide の単回皮下又は静脈内投与後 168 時間までに投与量の 90%超が尿、糞及びケージ洗浄液中に排泄された。未変化体及び代謝物は主に尿中に排泄され（85.1%）、糞中排泄率は小さかった（6.2%）。
- Setmelanotide 未変化体及び 19 種類の代謝物が、尿を主とするラット排泄物の抽出物中で検出された。4 種類の代謝物は、投与量の 5%超を占めた。Setmelanotide の主要代謝経路は、[redacted]の加水分解による[redacted]への変換である。ラットの尿中代謝物である遊離[redacted]体のみが、MC1R、MC3R 及び MC4R に対して活性を示したが、その活性は setmelanotide 未変化体の約 10 分の 1～約 3 分の 1 であった。他の代謝物の活性は全体的に 1,000 分の 1 未満であった。

- Setmelanotide は肝臓で代謝されなかった。Setmelanotide はヒト、ラット及びサル肝及び腎ミクロソーム中で安定であった。また、setmelanotide はヒト、ラット及びサルの肝細胞中でも安定であった。
- Setmelanotide は臨床用量での曝露量に比して非常に高い設定濃度で CYP3A に対してわずかな阻害作用がみられたが、setmelanotide は他の CYP を介した阻害作用及び誘導作用は認められず、臨床において併用薬との薬物相互作用は惹起しないと考えられる。
- Setmelanotide は最高 1 µmol/L までの濃度で 1 例のドナーから調製したヒト肝細胞に対して細胞毒性がないことが示され、主要な肝 CYP に対する時間依存的阻害剤でもなかった。
- Setmelanotide は、P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2 及び MATE1 及び MATE2K の基質ではなく、これらのトランスポーターの顕著な阻害剤でもなかった。
- マウスを用いた 6 ヵ月間がん原性試験（RM-493-TOX-042 試験［4.2.3.4.2-3］）の Day 183 の 2 つの試料を除いて、非臨床毒性試験で評価した全ての動物種で ADA 陽性と判定された試料は認められなかった。陽性と判定されたいずれの試料も確認アッセイでの阻害率は低値を示した。一方の試料は対照群の動物の試料であり、偽陽性の可能性が高い。もう 1 つの試料は 1 mg/kg 投与群の雌の試料であり、確認アッセイのカットポイントは 11.1%と非常に低かったため、これも偽陽性の可能性がある。評価した全ての動物において、Day 182 の血漿中 setmelanotide 濃度は Day 1 よりわずかに低値を示したことから（それぞれ 428 及び 478 ng/mL で、1 標準偏差以内）、ADA が存在したとしても、TK に影響しなかったことが示唆された。
- 臨床試験（RM-493-026 試験［5.3.3.1.4］）において、尿中 setmelanotide の測定のため、一部の被験者から経時的に尿を採取した。ラット試験とは異なり、ヒト試験では、尿中で定量可能な代謝物は M19 及び M7 の 2 種類のみであった。M19 は C 末端アミドの加水分解によって[redacted]に変換された代謝物、M7 は[redacted]－[redacted]間の結合の切断及び[redacted]のさらなる脱離によって生成した代謝物である。被験者数は 6 例と少なく、データに変動がみられたが、M19 は投与した 3 mg の約 2%、M7 は 1%未満、setmelanotide 未変化体は 20～40%に相当すると推定された。
- ラットに[^{14}C]-mPEG-DSPE を 20 mg/kg（100 µCi/kg）で皮下投与したとき、投与量の 95～97%が尿、糞及びケージ洗浄液中に排泄された。投与量の 73～75%が尿中（ケージ洗浄液を含む）に、23%が糞中に排泄された。7 回目の投与後 24 時間、2 週間、7 週間及び 12 週間における脈絡叢の濃度は、大部分の動物において BLQ であった。

毒性評価と共にこれらのデータから、mPEG-DSPE による setmelanotide の対象患者集団への安全な投与が支持された。

表 2.6.4-4 Setmelanotide/mPEG-DSPE の主要な毒性試験における血漿中曝露量及び最高臨床用量 3 mg/日に対する安全域

Study	NOAEL (mg/kg/day)	Plasma Exposure based on NOAEL		Setmelanotide Exposure Margins [a]	
		C_{max} (ng/mL)	AUC (ng*hr/mL)	C_{max} basis	AUC basis
6-Month Rat [b]	3	773	5,100	20	9
9-Month Monkey	3/1	1,203	15,245	32	26
Juvenile Rat	3	805	3,840	21	7
Female Fertility and EFD in Rats	5	1,280	6,450	34	11
EFD in Rabbits	0.05	53	206	1.4	0.4
PPD in Rats	5	744	4,140	20	7
26-Week Carcinogenicity in rasH2-Tg Mice [c]	10	3,070	9,600	81	17

AUC = area under the concentration-time curve; C_{max} = maximum observed concentration; EFD = embryo-fetal development; mPEG-DSPE = N-(carbonyl-methoxypolyethylene glycol-2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine; NOAEL = no observed adverse effect level; PPD = pre/postnatal development; SC = subcutaneous.

a. Setmelanotide exposure margins are based on C_{max} and AUC_{∞} (sexes-combined for studies with males and females) at the NOAEL for each study assuming human exposure of 37.9 ng/mL and 576 ng*hr/mL, respectively, following a 3.0 mg SC dose for 12 weeks in Clinical Study RM-493-026 (5.3.3.1.4).

b. Includes evaluation of male fertility.

c. Estimated exposure based on Day 28 toxicokinetic data from wild type rasH2 mice (Study RM-493-TOX-041 [4.2.3.4.2-2]) in males and females combined.