

オプスミット錠 10 mg
(マシテンタン (ACT-064992))

CTD 第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

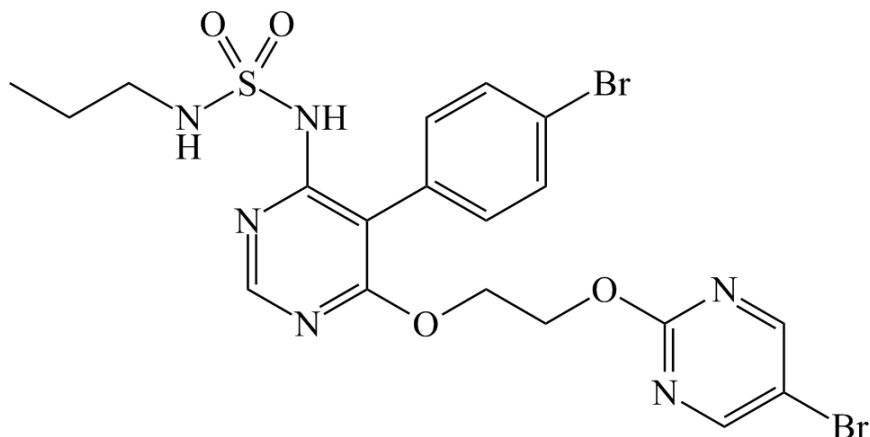
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

アクテリオンファーマシューティカルズジャパン株式会社

薬理学的分類

マシテンタンはデュアルエンドセリン（ET）受容体（ET_A 及び ET_B）拮抗薬である。以下に構造式を示す。



作用機序

マシテンタンは経口投与で有効なデュアル ET_A/ET_B 受容体拮抗薬であり、ET_A 及び ET_B 受容体への ET-1 の結合を阻害する。マシテンタンはヒト肺動脈平滑筋細胞において ET 受容体への高い親和性及び持続的な結合/阻害作用を有し、その物理化学的特性により病態肺組織への移行に優れている。

肺高血圧動物モデルにおいて、マシテンタンは全身血圧に影響することなく、平均肺動脈圧の低下作用を示した。また、肺動脈肥大及び右室リモデリングの抑制並びに生存期間の延長作用を示した。

臨床

マシテンタンは WHO 機能分類クラス II～IV の肺動脈性肺高血圧症（PAH、WHO 肺高血圧症臨床分類の第 1 群）患者に対して、morbidity/mortality の改善作用を有する薬剤である。

マシテンタンは単独投与及びホスホジエステラーゼ-5 阻害剤又は吸入／経口プロスタサイクリン製剤との併用投与により、特発性 PAH、遺伝性 PAH、結合組織病に伴う PAH、先天性心疾患に伴う PAH、HIV 感染症に伴う PAH 及びその他の病因に伴う PAH（薬物及び毒物）を含む PAH 患者において有効性が認められている。

マシテンタンの臨床推奨用量は 10 mg 1 日 1 回の経口投与であり、10 mg 錠が製造されている。

オプスミット錠 10 mg
(マシテンタン (ACT-064992))

CTD 第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

アクテリオンファーマシューティカルズジャパン株式会社

目次

目次.....	2
表一覧.....	3
図一覧.....	3
略号及び頭字語一覧.....	4
1. まとめ.....	6
2. 効力を裏付ける試験.....	6
2.1 <i>In vitro</i> 薬理試験	6
2.1.1 ET _A 及び ET _B 受容体への ET-1 結合の阻害	6
2.1.2 ET _A 及び ET _B 受容体の機能阻害	7
2.1.2.1 組換え細胞における細胞内カルシウム濃度上昇の阻害	7
2.1.2.2 摘出組織における ET-1 誘発収縮の阻害	7
2.1.3 ヒト肺動脈平滑筋細胞における受容体解離動態.....	7
2.1.4 代謝物の <i>in vitro</i> 薬理試験	9
2.1.4.1 ACT-132577	9
2.1.4.2 ACT-373898.....	9
2.2 <i>In vivo</i> 薬理試験	10
2.2.1 正常ラットにおけるマシテンタンの薬力学的作用.....	11
2.2.1.1 正常ラットの血漿中 ET-1 濃度に対するマシテンタンの作用	11
2.2.1.2 正常血圧ラットの血行動態に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）	12
2.2.2 高血圧ラットモデルにおけるマシテンタンの作用.....	12
2.2.2.1 高血圧ラットの血圧及び心拍数に対するマシテンタンの作用（単回経口投与） ...	12
2.2.2.2 高血圧ラットの血圧及び心拍数に対するマシテンタンの作用（反復経口投与） ...	13
2.2.2.3 高血圧ラットにおけるボセンタン又はアンブリセンタンの効果に対するマシテンタンの相加効果	14
2.2.3 肺高血圧ラットモデルにおけるマシテンタンの作用.....	15
2.2.3.1 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの平均肺動脈圧に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）	15
2.2.3.2 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの右室肥大及び生存率に対するマシテンタンの作用（反復経口投与）	16
2.2.3.3 ブレオマイシン誘発肺高血圧/肺線維症ラットの右室肥大に対するマシテンタンの作用（反復経口投与）	18
3. 副次的薬理試験.....	18
4. 安全性薬理試験.....	19
4.1 中枢神経系	20
4.1.1 Irwin 変法によるスクリーニング試験	20
4.2 呼吸系	20
4.2.1 全身プレチスモグラフィ法による呼吸機能試験	20

4.3 心血管系	20
4.3.1 hERG チャネル試験	21
4.3.2 モルモットにおける心電図に対する影響.....	21
4.3.3 覚醒下のイヌにおける心電図及び動脈圧に対する影響.....	21
5. 薬力学的薬物相互作用	22
6. 考察及び結論	22

表一覧

表 1 ラットを用いた薬力学試験の概要	10
表 2 安全性薬理試験の概要	19

図一覧

図 1 ヒト PASMC における Ca^{2+} 遊離を指標としたボセンタン、アンブリセンタン及びマシテンタンの受容体結合半減期	8
図 2 ヒト PASMC における ET-1 誘発 IP_1 蓄積に対するボセンタン、アンブリセンタン及びマシテンタンの濃度 - 反応曲線	9
図 3 Wistar ラットにおけるマシテンタン投与後 6 時間の血漿中 ET-1 値	11
図 4 Dahl-S 高血圧ラットの平均動脈圧に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）	12
図 5 Dahl-S 高血圧ラットの平均動脈圧及び心拍数に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）	13
図 6 Dahl-S 高血圧ラットの平均動脈圧に対するアンブリセンタン投与後のマシテンタン追加投与による相加効果	14
図 7 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの平均肺動脈圧に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）	15
図 8 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺動脈壁厚（A）及び右室肥大（B）に対するマシテンタンの作用（反復経口投与）	17
図 9 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの生存率に対するマシテンタン及びボセンタンの作用（反復経口投与）	17
図 10 ブレオマイシン誘発肺高血圧/肺線維症ラットの右室肥大に対するマシテンタン及びボセンタンの作用（反復経口投与）	18

略号及び頭字語一覧

ANOVA	Analysis of variance	分散分析
bpm	Beats per minute	1 分間の拍動数
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C _{max}	Maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
CTR	Control	対照
Dahl-S	Dahl salt-sensitive	Dahl 食塩感受性
DOCA	Deoxycorticosterone acetate	酢酸デオキシコルチコステロン
EC ₅₀	Concentration of an agonist that induces 50% of the maximum response for that agonist	最大反応の 50%の反応を誘発するアゴニスト濃度 (50%有効濃度)
ECG	Electrocardiogram	心電図
ED ₅₀	Dose that elicits 50% of the maximal effect	最大効果の 50%を惹起する用量 (50%有効量)
ERA	Endothelin receptor antagonist	エンドセリン受容体拮抗薬
ET	Endothelin	エンドセリン
ET-1	Endothelin-1	エンドセリン-1
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
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	Human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HR	Heart rate	心拍数
i.v.	Intravenous	静脈内
IC ₅₀	Concentration that causes 50% inhibition	50%阻害濃度
IP ₁	Inositol-1-phosphate	イノシトール-1-リン酸
K _b	The equilibrium dissociation constant of a ligand determined by means of a functional assay	機能試験により算出したリガンドの平衡解離定数
LV+S	Left ventricular plus septal weight	左室重量+心室中隔重量
MAP	Mean arterial blood pressure	平均動脈圧
MCT	Monocrotaline	モノクロタリン
mPAP	Mean pulmonary arterial pressure	平均肺動脈圧
N/A	Not applicable	該当せず
pA ₂	Negative logarithm of the molar concentration of antagonist that causes a 2-fold shift to the right of an agonist concentration-response curve	アゴニスト濃度－反応曲線を 2 倍高濃度側に平行移動させるのに必要なアンタゴニストのモル濃度の負の対数値

PAH	Pulmonary arterial hypertension	肺動脈性肺高血圧
PASMC	Pulmonary arterial smooth muscle cells	肺動脈平滑筋細胞
PH	Pulmonary hypertension	肺高血圧
QT _c	Heart rate-adjusted QT value	心拍数で補正した QT 間隔
RV	Right ventricular weight	右室重量
SEM	Standard error of the mean	平均値の標準誤差
t _{1/2}	Calculated receptor occupancy half-life	受容体結合半減期
Vehi	Vehicle	溶媒

1. まとめ

マシテンタン (ACT-064992) は経口投与で有効なエンドセリン (ET) 受容体 (ET_A 及び ET_B) のデュアルアンタゴニストであり、高い受容体結合親和性と緩徐な受容体からの解離を特徴とする。*In vitro* において、マシテンタンは ET_A 及び ET_B 受容体への ET-1 の結合を選択的に阻害するとともに、細胞及び摘出臓器を用いた機能試験において、これらの受容体を介する反応を阻害した。*In vivo* において、マシテンタンは血漿中 ET-1 濃度を上昇させた。

循環血中において、ET_A 及び ET_B 受容体のデュアルアンタゴニスト作用を有する活性代謝物 ACT-132577 が認められている。*In vitro* 機能試験 (摘出ラット大動脈及び気管の収縮阻害) において、ACT-132577 はマシテンタンに比べて平均約 5 分の 1 の活性を示した。マシテンタンの薬理作用には ACT-132577 も寄与していると考えられる。

各種動物モデルにおいて、マシテンタンは用量依存的な有効性を示した。高血圧ラットにマシテンタンを単回経口投与すると、心拍数 (HR) に影響することなく、平均動脈圧 (MAP) が用量依存的に低下した。マシテンタンを反復経口投与すると、タキフィラキシー、投与中止後のリバウンド現象及び HR の増加を伴うことなく、持続的な血圧低下作用を示した。肺高血圧 (PH) ラットにマシテンタンを単回経口投与すると、用量依存的な平均肺動脈圧 (mPAP) の持続的低下が認められた。モノクロタリン (MCT) 誘発 PH ラットにマシテンタンを 4 週間投与すると、用量依存的に肺血管のリモデリング及び右室肥大が抑制され、さらに生存期間が延長した。ブレオマイシン誘発 PH 及び肺線維症ラットにおいて、マシテンタンはボセンタンに比べて、優れた右室肥大抑制作用を示した。

複数の動物種を用いて、主要器官の生理学的機能に対するマシテンタンの影響を検討した。マシテンタンの中枢及び末梢神経系機能を含む一連の行動及び生理学的パラメータ、並びに呼吸系の生理学的機能に対する影響は認められなかった。マシテンタン及びその活性代謝物である ACT-132577 は *in vitro* において、ヒトに臨床用量を投与したときの血漿中非結合型濃度の 1000 倍以上高い濃度においても、hERG チャンネルを介するカリウム電流に対する阻害作用は 20%未満であった。モルモット及びイヌを用いた *in vivo* 試験において、マシテンタンは心室再分極を含む心電図 (ECG) 波形を変化させなかった。マシテンタンはイヌの血圧を低下させたが、正常血圧ラットにおいては、血圧低下作用は認められなかった。

2. 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理試験

2.1.1 ET_A 及び ET_B 受容体への ET-1 結合の阻害 [モジュール 4.2.1.1.7]

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用いて、ヒト ET_A 及び ET_B 受容体の安定発現細胞を作製した。これらの発現細胞のミクロソーム膜面分を用いて、放射性ヨウ素標識ヒト ET-1

(¹²⁵I-ET-1) による結合試験を実施した。マシテンタンは ET_A 及び ET_B 受容体への ¹²⁵I-ET-1 の結合を阻害し、その IC₅₀ 値 (平均値±標準誤差) はそれぞれ 0.49 ± 0.07 nM (n = 13) 及び 391 ± 49 nM (n = 14) であった。

2.1.2 ET_A 及び ET_B 受容体の機能阻害

2.1.2.1 組換え細胞における細胞内カルシウム濃度上昇の阻害 [モジュール 4.2.1.1.10]

ヒト ET_A 又は ET_B 受容体を発現する組換え CHO-K1 細胞を用いて、ET-1 誘発細胞内 Ca²⁺濃度上昇に対するマシテンタンの阻害能を検討した。初めに、ピーク蛍光シグナルから IC₅₀ 値を算出し、この試験で用いた ET-1 濃度及び既知の ET-1 の EC₅₀ 値を用いて (EC₅₀-EC₇₀)、Cheng-Prusoff 式により K_b 値に変換した[Cheng 1973]。この機能試験におけるマシテンタンの K_b 幾何平均値は、ET_A 受容体で 0.81 nM (n=8)、ET_B 受容体で 128 nM (n=5) であった。

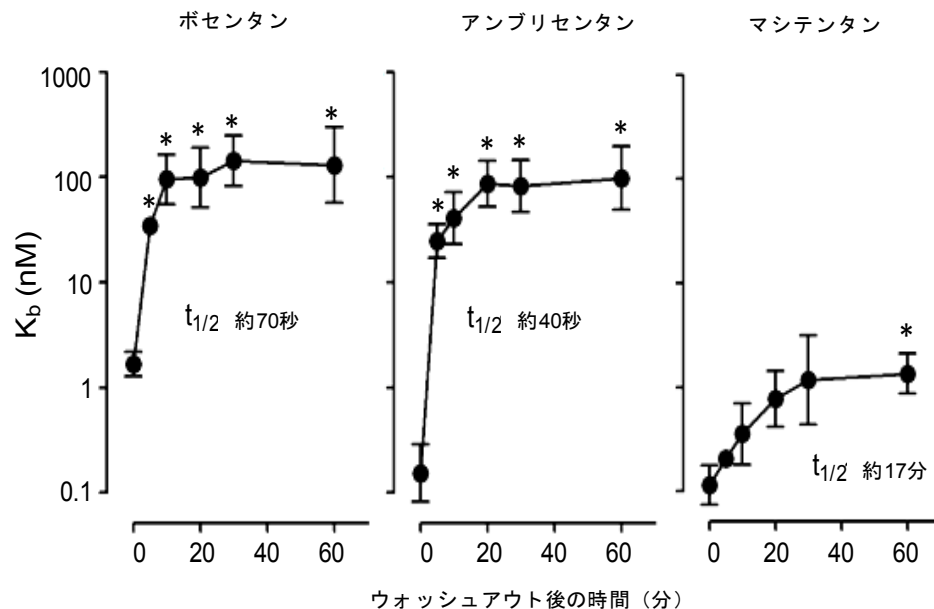
2.1.2.2 摘出組織における ET-1 誘発収縮の阻害 [モジュール 4.2.1.1.6]

マシテンタンは、ラットから摘出した内皮剥離大動脈の ET-1 刺激誘発収縮 (ET_A 受容体媒介性) 及び上皮剥離気管のサラフトキシン S6c 刺激誘発収縮 (ET_B 受容体媒介性) を阻害した。Schild 解析により得られた傾きと 1 との間に有意差が認められなかったことから、マシテンタンは競合的拮抗薬であることが明らかとなった。マシテンタンの pA₂ 値は 7.6 ± 0.2 (ET_A 受容体、n=3) 及び 5.9 ± 0.2 (ET_B 受容体、n=3) と算出された。したがって、摘出組織を用いたこれらの機能試験におけるマシテンタンの ET_A/ET_B 阻害活性比は 50 : 1 であった。また摘出組織において、マシテンタンはアゴニスト活性を示さなかった。

2.1.3 ヒト肺動脈平滑筋細胞における受容体解離動態 [モジュール 4.2.1.1.10]

肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) は血管の収縮を引き起こすとともに、リモデリングにも関与しており、PAH の病態形成において非常に重要な役割を果たす細胞である。そこで、ヒト初代培養 PASMC を用いて、Ca²⁺遊離を指標にマシテンタンの阻害能及び受容体解離動態について、他のエンドセリン受容体拮抗薬 (ERA) であるアンブリセンタン及びボセンタンと比較検討した。その結果、K_b 幾何平均値 (IC₅₀ 値から算出) は、マシテンタンで 0.14 nM (n=6)、アンブリセンタンで 0.12 nM (n=6)、ボセンタンで 1.1 nM (n=6) であった。また、受容体結合の半減期を求めるため、マシテンタン、アンブリセンタン又はボセンタンを PASMC に添加し 120 分間インキュベーションした。結合していない化合物をウォッシュアウトし、残存する拮抗作用を経時的に測定した。図 1 に示すように、ボセンタン及びアンブリセンタンで処理した PASMC は、速やかに ET-1 による反応が認められ、受容体結合の半減期は、ボセンタンで 70 秒、アンブリセンタンで 40 秒であった。一方、マシテンタンは時間の経過とともに緩徐に効力を失い、ウォッシュアウト 60 分後においても効力が依然として認められ、その半減期は 17 分であった。

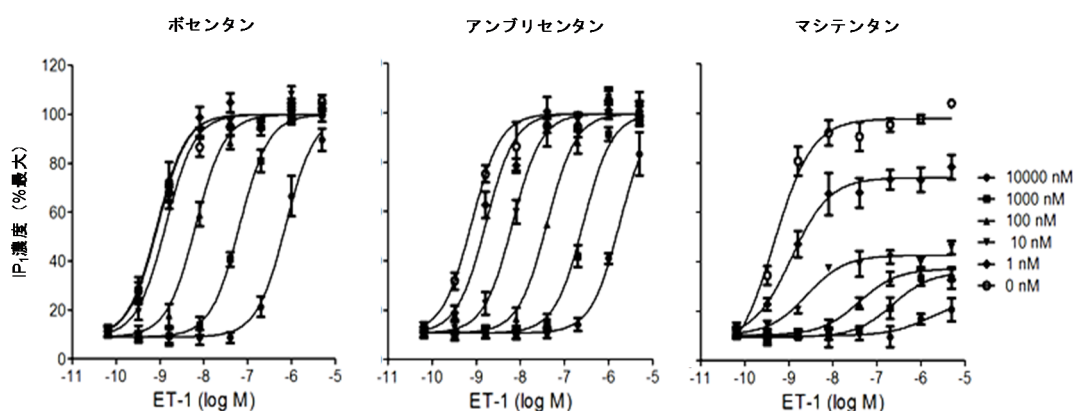
図 1 ヒト PASM C における Ca^{2+} 遊離を指標としたボセンタン、アンブリセンタン及びマシテンタンの受容体結合半減期



K_b 値は Cheng-Prusoff 式を用いて IC_{50} 値から計算した。データは幾何平均値 \pm SEM ($n = 2 \sim 4$) で示す。* $t = 0$ における K_b 値と比較して $p < 0.05$ で有意差あり (一元配置 ANOVA 及び Dunnett の事後検定)。 K_b =解離定数、PASMC=肺動脈平滑筋細胞、 $t_{1/2}$ =受容体結合半減期[モジュール 4.2.1.1.10, Figure 1]。

受容体拮抗作用の機序を明らかにするため、3 種類の ERA すべてについて、イノシトール-1-リン酸 (IP_1) の蓄積を指標として検討した。図 2 に示すように、3 種類の ERA すべてが、20 分間の ET-1 刺激で誘発した IP_1 の蓄積を濃度依存的に阻害した。アンブリセンタン及びボセンタンは ET-1 による濃度-反応曲線を高濃度側に平行移動させ、surmountable な拮抗作用を示したのに対して、マシテンタンは最大反応を抑制し、insurmountable な拮抗作用を示した。ET-1 刺激時間を 90 分間に延長すると、マシテンタンは surmountable な挙動を示した。以上のことから、マシテンタンはボセンタンやアンブリセンタンに比べて、受容体からの解離速度が緩徐な競合的拮抗薬であることが明らかとなった。

図 2 ヒト PASM C における ET-1 誘発 IP₁ 蓄積に対するボセンタン、アンブリセタン及びマシテンタンの濃度 - 反応曲線



ヒト PASM C にマシテンタン、アンブリセタン又はボセンタンを添加し、120 分間プレインキュベーションした。次に、ET-1 で細胞を 20 分間刺激し、細胞内 IP₁ 量を測定した。アンタゴニスト非存在下での最大反応により、実験ごとに IP₁ 濃度を補正した。データは算術平均値 \pm SEM (n = 4) で示す。ERA=エンドセリン受容体拮抗薬、ET-1=エンドセリン-1、IP₁=イノシトール-1-リン酸、PASM C=肺動脈平滑筋細胞[モジュール 4.2.1.1.10, Figure 2]。

2.1.4 代謝物の *in vitro* 薬理試験

ヒト血液中で 2 種類の代謝物、ACT-132577 及び ACT-373898 が特定されている[モジュール 2.7.2]。*In vitro* 試験において、ACT-132577 は ET_A 及び ET_B の両受容体に拮抗作用を示すのに対して、ACT-373898 は ET 受容体拮抗作用を示さないことが明らかになった。

2.1.4.1 ACT-132577 [モジュール 4.2.1.1.6, 4.2.1.1.7, 4.2.1.1.10]

マシテンタンで検討した *in vitro* 試験法と同じ方法で ACT-132577 の活性を測定した。ET_A 及び ET_B 受容体を発現させた組換え CHO-K1 細胞由来の膜画分を用いた試験において、ACT-132577 は ET_A 及び ET_B 受容体に対して拮抗作用を示し、その IC₅₀ 値 (平均値 \pm 標準誤差) はそれぞれ 3.4 ± 0.20 nM (n = 4) 及び 987 ± 92 nM (n = 4) であった[モジュール 4.2.1.1.7]。組換え CHO-K1 細胞株において、ACT-132577 は ET-1 誘発細胞内 Ca²⁺濃度上昇を阻害し、その K_b 値は ET_A 受容体で 5.5 nM (n = 5)、ET_B 受容体で 319 nM (n = 4) であった[モジュール 4.2.1.1.10]。ヒト PASM C を用いた細胞内 Ca²⁺遊離試験において、ACT-132577 はマシテンタンのような緩徐な受容体解離動態を示さなかった[モジュール 4.2.1.1.10]。ラット由来内皮剥離大動脈及び気管における ACT-132577 の pA₂ 値は、 6.7 ± 0.2 (ET_A 受容体、n = 3) 及び 5.5 ± 0.3 (ET_B 受容体、n = 3) であった[モジュール 4.2.1.1.6]。これらのデータから、ACT-132577 は ET_A/ET_B 阻害活性比 16 : 1 のデュアル ET 受容体拮抗作用を示すことが明らかになった。ACT-132577 はマシテンタンに比べて、ET_A 受容体で約 8 分の 1、ET_B 受容体で約 2 分の 1 の活性を示し、*in vivo* におけるマシテンタンの薬理作用に寄与していると考えられる。

2.1.4.2 ACT-373898 [モジュール 4.2.1.1.8]

ET_A 受容体及び ET_B 受容体を発現させた組換え CHO-K1 細胞株において、細胞内 Ca²⁺遊離試験

を用いて ACT-373898 の拮抗作用を測定した。ACT-373898 は 10 μ M の濃度において拮抗作用を示さなかった。

2.2 *In vivo* 薬理試験

正常ラット及び疾患モデルラットを用いて、マシテンタンの薬力学的作用を検討した。特に明記しない限り、テレメトリーシステムを用いて、覚醒非拘束下の血圧及び HR データを記録した。実施した試験の概要を表 1 に示すとともに、概要表を[表 2.6.3: 1 項]に示した。

表 1 ラットを用いた薬力学試験の概要

報告書番号 Location in CTD (Module)	動物モデル	測定項目 (被験物質)	投与 期間	投与量
B-04.030 4.2.1.1.1	Wistar ラット	血漿中 ET-1 濃度 (マシテンタン)	単回 投与	0.3, 3 mg/kg
B-04.115 4.2.1.1.4	Wistar ラット	血漿中 ET-1 濃度 (マシテンタン及びボセンタン)	単回 投与	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg
B-12.447 4.2.1.1.14	Wistar ラット (正常血圧)	MAP、mPAP 及び HR (マシテンタン)	単回 投与	10, 30 mg/kg
B-04.031 4.2.1.1.2	Dahl-S 高血圧ラット	MAP 及び HR (マシテンタン)	単回 投与	0.1, 0.3, 1, 3, 10 mg/kg
	DOCA 食塩高血圧ラット	MAP 及び HR (マシテンタン)	単回 投与	1, 3, 10 mg/kg
	Dahl-S 高血圧ラット	MAP 及び HR (マシテンタン)	5 日間	1 mg/kg/日
B-04.114 4.2.1.1.3	DOCA 食塩高血圧ラット	MAP 及び HR (マシテンタン及びボセンタン)	単回 投与	0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg
B-12.110 4.2.1.1.11	Dahl-S 高血圧ラット	MAP 及び HR (マシテンタン、ボセンタン及び アンブリセンタン)	単回 投与	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 mg/kg
B-12.111 4.2.1.1.12	MCT 誘発肺高血圧 ラット	mPAP 及び HR (マシテンタン)	単回 投与	0.3, 1, 3, 10, 30 mg/kg
B-12.109 4.2.1.1.13	ブレオマイシン誘発 肺高血圧ラット	mPAP 及び HR (マシテンタン及びボセンタン)	単回 投与	0.3, 1, 3, 10, 30, 100 mg/kg
B-05.023 4.2.1.1.5	MCT 誘発肺高血圧 ラット	麻酔ラットにおける mPAP、肺動 脈壁厚、右室肥大	4 週間	0.3, 3, 10, 30, 100 mg/kg/日
		生存率 (マシテンタン及びボセンタン)	42 日間	30 mg/kg/日
B-08.687 4.2.1.1.15	ブレオマイシン誘発 肺高血圧ラット	右室肥大、肺コラーゲン含量 (マシテンタン)	19 日間	0.3, 3, 30, 100 mg/kg/日

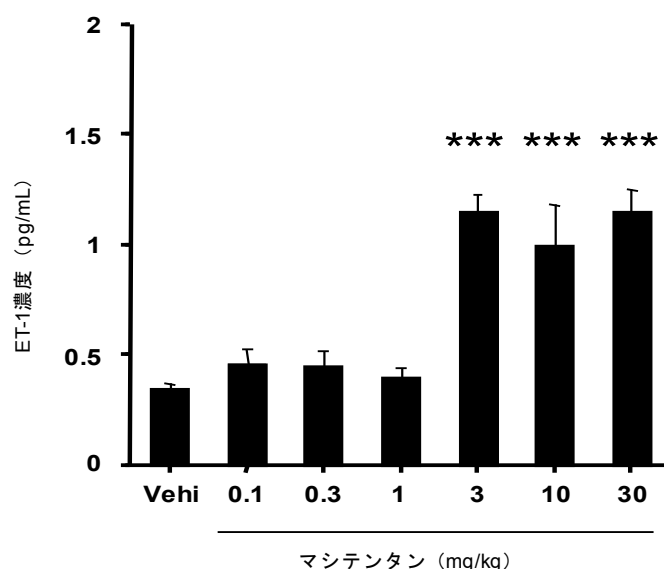
報告書番号 Location in CTD (Module)	動物モデル	測定項目 (被験物質)	投与 期間	投与量
B-11.294 4.2.1.1.9	ブレオマイシン誘発 肺高血圧ラット	右室肥大、肺コラーゲン含量 (マシテンタン及びボセンタン)	18～21 日間	100 mg/kg/日
Dahl-S=Dahl 食塩感受性、DOCA=酢酸デオキシコルチコステロン、ET-1=エンドセリン-1、HR=心拍数、MAP=平均動脈圧、mPAP=平均肺動脈圧				

2.2.1 正常ラットにおけるマシテンタンの薬力学的作用

2.2.1.1 正常ラットの血漿中 ET-1 濃度に対するマシテンタンの作用 [モジュール 4.2.1.1.1, 4.2.1.1.4]

ET_B 受容体を阻害することにより、血漿中 ET-1 値の上昇が認められ、ET_B 受容体阻害効果のマーカーとなることが報告されている[Löffler 1993]。マシテンタンの *in vivo* における ET_B 受容体阻害作用を確認するため、無処置の雄 Wistar ラット (n=5) にマシテンタンを経口投与し、血漿中 ET-1 値を酵素免疫測定法により測定した[モジュール 4.2.1.1.1]。経口投与後 6 時間における血漿中 ET-1 値は、3 mg/kg 投与群でベースライン値に比べて 2.5 倍有意な上昇を示したのに対して、0.3 mg/kg 投与群では有意な変化は認められなかった。この作用は再現性が確認され[モジュール 4.2.1.1.4]、マシテンタン投与により血漿中 ET-1 値は上昇し、3 mg/kg 以上でプラトーに達した[図 3]。ボセンタンと比較してマシテンタンの血漿中 ET-1 値上昇作用は用量比で 10 倍強力であった。

図 3 Wistar ラットにおけるマシテンタン投与後 6 時間の血漿中 ET-1 値



マシテンタンは 7.5%ゼラチン溶液として経口投与した。データは平均値 ± SEM (n=4) で示す。
 ***溶媒投与群と比較して p < 0.001 で有意差あり (一元配置 ANOVA 及び Student-Neuman-Keuls 検定)。
 Vehi=溶媒、ET-1=エンドセリン-1[モジュール 4.2.1.1.4, Figure 1]。

2.2.1.2 正常血圧ラットの血行動態に対するマシテンタンの作用（単回経口投与） [モジュール 4.2.1.1.14]

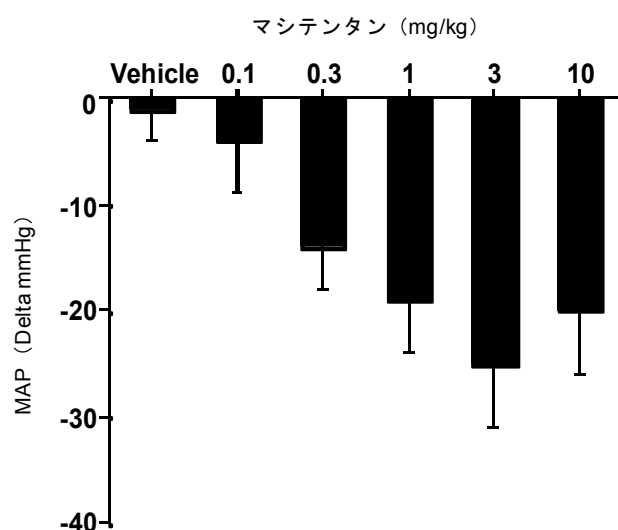
正常な覚醒下 Wistar ラットにマシテンタンを 10 及び 30 mg/kg の用量で単回経口投与したところ、MAP 及び HR に対する影響は認められなかった。全身性血圧と肺血圧を同時に測定するデュアル圧力トランスミッタを植え込んだラットを用いた試験において、マシテンタン（10 mg/kg）は MAP 及び mPAP のいずれにも影響を及ぼさなかった。これらのデータから、正常ラットにマシテンタンを投与しても、血行動態に影響を及ぼさないことが明らかになった。

2.2.2 高血圧ラットモデルにおけるマシテンタンの作用

2.2.2.1 高血圧ラットの血圧及び心拍数に対するマシテンタンの作用（単回経口投与） [モジュール 4.2.1.1.2, 4.2.1.1.3]

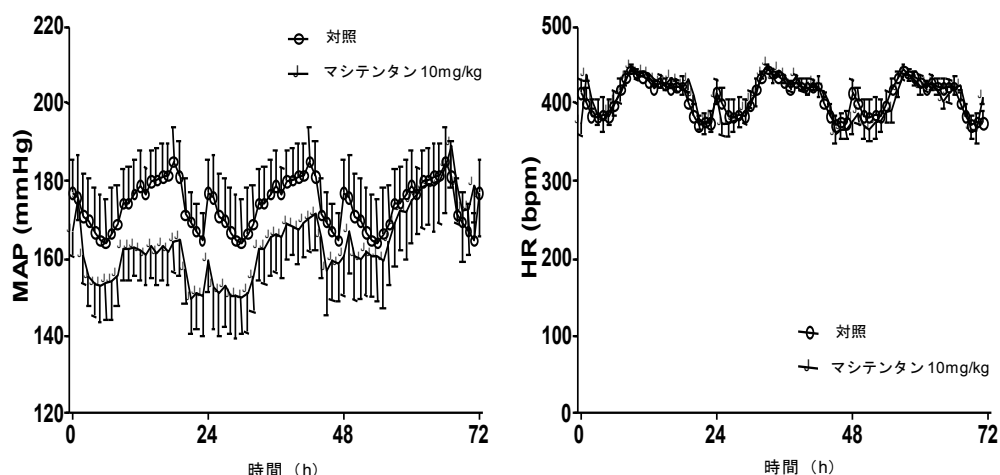
テレメトリーシステムを装着した覚醒下の高血圧ラットにおけるマシテンタン単回経口投与による MAP 及び HR に対する作用を検討した[モジュール 4.2.1.1.2]。1%食塩水を与えて飼育した 2 種類の高血圧ラットモデル、Dahl 食塩感受性（Dahl-S）高血圧ラット及び酢酸デオキシコルチコステロン（DOCA）食塩高血圧ラットを用いた。Dahl-S 高血圧ラット（n=6）及び DOCA 食塩高血圧ラット（n=7）にマシテンタンをそれぞれ 0.1、0.3、1、3、10 mg/kg 及び 1、3、10 mg/kg の用量で投与した後、MAP 及び HR を経時的に測定した。Dahl-S 高血圧ラットではマシテンタンにより用量依存的に MAP が低下し、1、3 及び 10 mg/kg で最大 20～25 mmHg の低下が認められた[図 4]。DOCA 食塩高血圧ラットではすべての用量で最大 25 mmHg の MAP 低下が認められた。Dahl-S 高血圧ラット[図 5]及び DOCA 食塩高血圧ラットのいずれにおいても、HR に対する影響は認められなかった。両試験における作用持続時間は 3 mg/kg 以上の用量で 24 時間以上であった。

図 4 Dahl-S 高血圧ラットの平均動脈圧に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）



マシテンタンは 5%アラビアゴム溶液として経口投与した。結果は平均値 \pm SEM (n=6) で示す。MAP=平均動脈圧[モジュール 4.2.1.1.2, Figure 2]。

図 5 Dahl-S 高血圧ラットの平均動脈圧及び心拍数に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）



マシテンタン (10 mg/kg) は 5%アラビアゴム溶液として経口投与した。結果は平均値 \pm SEM ($n=6$) で示す。bpm=1 分間の拍動数、HR=心拍数、MAP=平均動脈圧[モジュール 4.2.1.1.2, Figure 1]。

テレメトリーシステムを装着した DOCA 食塩高血圧ラットにおけるマシテンタン単回経口投与による作用をボセンタンと比較検討した[モジュール 4.2.1.1.3]。マシテンタン 0.3、1、3、10 及び 30 mg/kg ($n=6\sim9$)、ボセンタン 1、3、10、30、100 及び 300 mg/kg ($n=6\sim9$) 又は溶媒 ($n=9$) を単回経口投与し、一定時間（マシテンタン 0.3 mg/kg は 24 時間、1、3 及び 10 mg/kg は 48 時間、30 mg/kg は 72 時間、並びにボセンタン 1、3、10 及び 30 mg/kg は 24 時間、100 及び 300 mg/kg は 48 時間）後まで MAP 及び HR を測定した。マシテンタン及びボセンタンはいずれも HR に影響することなく、用量依存的に MAP を低下させた。マシテンタン 10 及び 30 mg/kg により平均で最大 24 ± 4 mmHg の MAP 低下が認められたのに対し ($ED_{50}=1$ mg/kg)、ボセンタンは 100 及び 300 mg/kg により平均で最大 19 ± 3 mmHg の MAP 低下が認められた ($ED_{50}=10$ mg/kg)。したがって、DOCA 食塩高血圧ラットモデルにおいて、マシテンタンはボセンタンに比べて 10 倍強力であり、かつ最大効果も大きかった。マシテンタン 10 mg/kg 投与時の血圧低下持続時間は 40 時間であり、同様の効果が得られるボセンタン 100 mg/kg 投与時の 20 時間に比べて、2 倍長い作用持続時間を示した。

2.2.2.2 高血圧ラットの血圧及び心拍数に対するマシテンタンの作用（反復経口投与） [モジュール 4.2.1.1.2]

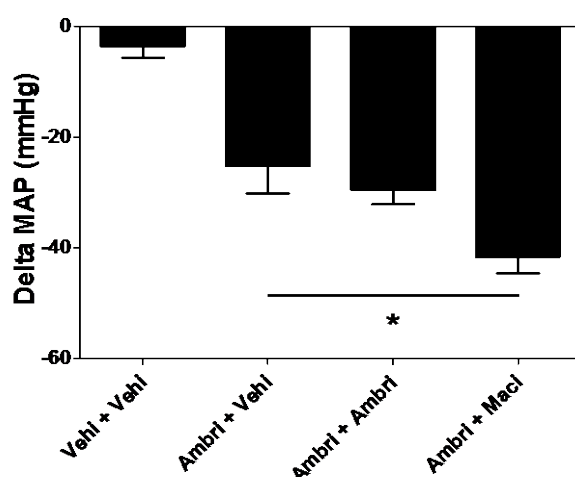
1%食塩水を摂取させ、テレメトリーシステムを装着した覚醒下の Dahl-S 高血圧ラット ($n=5$) にマシテンタン (1 mg/kg/日) を 5 日間経口投与すると、投与後 1 日目から約 20 mmHg の持続的な MAP 低下が認められた。マシテンタンの反復投与においても HR に対する影響は認められなかった。投与終了により血圧は徐々に上昇し、3 日以内にベースライン値に戻った。マシテンタンの反復経口投与による効果の減弱、増大及び投与中止によるリバウンド現象は認められなかった。

2.2.2.3 高血圧ラットにおけるボセンタン又はアンブリセンタンの効果に対するマシテンタンの相加効果 [モジュール 4.2.1.1.11]

ET_A 受容体の選択的拮抗薬であるアンブリセンタン又は ET_A 及び ET_B の両受容体拮抗薬であるボセンタンと、マシテンタンの効力の強さについて比較検討した。覚醒下の Dahl-S 高血圧ラットに最大有効量のアンブリセンタン又はボセンタンを単回投与し、最大の血圧低下が得られた時点で最大有効量のマシテンタンを追加投与した。なお、最大有効量は、血行動態 (MAP) 及び血漿中 ET-1 濃度に対する作用に基づいて選択した[Löffler 1993]。マシテンタン及びボセンタンの最大有効量はそれぞれ 30 及び 100 mg/kg を選択した。また、アンブリセンタンの最大有効量は 30 mg/kg を選択した。

アンブリセンタン 30 mg/kg 投与後、さらにアンブリセンタン 30 mg/kg を追加投与又はボセンタン 100 mg/kg 投与後、さらにボセンタン 100 mg/kg を追加投与しても、MAP 低下に対する相加効果は認められなかった。一方、アンブリセンタン 30 mg/kg 投与後、さらにマシテンタン 30 mg/kg を追加投与した場合には、MAP がさらに 17 mmHg 低下した ($p < 0.05$ 、溶媒投与群との比較) [図 6]。同様に、ボセンタン 100 mg/kg 投与後、さらにマシテンタン 30 mg/kg を追加投与した場合には、MAP がさらに 19 mmHg 低下した ($p < 0.01$ 、溶媒投与群との比較)。一方、マシテンタン 30 mg/kg 投与後、さらにアンブリセンタン 30 mg/kg 又はボセンタン 100 mg/kg を追加投与しても、さらなる MAP 低下は認められなかった。以上のことから、マシテンタンはアンブリセンタン及びボセンタンに比べ、より強い効力を有することが明らかとなった。この強い効力はマシテンタンによる ET_B 受容体の阻害 (アンブリセンタンに対する優位性) 及び組織移行性が高く受容体結合半減期が長いこと (アンブリセンタン及びボセンタンに対する優位性) が寄与していると考えられた。

図 6 Dahl-S 高血圧ラットの平均動脈圧に対するアンブリセンタン投与後のマシテンタン追加投与による相加効果



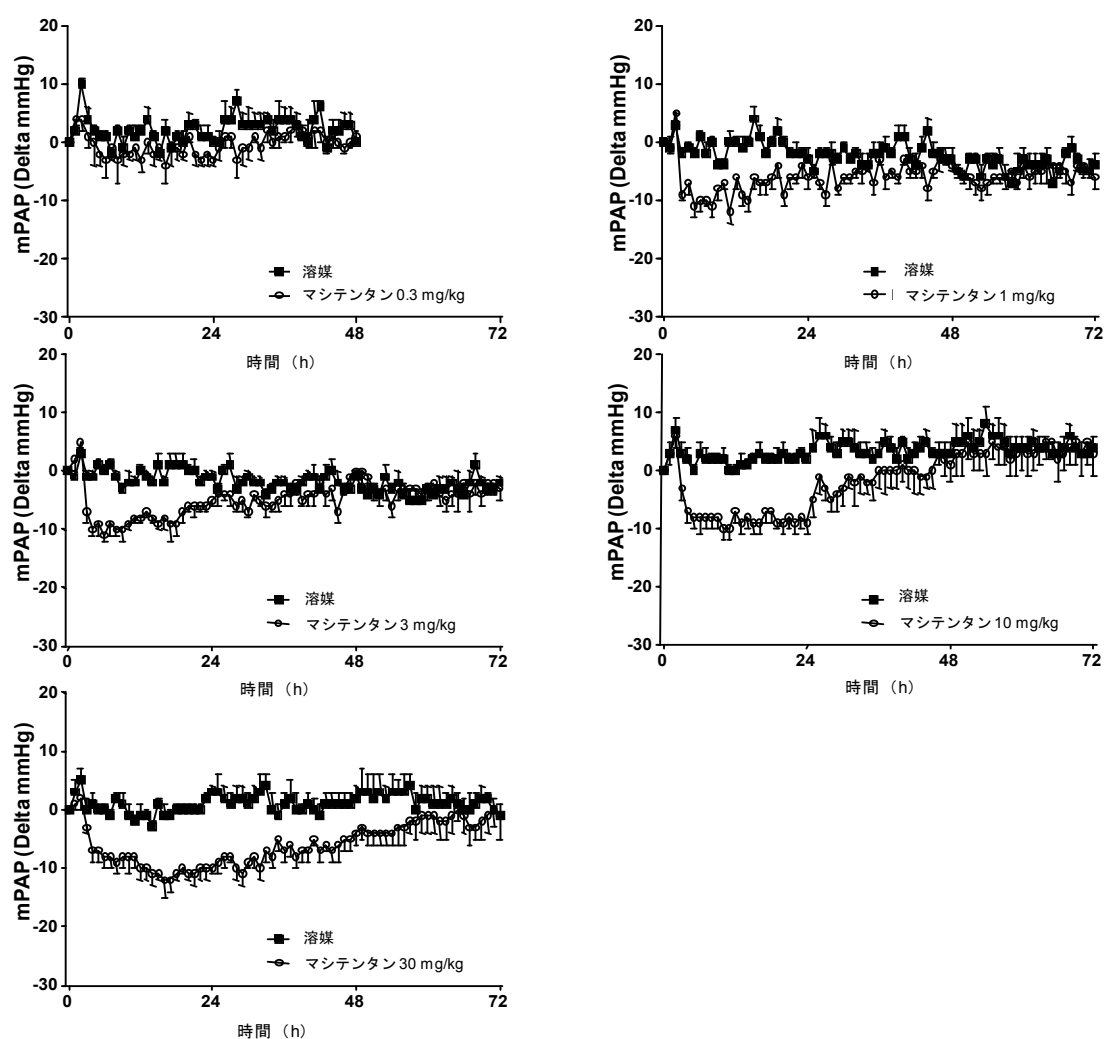
覚醒下の Dahl-S 高血圧ラットにアンブリセンタン 30 mg/kg を投与し、その後溶媒 (Vehi)、アンブリセンタン (Ambri, 30 mg/kg) 又はマシテンタン (Maci, 30 mg/kg) を追加投与したときの MAP に対する相加効果。溶媒又はアンブリセンタンの単回経口投与 6 時間後に溶媒、アンブリセンタン又はマシテンタンを投与した。MAP=平均動脈圧。データは平均値 \pm SEM ($n = 5 \sim 6$) で示す。* 対応のない Student の t-検定で $p < 0.05$ で有意差あり (アンブリセンタン+マシテンタンとアンブリセンタン+溶媒の比較) [モジュール 4.2.1.1.11, Figure 11]。

2.2.3 肺高血圧ラットモデルにおけるマシテンタンの作用

2.2.3.1 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの平均肺動脈圧に対するマシテンタンの作用（単回経口投与） [モジュール 4.2.1.1.12, 4.2.1.1.13]

PHを実験的に誘導したWistarラットを用いて、マシテンタン単回経口投与によるmPAP及びHRに対する作用を検討した。ラットにモノクロタリン（MCT）を投与すると、肺動脈のリモデリング及び右室肥大を伴うPHが発症する[Meyrick 1980, Kakusaka 1989]。MCT投与によってPHを誘発したラットにマシテンタン（0.3～30 mg/kg）を単回経口投与すると、HRに影響することなく、用量依存的にmPAPが低下した[モジュール 4.2.1.1.12]。最大有効量 10 mg/kg のマシテンタンの投与により、溶媒投与群と比べてmPAPが最大で 10 mmHg 低下し、その効果は 48 時間持続した[図 7]。

図 7 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの平均肺動脈圧に対するマシテンタンの作用（単回経口投与）



溶媒：7.5%ゼラチン 5 mL/kg。mPAP=平均肺動脈圧、n = 5～12/群。データは平均値 ± SEM で示す[モジュール 4.2.1.1.12, Figure 1]。

ブレオマイシン誘発 PH 及び肺線維症ラットにマシテンタンを単回経口投与したときの作用についても検討した[モジュール 4.2.1.1.13]。ブレオマイシン投与ラットモデルは主に肺線維症の検討に使用されているが、同時に PH も発症することが報告されている[Williams 1992, Sato 1993]。ブレオマイシン (1.5 mg/kg) をラットに単回気管内投与すると 7~9 日後に軽度の PH (mPAP 約 30 mmHg、ブレオマイシン投与前 18 mmHg) を発症する。発症したラットにマシテンタン (0.3 ~100 mg/kg) を経口投与すると、MCT 誘発 PH ラットの場合と同様に、マシテンタンは HR を増加させることなく、用量依存的に mPAP を低下させた。最大有効量 (10 mg/kg) では mPAP が 12 mmHg 低下し、その作用は 48 時間持続した。一方、ボセンタン (3~600 mg/kg) も用量依存的に mPAP を低下させたが、30 mg/kg 以上の用量で最大 8 mmHg の低下作用であり、また作用持続時間はすべての用量で 24 時間未満であった。

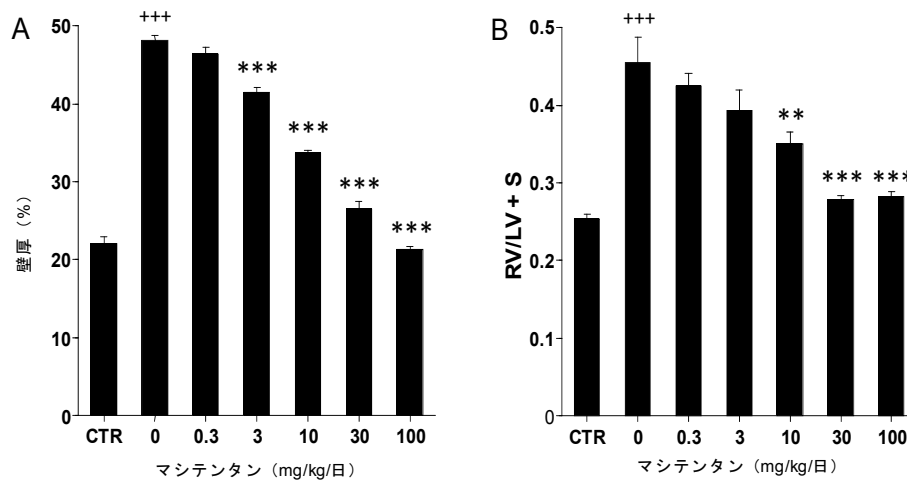
2.2.3.2 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの右室肥大及び生存率に対するマシテンタンの作用 (反復経口投与) [モジュール 4.2.1.1.5]

MCT 誘発 PH ラットに対するマシテンタン (0.3、3、10、30 及び 100 mg/kg/日、混餌投与、n = 15) 及びボセンタン (10、30、100 及び 300 mg/kg/日、混餌投与、n = 15) の作用を比較検討した。ラットに MCT (60 mg/kg) を単回皮下投与すると、4 週間後に麻酔下で mPAP が 23 mmHg 上昇し、対照群に比べて 2.4 倍の上昇が認められた。MCT 投与直後からマシテンタンを 4 週間経口投与すると、上昇した mPAP が用量依存的に低下し、最大有効量 (30 mg/kg/日) では、mPAP は対照群に比べてわずか 1.3 倍にまで低下した ($p < 0.001$ 、本薬未投与群との比較)。

MCT により誘発した肺動脈肥大 (肺動脈外径と比較した内壁厚の増加) 及び右室肥大 (RV/LV+S 比の上昇) は、マシテンタンの反復経口投与により、3 mg/kg/日以上で用量依存的に抑制された[図 8]。内壁厚は 100 mg/kg/日の用量で対照群と同程度であり、また RV/LV+S 比も 30 又は 100 mg/kg/日の用量で対照群と同程度にまで抑制された ($p < 0.001$ 、本薬未投与群との比較)。

ボセンタンも mPAP、内壁厚の増加及び右室肥大 (RV/LV+S) を抑制したが、その効力は用量比でマシテンタンの 3~10 分の 1 であった。マシテンタン及びボセンタンは MAP 及び HR には影響を及ぼさなかった。

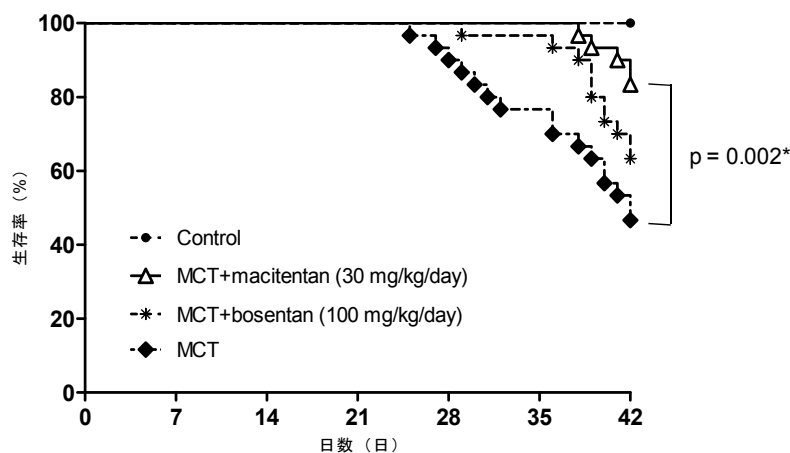
図 8 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの肺動脈壁厚 (A) 及び右室肥大 (B) に対するマシテンタンの作用 (反復経口投与)



CTR=対照 (n = 15)、壁厚 (%) = 肺動脈総内膜厚の外径に対する比、RV=右室重量、LV+S=左室重量+心室中隔重量。結果は平均値 ± SEM で示す。+++対照と比較して $p < 0.001$ で有意差あり、本薬未投与 MCT ラットと比較して** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ で有意差あり (一元配置 ANOVA 及び Student-Neuman-Keuls 検定) [モジュール 4.2.1.1.5, Figure 6]。

マシテンタンの生存率に対する影響を検討するため、ラットに MCT (60 mg/kg) を単回皮下投与した後、マシテンタン (30 mg/kg/日、混餌投与) 又はボセンタン (100 mg/kg/日、混餌投与) を投与した。本薬未投与群のラットが 50%死亡した時点 (42 日間投与) で試験を終了した。マシテンタン投与群では生存率は 83%であり、有意差が認められたが ($p = 0.002$ 、本薬未投与群との比較)、ボセンタン投与群の生存率は 63%であり、本薬未投与群との間に有意差は認められなかった [図 9]。

図 9 モノクロタリン誘発肺高血圧ラットの生存率に対するマシテンタン及びボセンタンの作用 (反復経口投与)



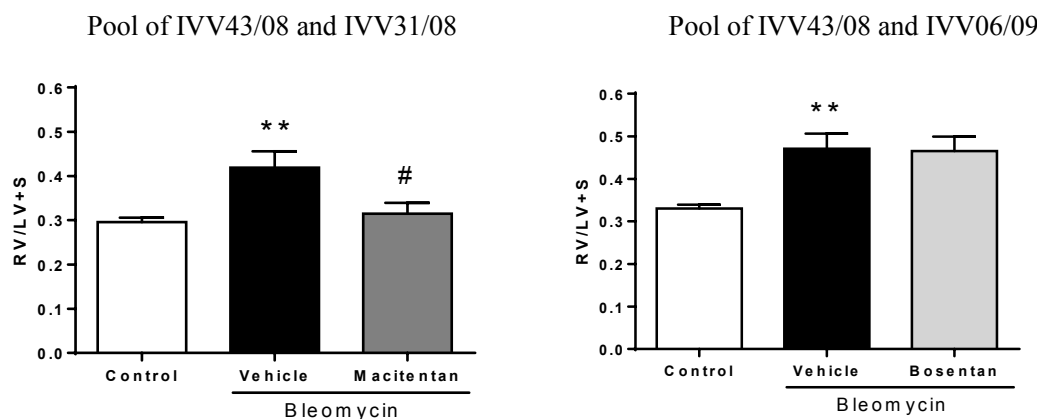
Control (対照) ラット (n = 10)、MCT (モノクロタリン) 処置ラット (n = 30)。本薬未投与 MCT ラットの 50%が死亡した時点 (42 日間投与) で試験を終了した。*Log-rank 検定 (MCT+マシテンタン投与群と MCT 群の比較) [モジュール 4.2.1.1.5, Figure 1]。

2.2.3.3 プレオマイシン誘発肺高血圧/肺線維症ラットの右室肥大に対するマシテンタンの作用 (反復経口投与) [モジュール 4.2.1.1.15, 4.2.1.1.9]

プレオマイシン誘発肺高血圧/肺線維症ラットに対するマシテンタン (0.3、3、30 及び 100 mg/kg/日、n=8~12) の作用を検討した[モジュール 4.2.1.1.15]。プレオマイシン (1.5 mg/kg) を単回気管内投与し、18 日後に右室肥大 (RV/LV+S) を評価した。マシテンタンをプレオマイシン投与の前日から 19 日間経口投与すると、用量依存的に右室肥大が抑制され、100 mg/kg/日群で有意差が認められた。マシテンタン 30 及び 100 mg/kg/日群では、コラーゲン沈着のマーカである肺ヒドロキシプロリン含量が有意に抑制された。

プレオマイシン誘発肺高血圧/肺線維症ラットの右室肥大に対するマシテンタン及びボセンタンの作用を比較検討した[モジュール 4.2.1.1.9]。プレオマイシン投与の前日からマシテンタン (100 mg/kg/日) を平均 19.6 日間投与すると右室肥大が有意に抑制されたのに対して、ボセンタン (300 mg/kg/日) を平均 21 日間投与しても抑制作用は認められなかった[図 10]。

図 10 プレオマイシン誘発肺高血圧/肺線維症ラットの右室肥大に対するマシテンタン及びボセンタンの作用 (反復経口投与)



数値は平均値 ± SEM で示した。

マシテンタンは 100 mg/kg を平均 19.6 日間、ボセンタンは 300 mg/kg を平均 21 日間投与した。

RV=右室重量、LV+S=左室重量+心室中隔重量。

** p < 0.01 vs control, # p < 0.05 vs bleomycin + vehicle (ANOVA 及び Neuman-Keuls 検定) [モジュール 4.2.1.1.9]。

3. 副次的薬理試験

選択性 [モジュール 4.2.1.2.1]

他の受容体及び酵素活性への作用を検討するため、63 種類の放射性リガンドとの結合試験を実施した。マシテンタン 10 µM でスクリーニングを行ったところ、ラジオリガンドの結合が 50%以上阻害されるものはなく、マシテンタンはヒト ET_A 及び ET_B 受容体に対して選択的に作用することが明らかになった。

4. 安全性薬理試験

動物の生理学的機能に対するマシテンタンの影響について検討した。薬効量以上の用量のマシテンタンを用いて、*in vitro* 又は *in vivo* 試験を実施した。これらの試験の概要を表 2 に示した[表 2.6.3: 4 項]。マシテンタンは中枢神経系及び呼吸系の生理学的機能に影響を及ぼさなかった。また、マシテンタンは *in vitro* 及び *in vivo* において心臓の再分極に影響しなかった。全体として、マシテンタンは良好な安全性薬理プロファイルを示すことが明らかになった。

表 2 安全性薬理試験の概要

試験の種類 報告書番号 Location in CTD (Module)	GLP 適用	投与 経路	投与期間	試験系又は 動物種／系統	投与量／ 濃度	動物数 及び性別
中枢神経系 Irwin 変法による スクリーニング T-04.051 4.2.1.3.4	適用	経口	単回投与	SpragueDawley ラット	0, 1, 10, 100 mg/kg	雄 6／群
呼吸系 全身プレチスモグラフィー T-04.050 4.2.1.3.3	適用	経口	単回投与	覚醒非拘束 Wistar ラット	0, 1, 10, 100 mg/kg	雄 8／群
心血管系 パッチクランプ法による hERG チャンネル分析 (マシテンタン) T-03.019 4.2.1.3.1	非適用	<i>In vitro</i>	N/A	hERG 発現 CHO 細胞	10 µM	n=3
パッチクランプ法による hERG チャンネル分析 (ACT-132577) T-04.106 4.2.1.3.7	非適用	<i>In vitro</i>	N/A	hERG 発現 HEK293 細胞	1～100 µM	n=3～8
心拍数及び心臓電気生理学 的試験 B-04.032 4.2.1.3.2	非適用	静脈 内	単回投与	麻酔下 モルモット	10 mg/kg	雄 6
血行動態及び 心臓電気生理学的試験 (テレメトリー試験) T-04.060 4.2.1.3.6	適用	経口	単回投与 ×4 (クロス オーバー デザイン)	覚醒ビーグル犬	0, 1, 5, 25 mg/kg	雄 3+ 雌 3

試験の種類 報告書番号 Location in CTD (Module)	GLP 適用	投与 経路	投与期間	試験系又は 動物種／系統	投与量／ 濃度	動物数 及び性別
血行動態及び 心臓電気生理学的試験 (テレメトリー試験) T-07.142 4.2.1.3.5	適用	経口	単回投与	覚醒ビーグル犬	0, 0.1, 0.3, 1, 5, 30 mg/kg	雄 3+ 雌 3

CHO=チャイニーズハムスター卵巣、GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、HEK=ヒト胎児腎、hERG=ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子、N/A=該当せず。

4.1 中枢神経系

4.1.1 Irwin 変法によるスクリーニング試験 [[モジュール 4.2.1.3.4](#)]

ラットを用いた Irwin 変法によるスクリーニング試験を実施し、中枢及び末梢神経系機能を含む一連の主な行動及び生理学的（反射測定）パラメータに対するマシテンタンの影響を検討した。なお、試験は盲検下で実施した。

4 群の Sprague Dawley 雄ラット（各群 6 例）にマシテンタンを 0（溶媒）、1、10 又は 100 mg/kg の用量で単回経口投与した。投与後 24 時間にわたりラットの行動変化を評価したところ、いずれの用量においてもマシテンタンはラットの自発運動、興奮性、感覚運動機能、自律神経機能、神経筋機能及び生理学的機能に影響を及ぼさなかった。また、マシテンタンは体温にも影響を及ぼさなかった。

したがって、マシテンタンはラットの行動及び生理学的神経系機能に対して影響はないことが明らかとなった。

4.2 呼吸系

4.2.1 全身プレチスモグラフィ法による呼吸機能試験 [[モジュール 4.2.1.3.3](#)]

覚醒非拘束下の Wistar 雄ラットを用いて、マシテンタンの呼吸系に対する影響を全身プレチスモグラフィ法により検討した。5 群のラット（各群 8 例）にマシテンタンを 0（溶媒）、1、10、100 mg/kg の用量で単回経口投与し、陽性対照としてモルヒネを 5 mg/kg の用量で腹腔内投与した。呼吸系項目（呼吸数、1 回換気量、分時換気量、吸気時間、呼気時間、最大吸気流量、最大呼気流量、弛緩時間及び Penh）に対する影響を投与 240 分後まで継続的に記録した。いずれの用量においてもマシテンタンは呼吸系項目に影響を及ぼさなかった。陽性対照であるモルヒネは呼吸数を増加させるとともに、吸気時間を著しく短縮させ、また弛緩時間及び最大吸気流量を大きく増大させた。

マシテンタンはラットの呼吸機能に対して影響はないことが明らかとなった。

4.3 心血管系

麻酔下のモルモット及びテレメトリーシステムを装着した覚醒下のビーグル犬を用いて、心臓の再分極に対するマシテンタンの影響を検討した。イヌを用いた試験では、血圧及び HR に対す

る影響も評価した。さらに、*in vitro* hERG チャンネル試験によりマシテンタン及び代謝物 ACT-132577 を評価した。

4.3.1 hERG チャンネル試験 [モジュール 4.2.1.3.1, 4.2.1.3.7]

hERG チャンネルを発現する CHO 細胞を用いて、10 μ M (5880 ng/mL) のマシテンタンの添加前及び添加後において、ホールセルパッチクランプ法によりカリウム電流を測定した[モジュール 4.2.1.3.1]。マシテンタンはカリウム電流を約 18%減少させたが、ウォッシュアウトにより回復した。陽性対照であるテルフェナジンはカリウム電流を完全に阻害し、その IC₅₀ 値は 0.027 μ M であった。

hERG チャンネルを発現する HEK293 細胞を用いて、代謝物 ACT-132577 のカリウム電流に対する影響をパッチクランプ法により測定した[モジュール 4.2.1.3.7]。ACT-132577 は 10 μ M (5460 ng/mL) まで、hERG チャンネルを介するカリウム電流に影響を及ぼさなかった。高濃度の ACT-132577 は内向き電流及び外向き電流の両方をわずかに阻害した (IC₂₀ : 約 18 μ M、IC₅₀ : 約 71 μ M)。

健康な被験者にマシテンタン 10 mg/日の用量を投与したときの 10 日目における C_{max} の平均値は 371 ng/mL (マシテンタン) 及び 802 ng/mL (ACT-132577) であった[モジュール 2.7.2]。マシテンタン及び ACT-132577 の血漿タンパク結合率はそれぞれ 99.6%及び 99.5%であることから、非結合型の C_{max} はマシテンタンで 1.5 ng/mL、ACT-132577 で 4 ng/mL であった。

マシテンタン及び ACT-132577 は、10 μ M の濃度において hERG チャンネルを介するカリウム電流に対する阻害作用は 20%未満であった。この濃度は臨床用量を投与したときのマシテンタン及び ACT-132577 の血漿中非結合型濃度のそれぞれ約 3900 倍及び 1300 倍高いものであった。

4.3.2 モルモットにおける心電図に対する影響 [モジュール 4.2.1.3.2]

麻酔下のモルモットを用いて、ECG 波形間隔及び HR に対するマシテンタンの影響を検討した。ベースライン値を測定した後、モルモットをマシテンタン (10 mg/kg、i.v. bolus 投与、n = 6) 群又は陽性対照ドフェチリド (0.08 mg/kg、i.v. bolus 投与、n = 4) 群に無作為に割付けた。マシテンタンは HR 及び ECG 波形間隔に影響を及ぼさなかった。一方、ドフェチリドは HR を 12%減少させ、QT 間隔を 20%、RR 間隔を 15%、QTc を 12%延長させた。

モルモットにおいてマシテンタンの ECG に対する影響はないことが明らかとなった。

4.3.3 覚醒下のイヌにおける心電図及び動脈圧に対する影響 [モジュール 4.2.1.3.6, 4.2.1.3.5]

テレメトリーシステムを装着した覚醒非拘束下のビーグル犬にマシテンタンを単回経口投与したときの動脈圧、HR、ECG 波形及び体温に対する影響を検討した[モジュール 4.2.1.3.6]。クロスオーバーデザインにより投与と投与の間に 7 日間以上のウォッシュアウト期間を設けて、雌雄各 3 例のイヌにマシテンタンを 1、5 及び 25 mg/kg の用量でカプセル剤として経口投与した。少なくとも投与前 2 時間及び投与後 24 時間にわたり測定値を記録した。マシテンタン (1、5 及び 25 mg/kg) は収縮期血圧、拡張期血圧及び MAP を有意に低下させた。用量に関係なく、投与 3 時間後に、最大 10~16 mmHg の血圧低下が認められた。いずれの用量においても、HR、房室及び心室内伝導速度、RR 及び PR 間隔、並びに QRS 間隔に影響を及ぼさなかった。QT 間隔及び QTc のいずれにも影響を及ぼさないことから、25 mg/kg までのマシテンタンを経口投与しても、心室再分極に対

する影響はないことが明らかとなった。

ビーグル犬を用いて動脈圧、HR 及び ECG 波形に対する低用量マシテンタンの影響を検討した [モジュール 4.2.1.3.5]。クロスオーバーデザインにより投与と投与の間に 7 日間のウォッシュアウト期間を設けて、雌雄各 3 例のイヌにマシテンタンを 0.1、0.3、1.0、5.0 及び 30 mg/kg の用量でカプセル剤として経口投与した。投与前 24 時間及び投与後 48 時間にわたり測定値を記録した。マシテンタンは用量依存的に収縮期血圧、拡張期血圧及び MAP を低下させ、0.3 mg/kg 以上の用量で有意差が認められた。5 及び 30 mg/kg 投与により最大 17 mmHg の MAP 低下が認められた。これらの用量における曝露量はヒトに 10 mg/日を投与したときの曝露量の 9~40 倍であった。1 分間の平均拍動数で表した HR は 5 及び 30 mg/kg 投与時にわずかに増加した。HR を心拍数時間曲線下面積で評価した場合、これらの用量で有意な増加が認められた。いずれの用量においても、心臓伝導時間 (PR、PQ、QT 間隔及び QRS 間隔、並びに QTc) に対する影響は認められなかった。

以上、マシテンタンはイヌにおいて用量依存的に動脈圧を低下させた。また正常血圧ラットにおいては全身血圧に影響を及ぼさなかった。マシテンタンは心室再分極を含む ECG 波形に対して影響しなかった。

5. 薬力学的薬物相互作用

マシテンタンとホスホジエステラーゼ-5 阻害薬の併用

覚醒下の Dahl-S 高血圧ラット及び自然発症高血圧ラットを用いて、マシテンタンとホスホジエステラーゼ-5 阻害薬の併用投与時の急性血行動態作用を検討した。テレメトリーシステムを用いて、マシテンタン 0.3 mg/kg とタダラフィル 10 mg/kg 又はシルデナフィル 30 mg/kg のいずれかを併用経口投与し、72 時間後まで血圧をモニターした。血圧低下作用は同じ動物の投与前後における血圧時間曲線間面積 (ABC) により評価した。併用投与後の ABC は各薬剤を単独投与したときの合計に比べて大きく、血圧低下作用の持続時間が相乗的に延長することが示された [モジュール 4.2.1.4.1]。

6. 考察及び結論

ET が重要な役割を果たしているヒト PAH の動物モデルである MCT 誘発 PH ラット及びブレオマイシン誘発 PH/肺線維症ラット [Miyauchi 1993, Park 1997] においてマシテンタンの有効性が確認された。ヒト ET_A 又は ET_B 受容体を発現する組換え細胞、並びに摘出ラット組織を用いた *in vitro* 試験において、マシテンタンは強力な ET_A 及び ET_B 受容体のデュアルアンタゴニストであることが明らかになっている。ヒト初代培養 PASM C において、マシテンタンは高い受容体結合親和性及び緩徐な受容体解離速度を示した。 *In vivo* で認められるマシテンタンの強い薬理作用は、これらの特徴が寄与していると考えられる。

複数の動物種を用いて、マシテンタンの主要器官の生理学的機能に及ぼす影響を検討したところ、最高用量である 100 mg/kg まで、中枢及び末梢神経系機能を含む一連の主な行動及び生理学的パラメータ、並びに呼吸系の生理学的機能に対する影響は認められなかった。ヒトに臨床用量 (10 mg/日) を投与したときの曝露量 (AUC 値) と比較すると安全マージンは 17 倍以上と推察さ

れた。

マシテンタン及び代謝物 ACT-132577 は、ヒトに臨床用量を投与したときの血漿中非結合型濃度に比べて 1000 倍以上高い 10 μ M の濃度において、hERG チャンネルを介するカリウム電流に対して影響を及ぼさなかった (20%未満の阻害作用)。モルモット及びイヌを用いた *in vivo* 試験において、マシテンタンは心室再分極を含む ECG 波形に影響を及ぼさなかった。イヌにおいてマシテンタンは用量依存的に血圧低下作用を示し、5 及び 30 mg/kg の用量では生理学的代償反応であると考えられるわずかな HR の増加が認められた。これらの用量における曝露量はヒトに 10 mg/日を投与したときの曝露量の 9~40 倍であった。

以上、マシテンタンは ET_A 及び ET_B の両受容体に対して拮抗作用を示し、高血圧症及び PAH モデルにおいて有効性が認められた。また安全性薬理試験において、安全性上の懸念はないことが確認された。

参考文献

- [Cheng 1973] Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973;22:3099-108.
- [Kakusaka 1989] Kakusaka I, Kaneko N, Kiyatake K, et al. [Effects of various doses of monocrotaline administration on the development of pulmonary hypertension and its regression in rats] (article in Japanese; summary, figures, and tables in English). *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1989;27:51-6.
- [Löffler 1993] Löffler BM, Breu V, Clozel M. Effect of different endothelin receptor antagonists and of the novel non-peptide antagonist Ro 46-2005 on endothelin levels in rat plasma. *FEBS Lett* 1993;333:108-10.
- [Meyrick 1980] Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980;239:H692-702.
- [Miyachi 1993] Miyachi T, Yorikane R, Sakai S, et al. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993;73:887-97.
- [Park 1997] Park SH, Saleh D, Giaid A, Michel RP. Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:600-8.
- [Sato 1993] Sato S, Kato S, Arisaka Y, et al. Changes in pulmonary hemodynamics during normoxia and hypoxia in awake rats treated with intratracheal bleomycin. *Tohoku J Exp Med* 1993;169:233-44.
- [Williams 1992] Williams JH, Jr., Bodell P, Hosseini S, et al. Haemodynamic sequelae of pulmonary fibrosis following intratracheal bleomycin in rats. *Cardiovasc Res* 1992;26:401-8.

オプスミット錠 10 mg
(マシテンタン (ACT-064992))

CTD 第 2 部 (モジュール 2) : CTD の概要 (サマリー)

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験概要表

アクテリオンファーマシューティカルズジャパン株式会社

目次

目次.....	2
略号及び頭字語一覧.....	3
1. 薬理試験：一覧表（マシテンタン）（1/3）.....	4
1. 薬理試験：一覧表（ACT-132577）（1/1）.....	7
1. 薬理試験：一覧表（ACT-373898）（1/1）.....	8
2. 効力を裏付ける試験.....	9
3. 副次的薬理試験.....	9
4. 安全性薬理試験（マシテンタン）（1/3）.....	10
4. 安全性薬理試験（ACT-132577）（1/1）.....	13
5. 薬力学的薬物相互作用試験.....	14

略号及び頭字語一覧

CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巢
CNS	Central nervous system	中枢神経系
DOCA	Deoxycorticosterone acetate	酢酸デオキシコルチコステロン
ECG	Electrocardiogram	心電図
ET	Endothelin	エンドセリン
F	Female	雌
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
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	Human ether-a-go-go-related gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
i.v.	Intravenous(ly)	静脈内
IC ₂₀	Concentration causing 20% inhibition	20%阻害濃度
IC ₅₀	Concentration causing 50% inhibition	50%阻害濃度
M	Male	雄
N/A	Not applicable	該当せず
p.o.	per os, oral(ly)	経口

1. 薬理試験：一覧表（マシテンタン） (1/3)

被験物質：マシテンタン

<u>Type of Study</u>	<u>Test System</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Testing Facility</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Primary Pharmacodynamics					
Inhibition of ET-1 binding	Recombinant CHO cells expressing ET _A and ET _B receptors	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-07.246	4.2.1.1.7
Functional inhibition of ET receptors and evaluation of receptor binding mode	Human pulmonary artery smooth muscle cells and CHO-K1 cells	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-12.108	4.2.1.1.10
Inhibition of ET _A and ET _B receptor-mediated contraction	Rat isolated aorta and trachea	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-05.057	4.2.1.1.6
Effect on ET-1 plasma concentration (single dose)	Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-04.030	4.2.1.1.1
Effect on ET-1 plasma concentration (single dose)	Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-04.115	4.2.1.1.4
Effect on systemic blood pressure, pulmonary arterial pressure, and heart rate (single dose)	Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-12.447	4.2.1.1.14
Effect on systemic blood pressure (single and repeated dose)	Hypertensive (Dahl-S and DOCA-salt) rats	p.o.	Actelion, CH	B-04.031	4.2.1.1.2
Effect on systemic blood pressure and heart rate (single dose)	Hypertensive (DOCA-salt) rats	p.o.	Actelion, CH	B-04.114	4.2.1.1.3
Effect on systemic blood pressure and heart rate: combination study with ambrisentan and bosentan (single dose)	Hypertensive (Dahl-S) rats	p.o.	Actelion, CH	B-12.110	4.2.1.1.11
Effect on mean pulmonary arterial pressure and heart rate in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension (single dose)	Monocrotaline-treated Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-12.111	4.2.1.1.12

1. 薬理試験：一覧表（マシテンタン） (2/3)

被験物質：マシテンタン

<u>Type of Study</u>	<u>Test System</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Testing Facility</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Primary Pharmacodynamics continued					
Effect on mean pulmonary arterial pressure in bleomycin-instilled pulmonary hypertensive rats (single dose)	Bleomycin-instilled Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-12.109	4.2.1.1.13
Effects on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat (repeated dose)	Monocrotaline-treated Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-05.023	4.2.1.1.5
Effect on bleomycin-induced pulmonary fibrosis and right ventricular remodeling (repeated dose)	Bleomycin-instilled Wistar rats	p.o.	Actelion, CH	B-08.687	4.2.1.1.15
Effect on bleomycin-induced pulmonary fibrosis and right ventricular remodeling (repeated dose)	Bleomycin-instilled Wistar and Sprague Dawley rats	p.o.	Actelion, CH	B-11.294	4.2.1.1.9
Secondary Pharmacodynamics					
Selectivity for ET receptors (off-target screen)	Panel of radioligand binding assays	<i>In vitro</i>	██████████, US	B-03.044	4.2.1.2.1

1. 薬理試験：一覧表（マシテンタン）（3/3）

被験物質：マシテンタン

<u>Type of Study</u>	<u>Test System</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Testing Facility</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Safety Pharmacology					
Effect on hERG K ⁺ current	Recombinant hERG channels expressed in CHO cells	<i>In vitro</i>	■■■■, GE	T-03.019	4.2.1.3.1
Effect on ECG intervals	Anesthetized guinea pigs	i.v.	Actelion, CH	B-04.032	4.2.1.3.2
Cardiovascular telemetry study ¹⁾	Beagle dogs	p.o. (capsule)	■■■■, FR	T-04.060	4.2.1.3.6
Cardiovascular telemetry study ¹⁾	Beagle dogs	p.o. (capsule)	■■■■, FR	T-07.142	4.2.1.3.5
Irwin profile test ¹⁾	Sprague Dawley rats	p.o.	■■■■, FR	T-04.051	4.2.1.3.4
Respiratory function evaluation by whole body plethysmography ¹⁾	Wistar rats	p.o.	■■■■, FR	T-04.050	4.2.1.3.3
Pharmacodynamic Drug Interactions					
Hemodynamic effects of macitentan in combination with phosphodiesterase 5 inhibitors	Hypertensive (Dahl-S and spontaneously hypertensive) rats	p.o.	Actelion, CH	B-13.105	4.2.1.4.1

1) GLP 適用試験。

略号：CHO = チャイニーズハムスター卵巣、DOCA = 酢酸デオキシコルチコステロン、ECG = 心電図、ET = エンドセリン、hERG = ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子、i.v. = 静脈内、N/A = 該当せず、p.o. = 経口（特に明記しない限り強制経口）。

1. 薬理試験：一覧表 (ACT-132577) (1/1)

被験物質：ACT-132577

<u>Type of Study</u>	<u>Test System</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Testing Facility</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Primary Pharmacodynamics					
Inhibition of ET-1 binding	Recombinant CHO cells expressing ET _A and ET _B receptors	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-07.246	4.2.1.1.7
Functional inhibition of ET receptors and evaluation of receptor binding mode	Human pulmonary artery smooth muscle cells and CHO-K1 cells	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-12.108	4.2.1.1.10
Inhibition of ET _A and ET _B receptor-mediated contraction	Rat isolated aorta and trachea	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-05.057	4.2.1.1.6
Secondary Pharmacodynamics					
N/A					
Safety Pharmacology					
Effect on hERG K ⁺ current	Recombinant hERG channels expressed in HEK293 cells	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	T-04.106	4.2.1.3.7
Pharmacodynamic Drug Interactions					
N/A					

略号：CHO = チャイニーズハムスター卵巣、ET = エンドセリン、HEK = ヒト胎児腎、hERG = ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子、N/A = 該当せず。

1. 薬理試験：一覧表（ACT-373898）（1/1）

被験物質：ACT-373898

<u>Type of Study</u>	<u>Test System</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Testing Facility</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Primary Pharmacodynamics					
Endothelin antagonist activity	Recombinant CHO-K1 cells expressing human ET _A and ET _B receptors	<i>In vitro</i>	Actelion, CH	B-09.286	4.2.1.1.8
Secondary Pharmacodynamics					
N/A					
Safety Pharmacology					
N/A					
Pharmacodynamic Drug Interactions					
N/A					

略号：CHO = チャイニーズハムスター卵巣、ET = エンドセリン、N/A = 該当せず。

2. 効力を裏付ける試験

モジュール 2.6.2 薬理試験の概要文を参照。

3. 副次的薬理試験

モジュール 2.6.2 薬理試験の概要文を参照。

4. 安全性薬理試験（マシテンタン） (1/3)

被験物質：マシテンタン

<u>Organ Systems Evaluated</u>	<u>Species/ Strain</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Doses ¹⁾ (mg/kg)</u>	<u>Gender and No. per Group</u>	<u>Noteworthy Findings</u>	<u>GLP Compliance</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Cardiovascular	hERG channel expressed in CHO cells	In vitro	10 µM	N/A	10 µM の濃度で hERG チャンネルを介するカリウム電流の振幅を 18%減少させた。この影響はウォッシュアウトにより完全に回復した。溶媒対照は振幅を 11%減少させた。	No	T-03.019	4.2.1.3.1
Cardiovascular	GOHI guinea pigs	i.v. bolus	10 mg/kg	6M	ベースラインと比較して心拍数及び ECG 波形への影響は認められなかった。	No	B-04.032	4.2.1.3.2
Cardiovascular	Beagle dogs	p.o. (capsule)	0, 1, 5, 25 mg/kg	3M, 3F	すべての用量において、主として投与 3 時間後から収縮期、拡張期及び平均動脈圧が有意に低下した。投与 3 時間後に最大 10～16 mmHg の血圧低下が認められた。 いずれの用量においても、心拍数、RR 及び PR 間隔、QRS 間隔、並びに QT 間隔及び QTc への影響は認められなかった。	Yes	T-04.060	4.2.1.3.6

4.安全性薬理試験（マシテンタン） (2/3)

被験物質：マシテンタン

<u>Organ Systems Evaluated</u>	<u>Species/ Strain</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Doses ¹⁾ (mg/kg)</u>	<u>Gender and No. per Group</u>	<u>Noteworthy Findings</u>	<u>GLP Compli.</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Cardiovascular	Beagle dogs	p.o. (capsule)	0, 0.1, 0.3, 1, 5, 30 mg/kg	3M, 3F	<p>用量依存的に収縮期、拡張期及び平均動脈圧が低下した。平均動脈圧の低下は 0.3 mg/kg 以上の用量で有意差が認められた。5 及び 30 mg/kg 投与により最大 17 mmHg の平均動脈圧低下が認められた。</p> <p>1 分間の平均拍動数で表した心拍数は、5 及び 30 mg/kg 投与時にわずかに増加した。心拍数を心拍数時間曲線下面積で評価した場合、これらの用量で有意な増加が認められた。</p> <p>いずれの用量においても心臓伝導時間（PR、PQ、QT、QRS 間隔及び QTc）への影響は認められなかった。</p>	Yes	T-07.142	4.2.1.3.5
CNS	Sprague Dawley rats	p.o.	0, 1, 10, 100 mg/kg	6M	<p>Irwin 変法試験において、自発運動、興奮性、感覚運動機能、自律神経機能、神経筋機能及び生理学的機能に明らかな影響は認められなかった。</p> <p>体温及び体重増加量への影響は認められなかった。</p>	Yes	T-04.051	4.2.1.3.4

4.安全性薬理試験（マシテンタン） (3/3)

被験物質：マシテンタン

<u>Organ Systems Evaluated</u>	<u>Species/ Strain</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Doses ¹⁾ (mg/kg)</u>	<u>Gender and No. per Group</u>	<u>Noteworthy Findings</u>	<u>GLP Compliance</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Respiratory	Wistar rats	p.o.	0, 1, 10, 100 mg/kg	8M	呼吸系パラメータ（呼吸数、1回換気量、分時換気量、吸気時間、呼気時間、最大吸気流量、最大呼気流量、弛緩時間及びPenh）への影響は認められなかった。	Yes	T-04.050	4.2.1.3.3

1) 特に明記しない限り単回投与

略号：CHO = チャイニーズハムスター卵巣、CNS = 中枢神経系、F = 雌、hERG = ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子、i.v. = 静脈内、M = 雄、N/A = 該当せず、Penh = enhanced pause（気管支収縮量）、p.o. = 経口（特に明記しない限り強制経口）。

4. 安全性薬理試験（ACT-132577）（1/1）

被験物質：ACT-132577

<u>Organ Systems Evaluated</u>	<u>Species/ Strain</u>	<u>Method of Admin.</u>	<u>Doses (mg/kg)</u>	<u>Gender and No. per Group</u>	<u>Noteworthy Findings</u>	<u>GLP Compliance</u>	<u>Report No.</u>	<u>Location in CTD (Module)</u>
Cardiovascular	hERG channel expressed in HEK 293 cells	In vitro	1-100 μ M	N/A	IC ₂₀ ~ 18 μ M IC ₅₀ ~ 71 μ M	No	T-04.106	4.2.1.3.7

略号：HEK = ヒト胎児腎、hERG = ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子、IC₂₀ = 20%阻害濃度、IC₅₀ = 50%阻害濃度、N/A = 該当せず。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

モジュール 2.6.2 薬理試験の概要文を参照。