目次

2.4 非臨床試験の概括評価 5
2.4.1 非臨床試験計画概略 5
2.4.1.1 動物種の選択 5
2.4.1.2 効力を裏付ける試験 6
2.4.1.3 副次的及び安全性薬理試験 6
2.4.1.4 薬物動態 6
2.4.1.5 毒性 6
2.4.1.6 非臨床試験用製剤 7
2.4.1.7 不純物試験 7
2.4.2 薬理試験 8
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 8
2.4.2.1.1 正常動物における有効性 8
2.4.2.1.2 貧血モデルにおける有効性 9
2.4.2.2 副次的薬理試験 10
2.4.2.3 安全性薬理試験 10
2.4.3 薬物動態試験 12
2.4.3.1 吸収及び薬物動態 12
2.4.3.2 分布及び蛋白結合 12
2.4.3.3 代謝 13
2.4.3.3.1 動物種間の血漿中代謝物の比較 13
2.4.3.4 排泄 13
2.4.4 毒性試験 14
2.4.5 総括及び結論 17
2.4.5.1 主な薬理作用 17
2.4.5.2 標的臓器 19
2.4.5.2.1 造血系 20
2.4.5.2.2 心血管系／心臓 21
2.4.5.2.3 肝臓 23
2.4.5.2.4 腎臓系／腎臓 23
2.4.5.2.5 中枢神経系／脳 24

2.4.5.2.6 呼吸器系／肺 24
2.4.5.2.7 消化器系 25
2.4.5.2.8 その他の影響：コレステロール及びトリグリセリド 25
2.4.5.3 遺伝毒性及びがん原性 26
2.4.5.4 生殖発生毒性 26
2.4.5.5 幼若ラット試験 27
2.4.5.6 曝露量 27
2.4.5.6.1 正常及び疾患モデル動物における有効量での曝露量 27
2.4.5.6.2 毒性試験における NOAEL での曝露量 28
2.4.5.6.3 日本人透析患者に対する曝露マージン及び安全域 29
2.4.5.7 安全性プロファイル 30
2.4.6 参考文献一覧 31

表

表 2.4- 1 平均遊離画分 27
表 2.4- 2 薬理学的活性用量での総未変化体濃度及び遊離未変化体濃度 28
表 2.4- 3 ヒト臨床における薬理学的活性用量での総未変化体濃度及び遊離未変化体濃度 28
表 2.4- 4 反復投与毒性試験における NOAEL での曝露量：総未変化体及び非結合体 29
表 2.4- 5 がん原性及び生殖発生毒性試験における NOAEL での曝露量：総未変化体及び非結合体 29
表 2.4- 6 MRHD である 300 mg 投与での日本人透析患者に対する，主要毒性試験に基づく安全域 30

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
ADME	吸収，分布，代謝及び排泄
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	濃度 - 時間曲線下面積
AV	房室
BP	血圧
CCK_A	コレシストキニン A
CD-1	CD-1(ICR)
CKD	慢性腎臓病
C_{max}	最高濃度
CMC	カルボキシメチルセルロース
CNS	中枢神経系
CP4H	コラーゲンプロリル 4-ヒドロキシラーゼ
CV	心血管
DA	ドパミン
Dcytb	十二指腸シトクロム b
DMOG	ジメチルオキサリルグリシン
DMT1	二価金属トランスポーター1
EFD	胚・胎児発生
EPO	エリスロポエチン
ESA	赤血球造血刺激因子製剤
FIH	HIF 阻害因子
F344	Fischer 344
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
Hb	ヘモグロビン量
Hct	ヘマトクリット値
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HIF	低酸素誘導因子
HIF-PH	HIF-プロリン水酸化酵素
HMGCR	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 還元酵素
HR	心拍数
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
ICR	Institute for Cancer Research
IL-1β	インターロイキン 1β
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
LOEL	最小影響量
MCH	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	平均赤血球容積
MET1	ロキサデュスタット代謝物 : 4-*O*-β-グルクロン酸抱合体, FG-10579, M12, MP4，Peak 3，H1
MET2	ロキサデュスタット代謝物 : 4-*O*-β-グルコース抱合体，FG-12442，M11, MP3，Peak 2，H5
MET3	ロキサデュスタット代謝物 : 4'-水酸化体の硫酸抱合体，FG-10949，MP6,

略語及び用語	定義
	Peak 7，H4
MRHD	最大ヒト推奨量
MTD	最大耐量
NE	ノルエピネフリン
NOAEL	無毒性量
NZW	ニュージーランドホワイト
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PG-PS	ペプチドグリカン-多糖
PHD	プロリン水酸化酵素ドメイン
PK	薬物動態
PPN	出生前及び出生後の発生
PS-80	ポリソルベート 80（Tween 80）
PT	プロトロンビン時間
QTc	補正 QT
RBC	赤血球数
rhEPO	遺伝子組換えヒトエリスロポエチン
SD	Sprague Dawley
$t_{1/2}$	消失半減期
TIBC	総鉄結合能
TIW	週 3 回
TK	トキシコキネティクス
t_{max}	最高濃度到達時間
TNF-α	腫瘍壊死因子 α
TRα/β	甲状腺ホルモン受容体 α 又は β
UIBC	不飽和鉄結合能
VEGF	血管内皮増殖因子
VHL	フォン・ヒッペル-リンドウ
WBC	白血球数

2.4　非臨床試験の概括評価

ロキサデュスタットは，低酸素誘導因子（HIF）の調節酵素である HIF-プロリン水酸化酵素（HIF-PH）を阻害する。それにより，転写因子である HIF-α 蛋白の分解が抑制されて HIF-α が蓄積し，HIF 経路を活性化させる。その結果，生体が低酸素状態に暴露された際に生じる赤血球造血反応［Maxwell, 2016］と同様に，正常酸素状態でも赤血球造血が刺激される。想定する効能・効果は腎性貧血である。ロキサデュスタットは HIF-PH の 3 つのアイソフォームを阻害し，それにより HIF-α を蓄積させる。HIF-α の別の調節因子である HIF 阻害因子（FIH）に対しては，ロキサデュスタットによる作用が弱いことから，低酸素状態と関連がある HIF-α 応答のうち，ロキサデュスタットはその一部のみを活性化すると考えられる。HIF-α のプロリン残基は HIF-PH による酸素依存性水酸化を受ける。水酸化された HIF-α は，プロテアソームにより速やかに分解される。HIF-PH は酸素を補酵素として用いるため，酸素濃度が低下すると HIF-PH は活性化されず，HIF-α が蓄積される。その HIF-α が核内に蓄積し，転写活性が亢進される。それにより，エリスロポエチン（EPO）産生が亢進するとともに鉄利用に関係する遺伝子発現が直接調節され，赤血球造血が促進される。これらは，低酸素状態で酸素供給を増加させ，体調を維持するための適応反応であり，HIF 経路に関連する遺伝子発現の変化が含まれる。このように，HIF-PH 反応は，生体が酸素レベルの変化に適応するために必要な主要機序である［Kaelin & Ratcliffe, 2008; Fong & Takeda, 2008; Wong et al, 2013; Bunn, 2013］。慢性腎臓病（CKD）の貧血患者に対するロキサデュスタット間歇経口投与の妥当性を裏付けるために非臨床試験を実施した。

2.4.1　非臨床試験計画概略

CKD の貧血患者におけるロキサデュスタット経口投与の妥当性を裏付けるため，非臨床試験において，動物にロキサデュスタットを経口投与し，薬理作用，薬物動態（PK）及び毒性を検討した。薬理試験の結果，週 3 回（TIW）投与では赤血球生成を効果的に増加させることが確認された（2.6.2.2.5 ラットにおける間歇経口投与後の赤血球生成）。また，主要な in vivo 毒性試験は，TIW 投与での影響を調べることにより，臨床で TIW 投与する妥当性を裏付けることも目的とした。TIW 以外の投与スケジュールを用いた場合は本文書中に記載した。蛋白及び細胞レベルでの作用を評価するため，適宜，in vitro 試験も実施した。

2.4.1.1　動物種の選択

ロキサデュスタットの in vivo 安全性評価に用いた動物種は，薬力学的応答性，代謝物プロファイル（2.6.4.5 代謝）及び医薬品の非臨床安全性試験に適切な種として規制当局に認められていることに基づいて選択した。正常マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザル並びにげっ歯類貧血モデルを用いた試験においてロキサデュスタットの薬理活性及び有効性が示された（2.6.2.2 効力を裏付ける試験，2.6.6.3 反復投与毒性試験，及び 2.6.6.6.2.4 NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験）。In vivo 安全性評価には，これらの動物種を用いていることから，動物種の選択は妥当

であると考えられる。さらに，ロキサデュスタットの代謝試験の結果から，ラット及びカニクイザルが非臨床安全性を評価する上で適切な動物種であることが示されている。

2.4.1.2　効力を裏付ける試験

ロキサデュスタットの赤血球生成促進作用を in vitro 及びマウス，ラットの薬理試験，また，マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルの毒性試験において評価した。使用した動物種では，HIF-PH が不十分な酸素量を感知する酵素であることが知られているため，ロキサデュスタットの薬理作用の評価に用いることは適切である［Kaelin & Ratcliffe, 2008; Fong & Takeda, 2008; Bunn, 2013］。実際に，マウスの HIF-PH の遺伝子欠損［Takeda et al, 2008］，又は薬理学的阻害［Flamme et al, 2014; Barrett et al, 2011; Barrett et al, 2015; Jain et al, 2016］により，貧血の指標である血中ヘモグロビン量（Hb）が増加することが既に報告されている。

ロキサデュスタットの想定している効能・効果は腎性貧血である。このため，正常マウス，ラット及びカニクイザルにおいてロキサデュスタットの血液学的効果を検討するとともに，貧血モデルであるペプチドグリカン-多糖（PG-PS）誘発炎症性貧血ラット及び 5/6 腎摘慢性腎不全ラットにおいても本薬の有効性を確認した。

2.4.1.3　副次的及び安全性薬理試験

副次的薬理試験として，非臨床毒性試験及び臨床試験の結果の解釈に用いられる可能性のある，赤血球生成とは関連のないオフターゲット作用を評価した。各種受容体及び酵素群に対して評価を行った。また，代謝変化（耐糖能改善及び血清コレステロール低下）の機序を検討する試験を実施した。

安全性薬理試験として，心血管（CV）系，中枢神経系，呼吸系及び腎臓に対する安全性並びに in vitro ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネルを介するカリウム電流（hERG 電流）阻害試験を医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）で実施した。また，CV 系に対するロキサデュスタットの作用をさらに明らかにするため，ラット 28 日間反復投与 CV 試験（GLP 試験）及び複数の補足的安全性薬理試験（6 試験，非 GLP 試験）を実施した。

2.4.1.4　薬物動態

ロキサデュスタットの吸収，分布，代謝及び排泄（ADME）特性を明らかにするため，マウス，ラット，ウサギ，カニクイザル及びヒトを用いた一連の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。これらの試験では，非臨床薬理試験及び毒性試験に用いた動物種を使用した。In vivo 試験の投与経路は，薬理試験，毒性試験及び臨床試験と同じである経口投与を主体とし，一部試験においては静脈内投与を用いた。

2.4.1.5　毒性

毒性プログラムは，医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドラインを含む適切なガイドライン／ガイダンスの下で実施され，主要な試験は全て GLP に従って実施された。ラット及びウサギを

用いた胚・胎児発生（EFD）に関する試験並びに幼若ラットを用いた単回及び反復投与試験の用量設定試験は，マウスを用いた反復投与試験の追加試験及び一連のマウス腫瘍試験とともに，非GLP 試験として実施された。GLP 適合性を含む毒性試験の概要を表 2.6.6-1 に示す。

毒性試験として，ラット及びカニクイザルを用いた単回経口投与試験（カニクイザルは静脈内投与も含む），ラット及びカニクイザルを用いた 1 日 1 回経口投与による反復投与試験（4 週間）並びにマウス（13 週間），ラット（26 週間）及びカニクイザル（22 及び 52 週間）を用いた TIW 経口投与による反復投与試験を実施した。ロキサデュスタットの遺伝毒性試験として，in vitro での復帰突然変異試験及び染色体異常試験並びに in vivo でのマウス小核試験を実施した。生殖発生毒性試験としては，ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験，ラット及びウサギを用いた EFD に関する試験並びにラットを用いた出生前及び出生後の発生（PPN）に関する試験及び乳母哺育試験を実施した。がん原性試験はマウス及びラットを用いた 104 週試験を実施した。その他の毒性試験としては，光毒性試験及び FG-6484（ロキサデュスタットの光分解産物）の復帰突然変異試験に加え，腫瘍進行及び転移形成傾向に対するロキサデュスタットの潜在的な作用を検討するため，一連のマウス腫瘍モデル試験を実施した。さらに，小児を対象とする今後の開発のため，幼若ラットを用いた用量設定試験も実施した。

ラット及びカニクイザルでの 4 週間反復投与毒性試験では 1 日 1 回投与した。1 カ月を超えるその後の反復投与毒性試験，がん原性試験，雌雄ラットを用いた受胎能試験及び幼若ラットを用いた試験では，臨床投与用法に従い投与は TIW とした。また，EFD，PPN 及び乳母哺育試験では，ラット及びウサギの極めて急速な発生過程の期間にロキサデュスタットが十分に曝露されるように 1 日 1 回投与とした。

2.4.1.6　非臨床試験用製剤

非臨床 in vivo 薬理及び毒性試験では，特に記載のない限り，個々の試験報告書に記載する通り，標準的な媒体であるカルボキシメチルセルロース（CMC）及びポリソルベート 80（PS-80）を含む脱イオン水中の水性懸濁液として，ロキサデュスタットを経口投与した。静脈内投与においては，特に記載のない限り，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液としてロキサデュスタットを投与した。

2.4.1.7　不純物試験

ロキサデュスタットの各バッチの不純物プロファイルは動物及びヒト試験を通じて同等であった（2.6.7 毒性試験概要表，表 2.6.7.4）。また，市販用バッチにおける不純物は，非臨床安全性試験において適切に評価されている。

FG-6484 はロキサデュスタットの光分解物であり，コンピュータシステム DEREK でこの光分解物に変異原性があることが同定されたため，FG-6484 を復帰突然変異試験で評価した。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

ロキサデュスタットは，HIF-PH の 3 つのアイソフォームであるプロリン水酸化酵素（PHD）1，PHD2，PHD3，及びコラーゲンプロリル 4-ヒドロキシラーゼ（CP4H）を競合的に阻害し，50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 1.8，2.5，0.19 及び 0.2 µmol/L であった（40 µmol/L Fe^{2+}存在下）。FIH に対する IC_{50} は 1 µmol/L Fe^{2+}存在下で 130 µmol/L であった（2.6.2.2.1 in vitro 酵素阻害）。

ロキサデュスタットは細胞内の HIF-2α の蓄積を誘導した。これは本薬による HIF-PH の阻害によるものと考えられる。ロキサデュスタットは細胞上清中の EPO 濃度も増加させたことから，細胞内での産生及び分泌を誘導することが示された（2.6.2.2.2 in vitro HIF-α 蓄積及び EPO 産生誘導）。また，CKD 患者で高値であり，EPO 産生を抑制することが知られている炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子 α（TNF-α）及びインターロイキン 1β（IL-1β）[Yilmaz et al, 2011, MacDougall & Cooper, 2005] の存在下でも，ロキサデュスタットは EPO 濃度を増加させることが示された。

2.4.2.1.1　正常動物における有効性

正常マウスを用いた試験において，ロキサデュスタット 6～60 mg/kg を単回経口投与すると血漿中 EPO 濃度が増加したことから（2.6.2.2.3 マウスにおける単回経口投与後の EPO 産生），ロキサデュスタットは in vivo でも HIF-α の蓄積に伴うと思われる EPO の発現亢進に効果があることが示された。また，正常マウスにロキサデュスタット 6～200 mg/kg を 1 週間 TIW 経口投与したところ，用量増に応じて Hb，ヘマトクリット値（Hct）及び赤血球数（RBC）が増加したことから，赤血球生成の亢進も示された。Hb の増加が統計学的に有意である最小用量は 6 mg/kg であった（2.6.2.2.4 マウスにおける間歇経口投与後の赤血球生成）。同様に，正常ラットにロキサデュスタット（30 又は 60 mg/kg）を 4 週間 TIW 経口投与すると，用量に応じた Hb 及び Hct の増加が認められ，赤血球生成作用が認められた（2.6.2.2.5 ラットにおける間歇経口投与後の赤血球生成）。正常ラットへの投与回数が週 1 回でも，同じ用量（30 及び 60 mg/kg）で Hb 及び Hct が有意に増加した。ロキサデュスタットの Hb 及び Hct の増加作用は，週 1 回投与よりも TIW 投与の方が大きかった（2.6.2.2.5 ラットにおける間歇経口投与後の赤血球生成）。

カニクイザルの試験では，ロキサデュスタット 3～100 mg/kg を単回投与すると，血漿中 EPO 濃度が増加した（2.6.6.2.2 カニクイザル単回投与試験（経口及び静脈内投与））。30 又は 40 mg/kg を 22 週間に亘って TIW 投与したところ Hct（2.6.6 毒性試験の概要文，表 2.6.6-27）及び血中 Hb（2.6.7 毒性試験概要表，表 2.6.7.7.7）の定常的な増加がみられた。カニクイザル毒性試験の結果，30 mg/kg を 4 週間 TIW 投与しても，1 日 1 回投与スケジュールと同程度に赤血球生成（Hct）が促進された。また，4 週間 TIW 投与した動物の週当たりの曝露量は 1 日 1 回投与スケジュールの動物よりも有意に低かった（2.6.7 毒性試験概要表，表 2.6.7.7.6）（2.6.6 毒性試験の概要文，表 2.6.6-27）。

以上，ロキサデュスタットをマウス，ラット及びカニクイザルに投与すると，in vitro で示された HIF 経路の活性化に由来すると思われる，血漿中 EPO 濃度の増加が確認され，さらには，赤血

球生成が亢進した。これらの試験では，検討した用量のうちでの最小有効量はマウスが 6 mg/kg，ラットが 30 mg/kg，カニクイザルが 30 mg/kg であった。ただし，最小有効量については，各動物種で詳細な検討がなされたわけではなく，検討した用量より低い可能性もある。また，カニクイザルへのロキサデュスタットの長期間歇投与で血中 Hb の増加が数週間にわたって認められたことから，長期間でも過度の薬理作用を誘発することなく，赤血球生成の亢進が維持されると考えらえる。

2.4.2.1.2　貧血モデルにおける有効性

5/6 腎摘ラットを用いて，ロキサデュスタットが慢性腎不全に伴う貧血に及ぼす影響を検討した。5/6 腎摘ラットモデルは，慢性腎不全及び本モデルで生じる貧血などの合併症の研究に広く用いられている［Garrido et al, 2015; de Mik et al, 2013; Ribeiro et al, 2016］。本モデルで生じる鉄代謝異常，炎症，脂質異常及び高コレステロール血症などは，ヒト CKD にみられる合併症と類似している。また，本モデルは赤血球造血刺激因子製剤（ESA）に感受性が低いことが知られている［Vaziri & Liang, 1997; Bellizi et al, 1998］が，遺伝子組換えヒト EPO（rhEPO）など現行の CKD 貧血治療薬［Garrido et al, 2016; Bellizzi et al, 1998; Ribeiro et al, 2016］及び臨床開発中の HIF-PH 阻害薬［Flamme et al, 2014; Jain et al, 2016］の赤血球生成効果を評価するために用いられている。本モデルにロキサデュスタット 20 及び 40 mg/kg を 2 週間に 5 回投与したところ，Hb，Hct 及び RBC は対照溶媒群と比較して有意に増加したことから，腎摘出に伴う貧血が用量依存的に改善されることが示された（2.6.2.2.7 腎性貧血モデルラットにおける有効性）。

鉄代謝機能障害におけるロキサデュスタットの赤血球生成効果の特徴をさらに明らかにするため，免疫原性を有する細菌細胞壁である PG-PS を腹腔内投与することにより，ラット炎症誘発性貧血モデルを作製した。PG-PS 誘発性貧血は，赤血球が小球性で寿命が短い，血清中鉄及びトランスフェリン濃度が低い，細網内皮系の鉄の蓄積は正常又は多い，EPO 産生が鈍い，赤血球生成が阻害されているという特徴があり，ヒト慢性疾患貧血と類似している［Sartor et al, 1989; Coccia et al, 2001］。CKD は炎症性の病態でもあり，炎症による機能性鉄欠乏は CKD 患者における貧血の重要な因子であることが示唆されている［MacDougall & Cooper, 2005; Adamson, 2009; Yilmaz et al, 2011］。以上のことから，PG-PS 炎症性貧血モデルを用いることで，CKD 貧血における有効性が予測できると考えられる［Coccia et al, 2001］。また，本モデルは，他の HIF-PH 阻害薬の有効性評価にも用いられており［Flamme et al, 2014; Barrett et al, 2011; Barrett et al, 2015］，その結果から，本モデルにおいても HIF が EPO 産生及び鉄代謝に関与すると考えられる［Haase 2010; Anderson et al, 2011］。本モデルに，ロキサデュスタット 40 mg/kg を 2 週間又は 30 mg/kg を 4 週間 TIW 投与したところ，Hb，平均赤血球容積（MCV）及び平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）が増加した。その際，ロキサデュスタットによって，肝臓中のヘプシジン mRNA の発現が低下した。また，30 mg/kg の 4 週間 TIW 投与では，血清中鉄濃度が改善し，鉄還元酵素である十二指腸シトクロム b（Dcytb）及び鉄トランスポーターである二価金属トランスポーター1（DMT1）の mRNA 発現が増加した（2.6.2.2.6.1 2 週間投与，及び 2.6.2.2.6.2 4 週間投与）。

2.4.2.2　副次的薬理試験

末梢及び中枢の薬物標的に対するロキサデュスタット（10 μmol/L）の親和性及び活性を検討した。ロキサデュスタットはコレシストキニン A（CCK_A）受容体，及びノルエピネフリン（NE）及びドパミン（DA）トランスポーターに対して弱い親和性（IC_{50}：それぞれ 9.9, 15 及び 18 μmol/L）を示したが，それ以外の標的に対しては，ほとんど又は全く親和性を示さなかった。甲状腺ホルモン受容体 β（TRβ）に対して弱いながらアゴニスト活性（EC_{50}：0.2 μmol/L）があったが，ロキサデュスタットの非臨床安全性評価において TRβ 活性化と関連する所見は認められていない。全体として，副次的薬理プロファイルから，患者に対する明らかなリスクは認められなかった（2.6.2.3.1 受容体結合/酵素アッセイ）。

ラット及びサルの毒性試験において，ロキサデュスタットの反復経口投与により血糖値の低下が確認された（ラット：2.6.6.3.5 F344 ラットを用いた 26 週間間歇投与試験；サル：2.6.6.3.7 カニクイザルを用いた 4 週間連日投与試験，及び 2.6.6.3.8 カニクイザルを用いた 22 週間間歇投与試験）。ラットにロキサデュスタットを 12.5，25 及び 50 mg/kg の用量で 15 日間 TIW 投与した後，経口糖負荷試験を実施した。グルコース負荷後の血糖値上昇は 12.5，25 及び 50 mg/kg の用量群で抑制され，また，血漿中インスリンの上昇は 25 及び 50 mg/kg で亢進した（2.6.2.3.2 ラットの耐糖能に対する作用）。

ラット及びカニクイザル毒性試験において，血中コレステロール値の減少が認められた（ラット：2.6.6.3.5 F344 ラットを用いた 26 週間間歇投与試験，サル：2.6.6.3.7 カニクイザルを用いた 4 週間連日投与試験，2.6.6.3.8 カニクイザルを用いたにおける 22 週間間歇投与試験，及び 2.6.6.3.9 カニクイザルを用いた 52 週間間歇投与試験）。副次的薬理試験として，ロキサデュスタット 15，30（反復）又は 60 mg/kg（単回）をラットに投与したところ，空腹時血清総コレステロール，高比重リポ蛋白コレステロール及び低比重リポ蛋白コレステロールが低下し，血清トリグリセリドが増加した（2.6.2.3.3.1　ラットのコレステロール及びトリグリセリド値に及ぼす影響）。In vitro 試験では，ロキサデュスタットは，3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 還元酵素（HMGCR）の活性を直接的には阻害しないものの，HMGCR 蛋白濃度を低下させ，また HIF 依存的な Insig-2 mRNA 発現を増加させた。したがって, Insig-2 を介した HMGCR 蛋白の減少が, ロキサデュスタットによる血中コレステロール低下作用に関与すると考えられた（2.6.2.3.3.2 コレステロール低下作用の作用機序）。

2.4.2.3　安全性薬理試験

In vitro hERG チャネルにおいて, ロキサデュスタット 93 μmol/L の hERG 電流阻害率は 17%で，臨床用量において再分極異常又は QT 延長を生じる可能性は低いことが示された（2.6.2.4.1 in vitro hERG チャネル阻害）。

CV 系に対する評価では，カニクイザルにロキサデュスタット 100 mg/kg を単回経口投与したところ，心拍数（HR）が投与後 12 時間に対照群と比較し 55%（最大値）増加したが，30 mg/kg 以下の用量では HR の増加は認められなかった（2.6.2.4.2 カニクイザルにおける心血管系への影響）。

覚醒ラットにロキサデュスタットを静脈内ボーラス投与（30 及び 60 mg/kg）（2.6.2.4.3 静脈内投与後の覚醒ラットにおける血圧及び心拍数への影響）又は強制経口投与（30 及び 60 mg/kg）（2.6.2.4.4 経口投与後の覚醒ラットにおける血圧及び心拍数への影響）すると，HR が増加し，それと同時に血圧（BP）が低下した。β_1-アドレナリン受容体拮抗薬であるメトプロロールを併用投与することにより，HR 増加に β_1-アドレナリン受容体の関与が認められたが，ロキサデュスタットによる BP 低下にメトプロロールの影響は認められなかった（2.6.2.4.5 覚醒ラットにおけるロキサデュスタット誘発の心拍数増加に対するアドレナリン受容体遮断の影響）。麻酔ラットの心機能に対する影響を評価した試験では，ロキサデュスタット 60 mg/kg を経口投与すると，血管拡張に対する反射応答と一致した CV 系の変化（HR，一回拍出量及び拡張末期容積の増加，BP 及び総末梢血管抵抗の減少など）が認められた（2.6.2.4.6 麻酔ラットにおける心機能への影響）。ラット摘出心灌流標本試験（ランゲンドルフ試験）では，ロキサデュスタットは冠動脈圧及び冠動脈抵抗を減少させたが，10 µg/mL（ラットへの 20 mg/kg 経口投与で遊離形ロキサデュスタット 1.7 µg/mL（表 2.4- 2））まで，HR 又は心収縮力に対する直接的な心作用は認められなかった（2.6.2.4.7 摘出心モデルにおける影響）。ラット局所血行動態に対する作用を検討した in vivo 試験では，覚醒ラットに 30 mg/kg を静脈内投与すると，HR の急速な増加及び二相性の BP 応答が認められ，平均 BP は投与初期に一過性の上昇を示した後，持続的に低下した（2.6.2.4.8 覚醒ラットにおける心血管系及び局所血行動態への影響）。これらの BP 及び HR に対する作用は，投与初期の短期的な血流量の減少を伴っており，その後，より持続的な腎動脈，腸間膜動脈及び後肢血管床の血流量増加が認められた。ラットに TIW28 日間投与した CV 試験では，20 又は 40 mg/kg の初回投与後に生じた HR の増加は，投与 15 及び 26 日に減弱した。40 mg/kg 投与では BP の低下も認められたが，この変化は一定でなく，初日と投与 26 日は同程度の有意な低下であったが，投与 15 日には認められなかった（2.6.2.4.9 反復投与後の覚醒ラットにおける心拍数及び血圧への影響）。

覚醒ラットにロキサデュスタット 300 mg/kg までの単回強制経口投与では，投与後 24 時間まで，中枢神経系（CNS）に関連した項目及び体温に対する影響は認められなかった（2.6.2.4.10 ラットにおける中枢神経系への影響）。

麻酔ラットにロキサデュスタット 100 mg/kg までの単回静脈内投与では，投与後 30 分までに呼吸数は 30 mg/kg 以上の雌雄で増加した。分時換気量は 30 mg/kg 以上の雌及び 100 mg/kg の雄で増加した。一回換気量は 100 mg/kg の雄のみで増加した（2.6.2.4.11 ラットにおける呼吸系への影響）。

覚醒ラットを用いた腎機能試験では，ロキサデュスタット（30，100 又は 300 mg/kg）の経口投与により，尿量は 30 mg/kg 以上の雌雄で増加し，尿 pH は 30 mg/kg 以上の雌及び 100 mg/kg 以上の雄で増加した。尿中 K^+濃度は 100 mg/kg 以上の雌雄で増加し，K^+排泄量は 30 mg/kg 以上の雌及び 100 mg/kg 以上の雄で増加した。尿中 Na^+及び Cl^-排泄量は 30 mg/kg 以上の雄, 30 及び 100 mg/kg の雌で増加した（2.6.2.4.12 ラットにおける腎機能への影響）。

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　吸収及び薬物動態

ロキサデュスタットは，経口投与後速やかに吸収され，ラット（86%～100%）及びカニクイザル(40%～83%)における絶対バイオアベイラビリティは高かった(2.6.4.3.2 ラットへのロキサデュスタットの単回静脈内及び経口投与及び2.6.4.3.5 カニクイザルへのロキサデュスタットの単回静脈内及び経口投与)。

マウス，ラット及びカニクイザルにTIW反復経口投与したときのトキシコキネティクス（TK）試験では，ロキサデュスタットは速やかに吸収され，反復投与による顕著な薬物の蓄積や消失半減期（$t_{1/2}$）の変動は認められなかった。概して，げっ歯類のTK試験ではほぼ用量に比例した曝露量の増加が認められたが，カニクイザルでは用量比を上回る曝露量の増加が認められた。マウス，ラット及びカニクイザルにおいて，曝露量に明らかな性差は認められなかった（2.6.4.3.6 マウスへのロキサデュスタットの反復経口投与，2.6.4.3.7 ラットへのロキサデュスタットの反復経口投与及び2.6.4.3.8 カニクイザルへのロキサデュスタットの反復経口投与)。

2.4.3.2　分布及び蛋白結合

ラット及びカニクイザルにおける定常状態での分布容積は血漿量より大きく，血漿外コンパートメントへの分布が示唆された（2.6.4.3.2 ラットへのロキサデュスタットの単回静脈内及び経口投与及び2.6.4.3.5 カニクイザルへのロキサデュスタットの単回静脈内及び経口投与)。

有色ラットに^{14}C-ロキサデュスタットを単回経口投与したとき，放射能濃度はほとんどの組織で投与後1時間に最高濃度（C_{max}）に達した。消化管を除き，放射能のC_{max}が高値であった組織は，腎皮質，腎臓，肝臓，腎髄質及び肺であった（2.6.4.4.1 有色ラットへの^{14}C-ロキサデュスタットの単回経口投与後の組織中放射能濃度)。

PPN試験の一環として，ロキサデュスタットを雌性Sprague Dawley（SD）ラットに妊娠7日から20日まで1日1回反復投与（5，10及び20 mg/kg/日）し，胎盤通過性を評価した。検討した全ての用量において，妊娠20日の胎児の血漿中からロキサデュスタットが検出され，ロキサデュスタットは胎盤を介して胎児に移行することが明らかになった（2.6.4.4.2 胎盤通過性)。

2～400 µg/mLの範囲における^{14}C-ロキサデュスタットのin vitro血漿蛋白結合率は，マウスで90.12%～94.51%，ラットで95.17%～98.60%，モルモットで92.41%～97.61%，ウサギで97.06%～98.57%，カニクイザルで98.08%～98.70%であり，2～40 µg/mLの範囲におけるヒトのin vitro血漿蛋白結合率は98.95%～99.01%であった。ヒト血漿中では，ロキサデュスタットは主にアルブミンに結合した（2.6.4.4.3 血漿蛋白結合)。

0.4～400 µg/mLの範囲における^{14}C-ロキサデュスタットのin vitro血球移行率は，マウスで23.7%～49.5%，ラットで4.3%～19.5%，ウサギで3.8%～11.5%，カニクイザルで3.9%～8.8%であり，0.4～40 µg/mLの範囲におけるヒトのin vitro血球移行率は2.2%～6.3%であった。放射能濃度の血液／血漿比はマウスで0.8～1.1，ラットで0.6～0.7，ウサギで0.6，カニクイザルで0.6～0.7，ヒトで0.6であった（2.6.4.4.4 血球移行)。

2.4.3.3　代謝

肝ミクロソーム及び肝細胞を用いた in vitro 代謝試験では，検討した動物種（ヒト，マウス，ラット及びカニクイザル）において，ロキサデュスタットはほとんど代謝されなかった。肝細胞では代謝物が僅かに生成したが，ヒト特異的な代謝物は認められなかった（2.6.4.5.1 In vitro 代謝）。

In vivo における動物種間（ラット，カニクイザル及びヒト）の代謝物比較では，いずれの動物種においても未変化体が血漿中の主要成分であった。ヒト血漿中では，総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は検出されなかった。ヒトとカニクイザル血漿では，MET3（4’-水酸化体の硫酸抱合体）が検出された。尿中では，3 種の動物種全てにおいて，未変体の割合は低かった。ヒト及びカニクイザルの尿中で最も多く認められた代謝物は MET1（4-*O*-β-グルクロン酸抱合体）であり，本代謝物はラット尿中にも認められた。ヒトとラットの糞中では，未変化体とその水酸化体が多く認められた。以上の結果から，主なヒト代謝物はラット及びカニクイザルでカバーされ，これらの動物種を毒性試験で使用するのは適切と考えられた（2.6.4.5.2 In vivo 代謝）。

ラットとカニクイザルに共通するロキサデュスタットの代謝経路はグルクロン酸抱合，グルコース抱合，水酸化又は酸化後の硫酸抱合及び脱フェニル化であった。ヒトでは，グルクロン酸抱合，グルコース抱合，水酸化後の硫酸抱合などが主要代謝経路であった。

2.4.3.3.1　動物種間の血漿中代謝物の比較

ヒトに ^{14}C-ロキサデュスタット（200 mg）を単回経口投与したとき，MET3 及び Peak 9（構造未知の代謝物）が，血漿中代謝物として検出された。MET3 は血漿中放射能の 8.4%以下であり，Peak 9 は投与後 4 時間の血漿中でのみ検出され，血漿中放射能の 1%未満であった。単回投与臨床試験［CL-0508 試験，CL-0532 試験及び CL-0543 試験］では，液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）を用いて MET3，MET1 及び MET2 を測定し，未変化体に対する各代謝物の割合の平均値は MET3 で 5.5%～7.3%，MET1 で 0.4%～0.5%，MET2 で 0.2%であった（2.7.2.3.1.4.1 代謝）。以上の通り，ロキサデュスタットをヒトに投与したとき，血漿中の主成分は未変化体であり，総薬物関連物質の 10%を超える血漿中代謝物はなかった。ヒト血漿中で最も多く存在する代謝物は MET3 であったが，本代謝物はカニクイザル血漿でも検出されており，ヒト特異的な代謝物ではなかった。その他のヒト血漿で認められた代謝物は極めて微量であった（2.6.4.5.3 動物種間の血漿中代謝物の比較）。

2.4.3.4　排泄

^{14}C-ロキサデュスタットをラットに単回経口投与（20 mg/kg）したときの投与後 120 時間までの尿及び糞中への累積放射能排泄率は，それぞれ投与量の 16.3%～16.8%及び 77.4%～78.5%であった。^{14}C-ロキサデュスタットをカニクイザルに単回経口投与（10 mg/kg）したときの投与後 168 時間までの尿及び糞中への累積放射能排泄率は，それぞれ投与量の 24.9%及び 73.5%であった。^{14}C-ロキサデュスタットを胆管カニューレ処置カニクイザルに単回経口投与したときの投与後 72 時間までの胆汁中への放射能排泄率は 51.7%であった。したがって，ラットとカニクイザルのいず

れにおいても，胆汁中排泄を介した糞中排泄が主な消失経路と推察された。一方，ヒトでは，尿及び糞中への放射能排泄率はほぼ等しく，投与後 192 時間までの尿中排泄率は投与量の 45.8%，糞中排泄率は投与量の 50.4%であった。以上のことから，動物とヒトでは主要消失経路に差があると考えられた（2.6.4.6.2 動物種間の比較）。

PPN 試験の一環として，ロキサデュスタットを雌性ラットに妊娠 7 日から授乳 20 日まで 1 日 1 回反復投与（5，10 及び 20 mg/kg）し，ロキサデュスタットの乳汁中への排泄について評価した。授乳 10 日のロキサデュスタットの乳汁中濃度は，同じ時点の母体血漿中濃度に比べて高かった。生後 4 日及び 21 日の哺乳児では，ロキサデュスタットが血漿中から検出された。これらの結果から，ロキサデュスタットは乳汁中に排泄され，乳汁の摂取を介して哺乳児に吸収されることが示唆された（2.6.4.6.3 乳汁への排泄）。

2.4.4 毒性試験

毒性試験として，ラット及びカニクイザルを用いた単回経口投与試験（カニクイザルは静脈内投与も含む），ラット及びカニクイザルを用いた 1 日 1 回経口投与による反復投与試験（4 週間）並びにマウス（13 週間），ラット（26 週間）及びカニクイザル（22 及び 52 週間）を用いた TIW 経口投与による反復投与試験を実施した。遺伝毒性試験として，in vitro での復帰突然変異試験及び染色体異常試験及び in vivo でのマウス小核試験を実施した。生殖発生毒性試験としては，ラットを用いた雌雄受胎能試験，ラット及びウサギを用いた EFD 試験並びにラットを用いた PPN 試験及び乳母哺育試験を実施した。がん原性試験はマウス及びラットを用いた 104 週試験を実施した。さらに，ロキサデュスタットの光毒性及び FG-6484（ロキサデュスタットの光分解物）の復帰突然変異試験も実施した。腫瘍進行及び転移形成傾向に対するロキサデュスタットの作用を検討するため，一連のマウス腫瘍モデル試験を実施した。小児を対象とする今後の開発のため，幼若ラットを用いた用量設定試験を実施した。

300 mg/kg までのラット単回経口投与毒性試験でのロキサデュスタットの最大非致死量は雄が 200 mg/kg，雌が 100 mg/kg であった。臨床病理所見から，無毒性量（NOAEL）は 30 mg/kg であった。カニクイザルへのロキサデュスタットの単回投与では，経口投与で最大 100 mg/kg，静脈内投与で 3 mg/kg まで良好な忍容性が認められた（2.6.6.2.1 SD ラット単回投与試験及び 2.6.6.2.2 カニクイザル単回投与試験（経口及び静脈内投与））。

ロキサデュスタットの反復経口投与毒性試験において，毒性は赤血球の産生及びクリアランスに関連する薬理作用の増強（赤血球造血亢進）に関連した変化が認められ，それらの変化が非臨床安全性試験の用量を制限する因子となった。

CD-1(ICR)（CD-1）マウスに 150 mg/kg までの用量を TIW13 週間投与した試験では，赤血球系パラメータの増加，脾臓の腫大，組織学的所見としての髄外造血，種々の器官のうっ血，骨髄過形成及び死亡が認められた（2.6.6.3.1 CD-1 マウスを用いた 13 週間間歇投与試験及び 2.6.6.3.2 CD-1 マウスを用いた 13 週間間歇投与試験，追加試験）。最大耐量（MTD）は 100 mg/kg，NOAEL は 60 mg/kg であった。

ロキサデュスタットを 1 日 1 回 4 週間あるいは TIW26 週間投与したラットでは，薬理作用である赤血球造血亢進に関連した用量依存的な所見が観察された。ほとんどの所見では可逆性が明らかであったが，赤血球造血亢進に関連する一部の所見は，ラットの TIW26 週間投与試験で 4～6 週間の回復期間後も持続していた（2.6.6.3.4 SD ラットを用いた 26 週間間歇投与試験及び 2.6.6.3.5 F344 ラットを用いた 26 週間間歇投与試験）。SD ラットを用いた 1 日 1 回投与による 4 週間試験では，20 mg/kg 以上の用量で種々の臓器に病理組織学的所見が認められ，60 mg/kg では死亡例がみられたことから，NOAEL は 2 mg/kg，MTD は 20 mg/kg と判断された（2.6.6.3.3 SD ラットを用いた 4 週間連日投与試験）。TIW26 週間投与試験の NOAEL は，雄性 SD ラットで 5 mg/kg 未満，雌性 SD ラットで 5 mg/kg（2.6.6.3.4 SD ラットを用いた 26 週間間歇投与試験），Fischer 344（F344）ラットで 15 mg/kg（2.6.6.3.5 F344 ラットを用いた 26 週間間歇投与試験）であった。

カニクイザルでは，30 mg/kg の 1 日 1 回 4 週間投与により，Hct は 60%を超える値にまで上昇したが，ロキサデュスタットに関連する組織学的所見は認められなかった（2.6.6.3.7 カニクイザルを用いた 4 週間連日投与試験）。カニクイザルの TIW22 週間投与試験では，全ての用量群（1 mg/kg 以上）で骨髄中の赤血球系過形成が認められ，30 mg/kg 以上の群では種々の臓器にうっ血が認められたが，これらの変化は 30 mg/kg までの用量を TIW52 週間投与した試験では認められなかった（2.6.6.3.8 カニクイザルを用いた 22 週間間歇投与試験及び 2.6.6.3.9 カニクイザルを用いた 52 週間間歇投与試験）。カニクイザルの TIW22 週間投与試験の NOAEL は，雄で 30 mg/kg，雌で 40 mg/kg であった。TIW52 週間投与試験の NOAEL は 30 mg/kg であった。

過度の薬理作用の二次的な影響として，ラット及びカニクイザルともに，白血球数（WBC）の減少，並びに鉄パラメータ，ビリルビン及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の増加，時としてアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の増加が認められた。その他の臨床病理所見への影響は比較的軽微であり，標的臓器毒性は示唆されなかった。ラットの病理組織学的検査で，薬理作用の増強に関連する二次的な影響として，弁膜症（主に房室弁），並びに腎臓，肺及び消化管を含む複数の組織における炎症，出血及び壊死を伴う散在性の血栓塞栓性病変などが認められた。血栓塞栓症は，生理的濃度を超える Hct を示した動物でのみ観察された。

ロキサデュスタットの遺伝毒性を評価するために実施した一連の in vitro 及び in vivo 遺伝毒性試験で影響が認められなかったことから，ロキサデュスタットは遺伝毒性誘発能を有していないと考えられる（2.6.6.4 遺伝毒性試験）。

CD-1 マウス及び SD ラットを用いたがん原性試験では，マウスにはロキサデュスタットを 0，15，30 及び 60 mg/kg の用量で TIW 最長 104 週間強制経口投与し，ラットには 0，2.5，5 又は 10 mg/kg の用量で TIW97 週間（雌）及び 104 週間（雄）投与した。その結果，ロキサデュスタットはがん原性を示さなかった（2.6.6.5 がん原性試験）。

SD ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験（TIW 投与）では，剖検所見に基づいて，雌雄の一般毒性の NOAEL は 5 mg/kg であった。交尾能及び精子パラメータへの影響は認められず，雄授胎能及び初期胚発生の NOAEL は 30 mg/kg（検討した最高用量）であった。雌の 30 mg/kg 群では，性周期，交尾能及び受胎能への影響は認められなかったが，死亡胚及び着床後死亡の増加

が認められたことから，雌受胎能及び初期胚発生の NOAEL は 15 mg/kg であった（2.6.6.6.1 受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験）。

SD ラットを用いた EFD に関する試験（1 日 1 回投与）では，15 mg/kg まで母動物及び EFD に対する影響は認められなかった。30 mg/kg 群では，摂餌量の有意な減少が認められた。また，雌雄の平均胎児体重が減少し，雄胎児の平均胎盤重量が増加した。30 mg/kg 群では，明らかな外表，内臓及び骨格異常は認められなかったが，この動物種及び系統で一般的に認められる骨格変異である頸肋の発現率が増加した。母動物及び EFD の NOAEL はいずれも 15 mg/kg であった（2.6.6.6.2.2 SD ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験）。ロキサデュスタットを 100 mg/kg まで投与したウサギを用いた EFD に関する試験（1 日 1 回投与）では，EFD への有害な影響は認められなかった。35 mg/kg 以上の群で流産の発現頻度が増加したこと，100 mg/kg 群で母動物の体重の減少及び摂餌量の減少が認められたことに基づいて，母動物及び EFD の NOAEL はそれぞれ 15 及び 100 mg/kg であった（2.6.6.6.2.4 NZW ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験）。

SD ラットを用いた PPN 試験では，10 mg/kg 以上の群の出生児に離乳前の死亡を伴う体重の用量依存的で有意な減少が認められた。また，5 mg/kg 以上の群で，出生児の発育抑制に関連すると考えられる発達遅延が複数の検査項目で認められた。母動物の NOAEL は 10 mg/kg であり，出生児に対する NOAEL は決定できなかった（2.6.6.6.3.1 SD 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）。SD ラットを用いた 15 mg/kg の単一用量投与での乳母哺育試験では，出生児の生存率へ最も顕著な影響が認められたのは出生後のみ乳汁を介してロキサデュスタットに曝露された出生児であったが，出生児体重の最も顕著な減少が認められたのは子宮内及び出生後にロキサデュスタットに曝露された出生児であった。脱水及び／又は哺乳・哺育不良などのロキサデュスタットに関連した一般状態への影響は，出生後のみロキサデュスタットに曝露された出生児に主に認められた（2.6.6.6.3.2 SD ラットを用いた乳母哺育試験）。

幼若ラットを用いた予備的な試験では，生後 15，22，29，36，43 及び 50 日にロキサデュスタットを単回投与した際の血漿中濃度は成熟ラットと同程度であったが，生後 15 日から TIW6 週間反復投与した用量設定試験で成熟ラットと忍容性に差が認められ，30 mg/kg 以上の群で死亡及び体重減少が認められた（2.6.6.6.4 幼若動物毒性試験）。

In vitro 光毒性試験の結果が陰性であったことから，ロキサデュスタットは光毒性を示さないと考えられた（2.6.6.8.1.1 3T3 ニュートラルレッド取り込み試験）。ロキサデュスタットの光分解産物である FG-6484 の復帰突然変異試験の結果から，FG-6484 に変異原性は認められなかった（2.6.6.8.2.1 細菌を用いた復帰突然変異試験）。

探索的腫瘍モデル試験では，薬理活性用量のロキサデュスタットは腫瘍進行に影響を及ぼさなかった（2.6.6.8.3 腫瘍モデル試験）。

以上より，マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルへのロキサデュスタットの投与により，全ての動物種において，赤血球造血亢進という薬理作用に関連した，用量依存的な血液学的影響が認められた。毒性所見としては，骨髄細胞数増加／過形成性変化（ラット，マウス，サル），脾臓の髄外造血（マウス，ラット），脾臓重量の増加（ラット，マウス），全身性のうっ血（ラット，

マウス），鉄パラメータの変化（サル），弁膜症及び血栓塞栓症（ラット）が認められたが，そのほとんどの所見は，赤血球造血亢進の直接的又は二次的な影響であると考えられる。所見はいずれも回復したか，回復傾向を示した。ロキサデュスタットは遺伝毒性及びがん原性を示さず，雌雄受胎能への影響はなく，母動物の無毒性用量において EFD に影響を及ぼさなかった。PPN 試験において，離乳前の F1 児体重が減少し，生存率が低下したことから，ロキサデュスタットは生殖発生毒性を有することが示された。

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　主な薬理作用

ロキサデュスタットは，HIF 経路を活性化し EPO の産生を促進することが in vitro で示された。また，in vivo では血中 EPO 濃度を上昇させ，げっ歯類疾患モデルにおいて Hb，Hct 及び RBC を増加させ貧血を改善した。また同時に，ヘプシジンの減少，鉄の吸収及び輸送に関連する因子の増加が認められ，これらのことは赤血球生成の増加に対し効果的に働いたと思われる。TIW 投与は 1 日 1 回投与に比べて，週当たりの総薬物曝露量が少なかったが，顕著な赤血球生成が認められた。ESA 治療では，生理的な血中 EPO 濃度を大きく上回る量の外因性 EPO を投与することにより，赤血球生成を亢進させるが，ロキサデュスタットは，より生理的 EPO 濃度に近い範囲で赤血球生成を増加させた［Provenzano et al, 2016b］。ロキサデュスタットの毒性試験で認められた有害事象は，主に過量投与による過度の薬理作用に関連するものであった。臨床現場では，定期的に Hb をモニタリングし，投与量を調整することにより，過度の薬理作用は軽減できると考える。

ロキサデュスタットは, 5/6 腎摘ラットにおいて, 貧血を改善したことから, 腎機能の低下によって赤血球生成が低下している貧血状態においても効果が期待される。現在 CKD 患者の貧血治療薬として市販されている EPO アナログでも，5/6 腎摘ラットモデルにおいて有効性を示す報告がある。例えば，rhEPO（100 IU/kg 週 2 回）は 8 週間の投与により貧血の悪化を抑制した［Bellizzi et al, 1998］。しかし，エポエチン β（週当たり 200 IU/kg rhEPO）を 9 週間投与したところ，初期には赤血球生成や Hb に対して効果を示したが，EPO 中和抗体の形成のためと思われる効果の減弱が投与 6 週目から認められた［Garrido et al, 2016］。同モデルでは，病態モデル作製 4 週後において，炎症が生じているとの報告もある［Ribeiro et al, 2016］。エポエチン β の薬効の減弱が炎症反応にも起因している可能性がある。また，ラット貧血モデルで 4 週間を超えてロキサデュスタットを投与した試験はないが（2.6.2.2.6.2 4 週間投与），これまでのところ，ロキサデュスタットの非臨床又は臨床試験においてタキフィラキシーを示すデータ（Hb）は得られていない（2.6.7 毒性試験概要表，表 2.6.7.7.7，及び 2.7.4 臨床的安全性）。5/6 腎摘試験で認められたロキサデュスタットの有効性は，残存腎臓における HIF 経路の活性化と，それに伴う EPO 産生の増加によって誘導された可能性が高い。過去にも，5/6 腎摘ラットモデルに薬理学的介入を行うことにより HIF が蓄積したという報告がある［Yu et al, 2012］。

また，PG-PS で誘発した慢性炎症に伴う小赤血球症及び血色素減少症に対する改善効果から明らかなように，ロキサデュスタットは，in vivo で，鉄利用も改善して赤血球生成を増加させ，Hb

を増加させた（2.6.2.2.6.1 2 週間投与，及び 2.6.2.2.6.2 4 週間投与）。また，ロキサデュスタットは肝臓のヘプシジン mRNA 発現を有意に抑制した（2.6.2.2.6 炎症性貧血モデルラットにおける有効性）。ヘプシジンは鉄吸収の抑制因子であり，炎症性貧血における鉄欠乏状態の指標となりえる［Deicher & Horl, 2004］。ヘプシジンは，腸上皮細胞及び肝細胞等から血液中に鉄を排出するフェロポーチンの分解を誘発し，それによって腸の鉄吸収及び細胞内貯蔵鉄の放出を抑制する［Haase, 2017］。ロキサデュスタットによる鉄状態及び赤血球生成の改善が炎症性貧血ラットで認められたが，それはヘプシジン合成の阻害も一因であると考えられる。十二指腸細胞による腸での鉄吸収には Dcytb による第二鉄 Fe^{3+}の第一鉄 Fe^{2+}への還元と，それに続く頂端膜に発現する鉄トランスポーターDMT1 による Fe^{2+}輸送が必要である。ロキサデュスタットは炎症性貧血ラットの十二指腸における DMT1 及び Dcytb の mRNA 発現を有意に亢進させることで，これらの動物における鉄吸収を容易にし，赤血球生成への鉄利用を促進したと考えられる（2.6.2.2.6.2 4 週間投与）。HIF はこれらの蛋白質を制御することが知られていることから［Haase, 2010; Anderson et al, 2011］，ロキサデュスタットによる鉄利用促進効果は HIF 経路の活性化を介したものと思われる。

ロキサデュスタットとは対照的に，ダルベポエチン（EPO アナログ）は，30 µg/kg の 4 週間の隔週投与で，Sham 対照動物の赤血球生成を増加させたが，炎症性貧血ラットでは改善させなかった（2.6.2.2.6.2 4 週間投与）。この貧血モデルにおいて EPO アナログは無効であったとの報告があるが（50 µg/kg rhEPO 週 1 回，［Barrett et al, 2011; Barrett et al 2015］），一方で，投与 2 週後からダルベポエチン投与（30 µg/kg 隔週）で貧血が改善されたとの報告もある［Coccia et al, 2001］。この報告と我々の試験におけるダルベポエチンの有効性には違いがあるが，詳細な理由は不明である。我々の試験では，Sham 群，PG-PS 群ともにダルベポエチンを隔週で静脈内投与した。我々の試験の結果は，ダルベポエチンの赤血球生成促進効果が，炎症状態では，正常状態ほど高くはないことを示している。我々の試験ではロキサデュスタットとは異なり，ダルベポエチンは，ヘプシジン，Dcytb 又は DMT1 の mRNA 発現を含む鉄代謝への顕著な作用が無かったことから，それが鉄欠乏貧血モデルにおいて有効性を示さなかった一因だと思われる。

PG-PS モデルにおける非臨床所見は臨床所見と一致している。CKD 患者におけるロキサデュスタットの貧血改善作用は，投与開始前の鉄充足度，炎症状態，あるいは治療期間中の鉄補充の有無に左右されなかった［Besarab et al, 2016; Provenzano et al, 2016a］。また，ロキサデュスタットは，ヒトにおいて血清中ヘプシジン値を減少，血清中トランスフェリン濃度を増加させることによって，骨髄に鉄を動員したと考えられる［Besarab et al, 2016］。現在市販されている EPO アナログによる治療では，静脈内鉄補充を必要とする場合が多いが，ロキサデュスタットによる治療は鉄の状態を改善するため，静脈内鉄補充なしでも貧血改善作用を示した［Besarab et al, 2015; Provenzano et al, 2016a］。ロキサデュスタットによる治療で鉄補充される患者が減少すれば，静脈内鉄に関連するリスクを低下させられる可能性がある。市販の EPO アナログ治療における低応答性には，CKD 患者の炎症状態が関連しており，それは機能性鉄の欠乏及びヘプシジンの増加と関係があると考えられている［MacDougall & Cooper, 2005; Adamson, 2009］。ロキサデュスタットによる非臨床モデルや臨床試験で認められる EPO 産生の増加及び鉄の状態の改善が協調的に働けば，炎症が

起こっている CKD 患者でも赤血球生成が効果的に亢進されることを示唆している。さらに，臨床において，EPO アナログでは投与によりその血中濃度が生理的な血清中 EPO 濃度を大きく上回ってしまうのに対し，ロキサデュスタットは生理的な血清中 EPO 濃度に近い範囲で内因性 EPO 濃度を増加させ，貧血を改善している［Besarab et al, 2015, Provenzano et al, 2016b］。CKD 患者では，EPO 投与量が多いこと，すなわち血中 EPO 濃度が高いことが心血管や脳血管系の副作用と関係しているとの報告がある［Szczech et al 2008, Pfeffer et al, 2009］。ロキサデュスタットでは，そのような高い血中 EPO 濃度に起因する副作用を回避できる可能性がある。

以上，マウス，ラット又はカニクイザルへロキサデュスタットを投与すると，in vitro で示された HIF 経路を活性化する作用機序から予測されるように，血漿中 EPO 濃度を上昇させ，赤血球生成を誘発する効果がある。検討した用量での最小有効量はマウスでは 6 mg/kg であった（2.6.2.2.4 マウスにおける間歇経口投与後の赤血球生成）。正常ラットでは 30 mg/kg で赤血球生成が認められ（2.6.2.2.5 ラットにおける間歇経口投与後の赤血球生成），カニクイザルでは，ロキサデュスタット 30 mg/kg で血漿中 EPO 濃度及び赤血球生成が増加し，一方，血漿中 VEGF 濃度に対する影響は認められなかった（2.6.6.3.7 カニクイザルを用いた 4 週間連日投与試験）。最小有効量については，各動物種で完全な検討がなされたわけではなく，検討した用量より低い可能性もある。また，カニクイザルでの長期間歇投与で Hb の増加が持続したことから，ロキサデュスタットの投与により，赤血球生成の亢進が維持されることが示された。

貧血治療薬として現在市販されている EPO アナログに比べて，ロキサデュスタットには多くの違いが考えられる。ロキサデュスタットによる EPO 産生の亢進並びに鉄吸収及び動員関連遺伝子の発現の変化がもたらす協調的な赤血球生成は，低応答性の改善及び患者のリスクを抑制できる可能性がある。また，鉄補充量を減らす又はなくすことで，鉄補充に伴う有害事象の発現を減少させると考えられる。さらに，ロキサデュスタットは経口製剤であり，非経口製剤である EPO アナログと比べて実用上の利点があると思われる。

2.4.5.2　標的臓器

赤血球造血亢進はロキサデュスタットの目的とする薬理作用の結果である。検討した全ての動物種で，赤血球系パラメータの増加が認められている。ラットでは，死亡，弁膜症及び腎臓，肺及び消化管を含む複数の組織に散在する血栓塞栓性病変など，過度の薬理作用に関連する二次的な影響が認められた。ラットを用いた 26 週間反復投与試験においてこれらの所見が認められた用量での Hct は，SD ラットでは 68%以上，F344 ラットでは 72.1%以上で，これらの Hct は血液粘稠度の増加及び組織灌流の減少と関連がある。カニクイザルは，最小限の二次的影響を伴う生理学的（正常）範囲を上回る RBC の増加（30 mg/kg TIW で 52.0%～64.3%）に忍容性を示した。

ロキサデュスタットの臨床使用では，用法・用量の一部として，Hb 上昇率を制御し，目標最大 Hb を設定することによって，過度の赤血球造血に関連するリスクを管理できる。

2.4.5.2.1 造血系

ラット，マウス及びカニクイザルを用いた in vivo 毒性試験では，Hb，Hct 及び RBC などの赤血球系パラメータが増加し，一貫して，赤血球造血亢進が認められた。最も効果が高かった用量では，網状赤血球数，平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）及び MCV の増加も認められた。MCHC はラット及びカニクイザルでは減少し，マウスでは増加した。毒性試験で得られた血液学的所見の概要及び最小影響量（LOEL）での曝露量の概要を表 2.6.6-27 及び表 2.6.6-28 に示す。ロキサデュスタットの薬理作用と関連のある変化として，カニクイザルへの 3～100 mg/kg の単回経口投与によって EPO 濃度が用量依存的に増加した。30 mg/kg の 1 日 1 回投与では，4 週間反復投与の初日及び最終日に同様の EPO 濃度の増加が認められた。

ラット及びカニクイザルを用いた反復投与試験における鉄パラメータの検討では，不飽和鉄結合能（UIBC）及び総鉄結合能（TIBC）の増加が認められ，鉄利用に対するロキサデュスタットの有益性が明らかになった。

赤血球造血が亢進している間，幼若網状赤血球（ストレス網状赤血球とも呼ばれる）の血中への産生速度が増し，それは赤血球造血活性を反映していると考えられている［Wiczling et al, 2014］。ラットにおいて，赤血球造血の亢進とともに赤血球崩壊が生じることが報告されており，EPO 濃度の上昇に伴い幼若網状赤血球値が増加するとともに［Robinson & Tsong, 1970］，幼若網状赤血球の崩壊によって生じるビリルビンが増加する［Andrews et al, 2014a, Andrews et al, 2014b］。このように，ラットにおける強力な赤血球造血亢進は，幼若網状赤血球の産生及び崩壊を促進しビリルビンを増加させる。ラットにおいてロキサデュスタット 30 mg/kg 以上で発現したビリルビン増加作用は，こうした骨髄からの幼若網状赤血球の産生及び崩壊の増加に基づくものと考えられる。同様にカニクイザルでも，より高用量であるが，同様の幼若網状赤血球産生応答を示した。幼若網状赤血球は血管内溶血により寿命は短縮し，その結果としてビリルビン増加をもたらしていると考えられる［Andrews et al, 2014a］。このように，ビリルビンの増加（2.4.5.2.3 肝臓）は単純に赤血球造血及び網状赤血球クリアランスの増加を反映していると考えられる。

一般に，血小板数の減少は，血栓形成による血小板の消費又は骨髄中の赤血球系前駆細胞の増加によるものであると考えられる。ラットを用いた反復投与毒性試験に認められた用量依存的な血小板数減少の原因は，骨髄中の赤血球造血活性の亢進に伴う血小板生成減少であると考えられる。なお，カニクイザルでは，いずれの試験でも明らかな血小板数減少は認められなかった。

WBC は変化に一貫性はなく，WBC 増加は単球，白血球及び好中球を含む各白血球分画よって反映された（詳細は 2.6.6.9.1.1 造血系に記載）。カニクイザルでは，WBC の変化は 30 mg/kg での 1 日 1 回 4 週間投与後のリンパ球数の減少としてのみ検出された。血小板数及び WBC の変化は過度の赤血球造血に関連しており，臨床での用法・用量条件下では重要ではないと考えられる。

投与中止後，造血系の変化はいずれの動物種でも回復するが，4～6 週間では全ての赤血球系パラメータの完全な正常化には至らなかった。

ロキサデュスタットの薬理作用は赤血球生成を引き起こす造血系の刺激である。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.2 心血管系／心臓

In vitro 試験において，ロキサデュスタットの hERG 電流に対する阻害率は 93 µmol/L で 17%であり（2.6.2.4.1 in vitro hERG チャネル阻害），カニクイザルを用いた CV 系に対する作用を評価した試験において QTc に対する影響はなく（2.6.2.4.2 カニクイザルにおける心血管系への影響及び 2.6.6.3.9 カニクイザルを用いた 52 週間間歇投与試験），ヒト QTc 試験においても影響がないことが確認された（2.7.2.3.5.2.2 .QT 間隔）。これらのデータは，ロキサデュスタットが再分極の異常又は QT 延長を生じるリスクが低いことを示している。

ロキサデュスタットはラット，カニクイザル（2.6.2.4 安全性薬理試験）及びヒト（2.7.2.3.5.2.1 心拍数及び血圧）において，HR に影響することが認められている。カニクイザルにロキサデュスタット 100 mg/kg を単回経口投与したところ，投与後 7 時間から投与後 24 時間の観察終了まで，同じ時点の対照溶媒と比べて HR が高かった。一方, BP に対する影響は認められなかった（2.6.2.4.2 カニクイザルにおける心血管系への影響）。いずれの反復投与毒性試験においても，カニクイザルの心臓に病理組織学的変化は認められなかった（2.6.7 毒性試験概要表，表 2.6.7.7.6，表 2.6.7.7.7，表 2.6.7.7.8）。

ラットは静脈内投与及び経口投与ともに，30 mg/kg 以上で平均 BP が減少し，同時に HR が増加した。反復経口投与試験（28 日間）では，HR 及び BP に対する影響は部分的に回復したが，投与後 24 時間まで持続した。ロキサデュスタットによる HR の増加は，カニクイザルに比べてラットで速やかに発現し，ラットへの 30 mg/kg の経口投与では，カニクイザルに 100 mg/kg までの投与でみられなかった BP の減少が認められた（2.6.2.4 安全性薬理試験）。

ロキサデュスタットによる HR 増加の作用機序は, in vitro での受容体等に対する選択性プロファイルの評価から，機序は明らかにはならなかった。NE 及び DA トランスポーターに対する IC_{50} 測定値は 15 µmol/L 以上であり，ラット局所血行動態への影響を評価した試験（30 mg/kg 静脈内投与）（2.6.2.4.8 覚醒ラットにおける心血管系及び局所血行動態への影響）における遊離形ロキサデュスタットの推定最高血漿中濃度（10 µmol/L）より高かった。

ロキサデュスタットによる HR 及び BP 応答を検討するため非 GLP 試験を複数実施した。ラットに 30 mg/kg 以上のロキサデュスタットを経口及び静脈内投与したところ，HR の一過性の増加及び BP の減少が認められた。一過性の HR 増加の程度は減少したものの, 28 日間の反復投与（GLP 試験）後も持続した（2.6.2.4.9 反復投与後の覚醒ラットにおける心拍数及び血圧への影響）。

これらのデータから，ロキサデュスタットによる一過性の HR 増加の少なくとも一部には，一過性の BP 減少に対する反射応答が介在していると考えられた。HR 及び BP に対する作用機序を検討するため，正常ラットで一連の補足的安全性薬理試験をさらに検討した。これらのデータから，ロキサデュスタットには，HR に影響を及ぼす心臓への直接的な作用はないことが示され

（2.6.2.4.7 摘出心モデルにおける影響），総末梢血管抵抗の減少による反射応答として HR が増加したと考えられた。この作用機序はロキサデュスタット投与による総末梢血管抵抗の減少を示すデータ及び局所組織で認められた血流量の増加によっても裏付けられる（2.6.2.4.6 麻酔ラットにおける心機能への影響及び 2.6.2.4.8 覚醒ラットにおける心血管系及び局所血行動態への影響）。総末梢血管抵抗の減少は急性低酸素症における応答として，酸素供給を最適化し，組織代謝を維持する生理学的機序として認識されている［Kuwahira et al, 1993］。ロキサデュスタットが総末梢血管抵抗を減少する機序は不明であるが，HIF 標的遺伝子のアドレノメデュリン，ヘムオキシゲナーゼ又は一酸化窒素合成酵素などによる血管拡張と関連している可能性がある［Hu et al, 2003; Umbrello et al, 2013］。

上記のように，ロキサデュスタットは非臨床試験において用量依存的に HR を増加させた。

2.4.5.2.2.1　弁膜症

ラットでは心臓の病理組織学的検査で弁膜症が認められた。カニクイザルでは，平均 Hct の増加（63.1%以上）にもかかわらず，心臓弁に病変は検出されなかった。

SD ラットでは，20 mg/kg 以上の 1 日 1 回投与及び 30 mg/kg 以上の TIW 投与で房室弁及び大動脈弁に弁膜症が認められ，血栓形成を伴っていた。F344 ラットでも同用量で房室弁及び／又は大動脈弁に同様の弁膜症が認められた。この所見は，おおむね，BP が高い心臓左側の方が重度であった。30 mg/kg 以上の雄及び 40 mg/kg の雌で，病変部の弁に血栓が認められた。弁膜症が認められた動物では Hct 増加（SD ラットで 68%以上，F344 ラットで 72.1%以上）が認められ，血液粘稠度の増加及び組織灌流の減少がその原因と考えられる。いずれのラット 26 週間試験でも 30 mg/kg 以上の群で血栓塞栓症に関連する死亡が認められた。赤血球増多症に起因して，弁膜症に加えて血栓塞栓症が生じたことにより，病態の悪化又は罹患動物の早期死亡が生じたと考えられた（2.6.6.9.1.2 心臓）。

投与中止後，弁膜症の発現率はいずれの系統のラットでも低下したことから，本病変は少なくとも一部は可逆的であることが示された。

ラットの弁膜症は高用量の ESA で，過度の赤血球造血に伴う影響として報告されている［Andrews et al, 2014a; Andrews et al, 2014b］。ロキサデュスタットのカニクイザルの試験では弁膜症は認められなかったが，これは，ESA による過度の赤血球造血に関連する弁膜症がイヌやカニクイザルには認められず，ラットに特異的であるとする報告と一致する［Andrews et al, 2014b］。

ラットに特異的な，過度の赤血球造血に関連する弁膜症は，細胞数の増加，血液粘稠度の増加及び／又は血栓症傾向の増加による心臓弁に対するせん断応力の増加によって生じた可能性が最も高い。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.3 肝臓

ラットの肝臓に髄外造血の亢進が認められる用量で，ビリルビン，AST 及び ALT の増加が認められた。ビリルビンはヘモグロビンの分解産物であり，病理組織学的検査で肝障害の徴候は認められなかったため，ロキサデュスタットによるビリルビン増加は，赤血球回転の増加によるものである可能性が最も高い。TIW ラット 26 週間投与試験で，肝臓の変化として血管うっ血及び／又は肝重量の増加が認められており，AST 及び ALT の増加は赤血球による肝臓うっ血によって説明されると考えられる。これらの臨床化学的検査パラメータ並びに肝臓の重量および組織学的な変化は回復期間終了後，正常に戻った。

カニクイザルの試験では，TIW22 週間の投与で，肝臓の病理組織学的変化を伴わない，限定的かつ可逆的な AST 増加（40 mg/kg）及びビリルビン増加（30 mg/kg 以上）のみが認められた。他のカニクイザルの試験（1 日 1 回 4 週間投与及び TIW52 週間投与）では肝臓への影響は認められなかった。

肝臓はロキサデュスタットの主要標的臓器とは考えられない。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.4 腎臓系／腎臓

ラットの反復投与試験では，1 日 1 回 4 週間（60 mg/kg）及び TIW 26 週間（30 mg/kg 以上）投与後に，腎臓重量の増加が認められた。これらの用量では，死亡及び早期の投与中止が生じた。腎臓所見の大部分はうっ血又は血栓塞栓性病変であり，健常動物におけるロキサデュスタットの過度の薬理作用の二次的影響であると考えられる。

炎症，出血及び壊死など，腎臓に認められたような病変は，肺及び消化管など，他の複数の組織にも認められ，血栓塞栓症によるものと考えられた。血栓塞栓症の徴候は Hct が生理的変動範囲を超えた動物のみに認められた。

ラット 4 週間試験における 4 週間の回復期の終了時に，20 mg/kg で尿細管変性が持続していた。TIW26 週間投与後の 4～6 週間の回復期後も持続していた腎臓の病理組織学的変化は，おそらく以前の血栓塞栓性病変及び梗塞の痕跡を主に反映している。カニクイザルの試験では腎臓所見は認められなかった。

ロキサデュスタットの毒性試験で認められた過度の赤血球造血と関連のある有害作用は，ESA のラット毒性試験でも高用量で認められており，重度の赤血球増多症に起因していると考えられる。正常動物への ESA 投与により，過度の赤血球造血が起こり，虚血性組織傷害及び死亡の原因となる二次的な血栓が生じる。これは，ESA 製剤について報告されている安全性データとも一致する。例えば，Hematide™（peginesatide）［Woodburn et al, 2008］，又は Aranesp（ダルベポエチン α）及び Procrit（エポエチン α）［Luksenburg et al, 2004］などで赤血球増多症及びそれに伴う影響が報告されている。ESA 製剤について報告されている所見には，広範な髄外造血，骨髄線維症，赤血球増多症に続発する組織低酸素症及び心臓及び腎臓の線維化などがある。

ラットにロキサデュスタットを単回経口投与したところ，30 mg/kg 以上で投与 4 時間後に排尿量の増加，100 mg/kg 以上で尿 pH 及び K^+濃度の増加が認められた（2.6.2.4.12 ラットにおける腎機能への影響）。

上記から，腎臓はロキサデュスタットの標的臓器とは考えられない。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.5 中枢神経系／脳

ラットを用いた 26 週間反復投与試験において，虚血性障害と関連した可能性のある所見が計 5 例の脳に認められた。SD ラットを用いた TIW26 週間試験では，30 mg/kg 群の雌 1 例に海馬内のニューロンの脱落が，F344 ラットを用いた TIW26 週間試験では，30 mg/kg 以上の群の 4 例に海馬のアンモン角内に軽微から中等度の錐体ニューロンの壊死が認められた。ニューロンの脱落又は壊死が認められた全ての動物に，心臓弁膜症／血栓症を示す病理組織学的所見が認められ，海馬神経細胞は虚血に対する感受性が高いことを考慮すると［Nikonenko et al, 2009］，この所見は血栓塞栓症又は血液過粘稠に続発する虚血性障害と一致する。CNS 安全性薬理試験では，300 mg/kg までの単回投与で神経薬理学的徴候は認められなかった（2.6.2.4.10 ラットにおける中枢神経系への影響）。以上より，脳はロキサデュスタットの主要標的器官ではないと考えられる。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.6 呼吸器系／肺

ロキサデュスタットを麻酔ラットに単回静脈内投与したところ，30 mg/kg 以上の雌雄で呼吸数の増加及び雌のみに分時換気量の増加が認められた。100 mg/kg の雄では一回換気量及び分時換気量が増加した（2.6.2.4.11 ラットにおける呼吸系への影響）。呼吸数の増加は低酸素に対する応答として報告されており，頸動脈小体による呼吸数の調節及び頸動脈小体又は副腎髄質における HIF-1α 及び HIF-2α 活性化の役割が示唆されている［Yuan et al, 2013］。また，フォン・ヒッペル-リンドウ（VHL）経路が破壊され，HIF 活性化が亢進しているチュバシュ人集団では，VHL 機能が正常な非チュバシュ人と比べて低酸素に対する呼吸応答が亢進しており［Smith et al, 2006］，この所見は，マウス赤血球増多症モデルでも再現されている［Slingo et al, 2014］。

SD ラットを用いた毒性試験では，1 例に色調異常，出血，慢性活動性炎症，肺胞及び間質の炎症細胞浸潤及び器質化血栓というまれな肺所見が認められている。これらの所見は回復したが，細胞浸潤，石灰化，骨化及びヘモジデリン沈着は個々の動物に残存した。カニクイザルでの肺所見は，TIW 投与した 22 週間試験における 40 mg/kg の 2 例でみられた血栓及び 52 週間試験における 3 mg/kg の雄 1 例に認められた肺の細菌感染（ロキサデュスタット投与とは無関係であると考えられる）のみであった。

以上より，肺はロキサデュスタットの主要標的器官ではないと考えられる。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.7　消化器系

ラットに TIW 投与した 26 週間試験では，30 mg/kg 以上で，消化管に炎症，出血及び壊死が発現し，血栓塞栓症によるものと判断された。また，ラットに 1 日 1 回投与した 4 週間試験の 20 mg/kg 以上の群で認められた胃病変は，動物の状態悪化と関連があると考えられた。

カニクイザルでの胃所見は，TIW 投与した 22 週間試験の 10 mg/kg 以上の群で認められた胃組織の赤色化のみであった。

以上の結果から，消化管はロキサデュスタットの主要標的臓器とは考えられない。ロキサデュスタットの臨床使用に際しては，Hb の増加割合をコントロールすること及び目標 Hb レベルの最大値を設定して投薬量を決定することにより，過剰な赤血球生成のリスクは管理できる。

2.4.5.2.8　その他の影響：コレステロール及びトリグリセリド

ラット及びカニクイザルを用いた単回及び反復投与毒性試験では，ロキサデュスタットの投与により血中総コレステロールが用量依存的に減少した。ラットの試験ではトリグリセリドの増加例も認められた。最長 52 週間のカニクイザル及び最長 26 週間のラットの反復投与試験における病理組織学的検査の結果，肝臓，消化管，脂肪組織又は CV 系に脂質関連の変化は認められなかった。

血中コレステロール値の減少は非臨床試験で使用したラット及びカニクイザルで一貫して認められた（2.6.2.3.3.1 ラットのコレステロール及びトリグリセリド値に及ぼす影響）。一般的に，ヒトの脂質プロファイルはげっ歯類とは異なる［Yin et al, 2012, Ishikawa et al, 2015］。

ロキサデュスタットがコレステロール減少を誘導する機序を in vitro アッセイで検討した。その結果，ロキサデュスタットは HMGCR の活性を直接は阻害せず，Insig-2 発現増加を介して HIF 依存的に HMGCR 蛋白濃度を減少させることが示された（2.6.2.3.3.2 コレステロール低下作用の作用機序）。これは HMGCR の分解が低酸素によって促進され，その作用は HIF-1α に依存しているとする報告［Nguyen et al, 2007］とも一致する。この低酸素作用に寄与していると考えられる一つの機序として，HIF による Insigs の誘導を低酸素が誘導しているという仮説が提唱されている。非特異的 HIF-PH 阻害薬であるジメチルオキサリルグリシン（DMOG）も HIF 及び Insig-2 依存的に HMGCR の分解を促進することが示されている［Hwang et al, 2017］。

コレステロール減少にはロキサデュスタットの薬理作用が介在していると考えられ，この作用はおおむね有益であると考えられる。妊娠後期のコレステロール減少については 2.4.5.4 生殖発生毒性を参照のこと。

2.4.5.3　遺伝毒性及びがん原性

実施した一連の遺伝毒性試験から，ロキサデュスタットによる遺伝毒性リスクはないことが示されている（2.6.6 毒性試験の概要文）。

CD-1 マウスに 60 mg/kg までのロキサデュスタットを最長 104 週間 TIW 経口投与したがん原性試験では，がん原性又は関連する原発腫瘍，良性腫瘍，悪性腫瘍又は担がん動物の増加は認められなかった。悪性腫瘍の総数及び担がん動物の総数は群間で同等であった。

SD ラットに 10 mg/kg までのロキサデュスタットを 97 週間（雌）及び 104 週間（雄）TIW 経口投与したがん原性試験では，がん原性又は関連する原発腫瘍，良性腫瘍，悪性腫瘍又は担がん動物数の増加は認められなかった。

ラット及びマウスを用いたがん原性試験では，2 年間にわたる曝露は赤血球造血の薬理作用を誘導する上で十分な量で，2 年間の忍容性が認められた（2.6.6.9.3 がん原性）。

以上，マウス及びラットにおいて，ロキサデュスタットはがん原性を示さなかった。これは，一連の腫瘍モデル試験において既存の腫瘍に対する有害反応がなく（2.6.6.8.3 腫瘍モデル試験），ロキサデュスタットのラット及びカニクイザルの慢性毒性試験における病理組織学的及び眼科学的評価において血管新生又は腫瘍の自然発生に関連する影響が認められなかったことからも裏付けられる。

非臨床試験の結果から，ロキサデュスタットにはがん原性又は腫瘍進展のリスクはないと判断された。

2.4.5.4　生殖発生毒性

ロキサデュスタットは，母体に毒性のない用量では雌雄受胎能及び初期胚発生に対する影響は示さず，ラット及びウサギを用いた EFD 試験で発生毒性は認められなかった。ラット雌受胎能試験で母体に対する毒性用量である 30 mg/kg を投与したところ，対照溶媒群と比べて胚生存率が低く，着床後死亡率及び胚死亡率が高かった。

ラット EFD 試験（1 日 1 回投与）で母体に対する毒性用量である 30 mg/kg では，発生毒性が帝王切開時の胎児体重の減少として発現した。100 mg/kg までのロキサデュスタットを投与したウサギ EFD 試験では，EFD に対する有害作用は認められなかった。

ラット PPN 試験（1 日 1 回投与）では，全用量の出生児で有意な体重の減少が認められ，10 mg/kg 以上の群で離乳前の期間中に出生児の死亡が認められた。死亡率の高さから，20 mg/kg 群の出生児は離乳時点で観察を中止した。5 mg/kg 群の出生児では，対照溶媒群と比べて体重の有意な低値が生後 57 日（雄）及び生後 64 日（雌）まで持続した。10 mg/kg 群の出生児の体重はのちに増加したが，試験終了までに対照溶媒群の体重範囲にまで戻ることはなかった。

5 mg/kg 以上の群で，離乳前の期間中にロキサデュスタットと関連のある出生児の反射及び発育分化に対する影響が認められ，成長の遅滞と一致していた。

15 mg/kg を 1 日 1 回投与した乳母哺育試験では，ロキサデュスタットを子宮内のみ，授乳を介してのみ及び両期間曝露された出生児への影響を比較した。その結果，生後（生後のみ又は生後

及び子宮内）ロキサデュスタットに曝露された出生児に体重及び生後生存率の減少が認められた。一方，ロキサデュスタットに曝露された全ての出生児に体重減少が認められた。

さらに，ロキサデュスタットは動物及びヒトにおいて血清中コレステロール値を減少させた（2.7.4.3.2 臨床検査値の推移）。妊娠第二及び三期の妊婦ではコレステロールの生理学的増加が認められること［Saarelainen, 2006, Chiang 1995］及びヒトではコレステロール低値［Edison et al, 2007, Oluwole et al, 2014］によって早産及び低体重が生じるという所見［Bartels and O'Donoghue, 2011, Harville et al, 2011, Catov et al, 2007, Khoury et al, 2007］を考慮すると，このロキサデュスタットの影響は妊娠後期には有害である可能性がある（2.6.6.9.4.1 発生毒性）。

以上の生殖発生毒性試験の結果から，ロキサデュスタットは受胎能又は EFD に影響を及ぼさなかったが，妊娠後期又は分娩後に胎児又は出生児の体重に対する影響が認められた。また，離乳前期間中の初期に出生児の死亡が認められた。これらの影響は母体に忍容性のある用量でも認められた。成長，発達及び出生児の早期死亡に対するこれらの影響の機序はまだ解明されていない。また，成獣及び成人において認められたコレステロール低下作用は，コレステロール値が自然に増加する妊娠後期に生じると，リスクを高める。これらの結果から，妊娠期及び／又は授乳中はロキサデュスタットを投与しないことの注意喚起が必要である。

2.4.5.5　幼若ラット試験

幼若ラット試験の用量設定プログラムは進行中である。出生児に生後 15 日～56 日までロキサデュスタットを TIW 経口投与（15，30 及び 60 mg/kg）したところ，死亡及び体重に用量依存的な影響が認められた。ロキサデュスタット 30 又は 60 mg/kg には忍容性がなく，30 mg/kg 以上の群で生後 15 日の投与開始から 2～5 日以内に瀕死／死亡が認められ，体重が減少した。追加試験の予備的な結果から，生後 22 日に投与を開始した場合は，死亡及び体重に対する影響はないことが示された。

2.4.5.6　曝露量

非臨床試験における曝露量は未変化体の総濃度として測定している。ロキサデュスタットは蛋白結合率が高く，動物では 2～400 µg/mL，ヒトでは 2～40 µg/mL の範囲での平均遊離画分の結果に基づいて非結合体濃度の割合を算出している（表 2.4- 1）。

表 2.4- 1　平均遊離画分

Species	Mouse	Rat	Cynomolgus monkey	Rabbit	Human
Free fraction	0.0744	0.0236	0.0150	0.0186	0.0102

Source: Module 2.6.5.5

2.4.5.6.1　正常及び疾患モデル動物における有効量での曝露量

正常及び疾患動物モデルにおける非臨床薬理試験の結果，ロキサデュスタットは，予定臨床投与用法である TIW で投与すると，赤血球造血を促進し，貧血を補正する効果があることが示され

た［Besarab et al, 2015, Besarab et al, 2016, Provenzano et al, 2016a, Provenzano et al, 2016b］。効力を裏付ける in vivo 薬理試験において曝露量は定期的には測定しなかった。薬理試験での最小有効量は，Hb に対する作用が示すように，マウスでは 6 mg/kg（2.6.2.2.4 マウスにおける間歇経口投与後の赤血球生成），正常ラット及び貧血ラットでは 20 mg/kg 以上であった（2.6.2.2.5 ラットにおける間歇経口投与後の赤血球生成, 2.6.2.2.6 炎症性貧血モデルラットにおける有効性, 及び 2.6.2.2.7 腎性貧血モデルラットにおける有効性）。カニクイザルを用いた毒性試験では，ロキサデュスタット 30 mg/kg で血漿中 EPO 濃度及び赤血球造血が増加した（2.6.6.3.7 カニクイザルを用いた 4 週間連日投与試験）。

非臨床薬理モデルでの最小有効量（及び曝露量）は十分に検討がなされていないが，臨床試験における最小有効量（曝露量）は，非臨床試験で得られた有効量（曝露量）よりも低く，例えば，典型的な臨床有効量である 120 mg（2 mg/kg に相当）を透析患者に投与したときの濃度 - 時間曲線下面積（AUC）は 135.5 µg h/mL（遊離未変化体濃度換算 1.38 µg·h/mL）であり（表 2.4- 3），非臨床での有効用量（表 2.4- 2）のそれよりも 4.3～10.2 倍低かった（遊離未変化体濃度での比較）。

表 2.4- 2　薬理学的活性用量での総未変化体濃度及び遊離未変化体濃度

Species/ Strain	Study type	Study Number	Dose (mg/kg)	Total unchanged drug†		Free unchanged drug‡	
				C_{max} (µg/mL)	AUC (µg.h/mL)	C_{max} (µg/mL)	AUC (µg.h/mL)
Mice	Single dose	352010016*	15	41.9	143	3.12	10.6
Rat	Single dose	1517-ME-0030	20	71	596	1.7	14.1
Cynomolgus Monkey	Single dose	1517-ME-0003	30	108	394	1.6	5.9

†: Average values from males and females
‡ Unbound drug was calculated using values from Table 2.4- 1
*Source: mouse values 2.6.6, Table 2.6.6- 14, Day 1; rat: module 2.6.4, Table 2.6.4-1; monkey: module 2.6.4, Table 2.6.4-3 and Table 2.6.4-4: oral value at 30 mg/kg (average of mean values from male and female)

表 2.4- 3　ヒト臨床における薬理学的活性用量での総未変化体濃度及び遊離未変化体濃度

Study	Patients	Study Number	Dose (mg)	Total unchanged drug	Free unchanged drug†
				AUC (µg.h/mL)	AUC (µg.h/mL)
Human (Japan)	Dialysis patients	Pop PK&	120	135.5	1.38
Human (Japan)	Dialysis patients	Pop PK&	300 (MRHD)	338.8	3.46

MRHD: maximum recommended human dose
† Unbound drug was calculated using values from Table 2.4- 1
&: Pop PK model for Japanese subjects based on Phase II/III data (Module 2.7.2.2.7.2).

2.4.5.6.2　毒性試験における NOAEL での曝露量

マウス，ラット及びカニクイザルに TIW 経口投与した反復投与毒性試験のトキシコキネティクスでは，速やかな経口吸収が認められ，明らかな薬物蓄積又は $t_{1/2}$ の変化はなかった。一般的に，ほとんどのげっ歯類試験では用量比例的な曝露量の増加が認められたが，カニクイザルでは検討

した用量において用量比を上回る増加が認められた。マウス，ラット又はカニクイザルでは曝露量に明らかな性差は認められなかった。

総未変化体濃度及び算出された非結合体濃度について，主要反復投与毒性試験における結果を表 2.4- 4 に，がん原性及び生殖発生毒性試験における結果を表 2.4- 5 に示す。NOAEL での曝露量（総及び非結合体濃度）はラット及びカニクイザルを用いた慢性毒性試験を通じて同等の範囲であった。

表 2.4- 4　反復投与毒性試験における NOAEL での曝露量：総未変化体及び非結合体

Species/ Strain or Subject	Study type	Study Number	Dose	Total roxadustat †		Unbound roxadustat ‡	
				C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-48} (µg.h/mL)	C_{max} (µg/mL)	AUC_{0-48} (µg.h/mL)
Mouse/ CD-1	13W TIW	301_06_35 10_078	60 mg/kg	131	577 §	9.75	42.9 §
Rat/ SD	26W TIW	301_06_35 10_088	5 mg/kg	34.4	155	0.81	3.66
Rat/ F344	26W TIW	352007004	15 mg/kg	73.1	322	1.73	7.60
Cynomolgus Monkey	52W TIW	301_06_35 20_092	30 mg/kg	38.4	148	0.58	2.22

†: Average values from mean values of males and females.

‡: Unbound drug was calculated using values from Table 2.4- 1.

§: AUC_{0-24} (µg.h/mL)

表 2.4- 5　がん原性及び生殖発生毒性試験における NOAEL での曝露量：総未変化体及び非結合体

Carcinogenicity studies							
Species/ Strain	Study type	Study Number	Dose at NOAEL (mg/kg)	Total roxadustat		Unbound roxadustat‡	
				C_{max} (µg/mL)	AUC (µg.h/mL)	C_{max} (µg/mL)	AUC (µg.h/mL)
Mouse/ CD-1	Carc TIW	352010016	60	83.0	533.5†	6.18	39.69
Rat/ SD	Carc TIW	352010015	10	60.1	354.5†	1.42	8.37
Reproductive and developmental studies							
Rat/ SD	Fertility TIW	352012001					
	Male		5	16.3	101.5	0.38	2.40
	Female: maternal		5	12.4	90.3	0.29	2.13
	reproductive		15	52.9	428.8	1.25	10.12
Rat/ SD	EFD daily maternal & EFD	352010001	15	50	418.1	1.18	9.87
Rabbit/ NZW	EFD, daily maternal	352010002	15	15.3	56.4	0.28	1.05
	EFD		100	103.1	604.2	1.92	11.24

†: Average values from males and females.

‡: Unbound drug was calculated using values from Table 2.4- 1.

2.4.5.6.3　日本人透析患者に対する曝露マージン及び安全域

非臨床安全性プログラムにおける用量制限因子は，過度な薬理作用による用量依存的な赤血球造血亢進であった。ロキサデュスタットの日本人透析患者に対する最大ヒト推奨量（MRHD）で

ある TIW 300 mg での臨床曝露量（表 2.4- 3）に対する非臨床安全性試験の NOAEL との安全域を表 2.4- 6 に示す。

一般毒性試験で認められた毒性の大部分は，過度の赤血球造血に関連するものであり，重要な潜在的臨床リスクとは考えられない。安全域の比率が低いことを考慮すると，過度の赤血球系パラメータの変動と関連のある慢性毒性試験の知見は，理論上ヒトに生じ得るという結論となるかもしれないが，貧血患者に対する投与パラダイムは，定期的な Hb のモニタリングと用量調整規定に基づき，既定値を超える Hb の増加及び Hb の増加率を制御している。これらの治療規定は同時に，動物実験において検出されたリスクの発現を予防する十分なツールとなる。

表 2.4- 6　MRHD である 300 mg 投与での日本人透析患者に対する，主要毒性試験に基づく安全域

Species/ Strain	Study type	Study Number	Dose at NOAEL (mg/kg)	Safety margins Based on AUC	
				Total	Unbound
Mouse/ CD-1	13W TIW	301_06_3510_078	60	1.7	12.4
Rat/ SD	26W TIW	301_06_3510_088	5	0.46	1.1
Rat/ F344	26W TIW	352007004	15	0.95	2.2
Cynomolgus Monkey	52W TIW	301_06_3520_092	30	0.44	0.64

Safety margins are the ratio of (unbound) roxadustat in animals (Table 2.4- 4) and the matching parameter in humans (Table 2.4- 3)

2.4.5.7　安全性プロファイル

一般毒性試験で認められた毒性の大部分は，過度の赤血球造血に関連するものであり，重要な潜在的臨床リスクとは考えられない。

動物試験において HR の増加及び BP の減少が認められた。HR の増加は，少なくとも一部は，ロキサデュスタットによって誘発された総末梢血管抵抗減少に対する圧受容器反射応答である可能性が高い。コレステロールの減少は有益であると考えられる。

ロキサデュスタットは遺伝毒性もがん原性も示さない。

ラットを用いた生殖発生毒性試験では，妊娠及び授乳期の母体にロキサデュスタットを投与すると生殖発生毒性（出生児及び胎児に死亡あるいは発育抑制）が認められたことから，妊娠期及び授乳期にはロキサデュスタットを使用するべきではないことが示された。ロキサデュスタットがヒトの乳汁中に移行するかどうかは知られていないが，ラットの乳汁中には移行するため，注意喚起が必要である。

以上より，実施された非臨床安全性評価は，予定されている投与規定に従って CKD 患者の貧血治療にロキサデュスタットを用いることの妥当性を裏付けている。

2.4.6 参考文献一覧

Adamson JW. Hyporesponsiveness to Erythropoiesis Stimulating Agents in Chronic Kidney Disease: The Many Faces of Inflammation. Adv Chronic Kidney Dis. 2009;16(2):76-82.

Anderson ER. Xue X, and Shah YM. Intestinal Hypoxia-inducible Factor-2α (HIF-2α) Is Critical for Efficient Erythropoiesis. J Biol Chem. 2011;286(22):19533-19540.

Andrews DA, Boren BM, Turk JR, Boyce RW, He YD, Hamadeh HK, et al. Dose-related differences in the pharmacodynamic and toxicologic response to a novel hyperglycosylated analog of recombinant human erythropoietin in Sprague-Dawley rats with similarly high hematocrit. Toxicol Pathol. 2014a;42(3):524-539.

Andrews DA, Pyrah ITG, Boren BM, Tannehill-Gregg SH, Lightfoot-Dunn RM. High hematocrit resulting from administration of erythropoiesis-stimulating agents is not fully predictive of mortality or toxicities in preclinical species. Toxicol Pathol. 2014b;42(3):510-523.

Barrett TD, Palomino HL, Brondstetter TI, Kanelakis KC, Wu X, Haug PV, et al. Pharmacological Characterization of 1-(5-Chloro-6-(trifluoromethoxy)-1*H*-benzoimidazol-2-yl)-1*H*-pyrazole-4-carboxylic Acid (JNJ-42041935), a Potent and Selective Hypoxia-Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor. Mol Pharmacol. 2011;79(6):910-920.

Barrett TD, Palomino HL, Brondstetter TI, Kanelakis KC, Wu X, Yan W, et al. Prolyl hydroxylase inhibition corrects functional iron deficiency and inflammation-induced anaemia in rats. Br J Pharmacol. 2015;172(16):4078-4088.

Bartels Ä, O'Donoghue K. Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns Obstet Med. 2011;4(4):147-151.

Bellizzi V, Sabbatini M, Fuiano G, Sansone G, Magri P, Uccello F, et al. The impact of early normalization of haematocrit by erythropoietin on renal damage in the remnant kidney model. Nephrol Dial Transplant. 1998;13(9):2210-2215.

Besarab A, Chernyavskaya E, Motylev I, Shutov E, Kumbar LM, Gurevich K, et al. Roxadustat (FG-4592): Correction of Anemia in Incident Dialysis Patients. J Am Soc Nephrol. 2016;27(4):1225-1233.

Besarab A, Provenzano R, Hertel J, Zabaneh R, Klaus SJ, Lee T et al. Randomized placebo-controlled dose-ranging and pharmacodynamics study of roxadustat (FG-4592) to treat anemia in nondialysis-dependent chronic kidney disease (NDD-CKD) patients. Nephrol Dial Transplant. 2015;30(10):1665-1673.

Bunn HF. Erythropoietin, Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3(3):a011619.

Catov JM, Bodnar LM, Kip KE, Hubel C, Ness RB, Hanger G, et al. Early pregnancy lipid concentrations and spontaneous preterm birth. Am J Obstet Gynecol. 2007;197(6):610.e1-e7.

Chiang AN, Yang ML, Hung JH, Chou P, Shyn SK, Ng HT. Alterations of serum lipid levels and their biological relevances during and after pregnancy. Life Sci. 1995;56(26):2367-2375.

Coccia MA, Cooke K, Stoney G, Pistillo J, Castillo JD, Duryea D, et al. Novel erythropoiesis stimulating protein (darbepoetin alfa) alleviates anemia associated with chronic inflammatory disease in a rodent model. Exp Hematol. 2001;29(10):1201-1209.

Deicher R, Hörl WH. Hepcidin: a molecular link between inflammation and anaemia. Nephrol Dial Transplant. 2004;19(3):521-524.

de Mik SML, Hoogduijn MJ, de Bruin RW and Dor FJMF. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models. BMC Nephrol. 2013;14:74.

Edison RJ, Berg K, Remaley A, Kelley R, Rotimi C, Stevenson RE, et al. Adverse birth outcome among mothers with low serum cholesterol. Pediatrics. 2007;120(4):723-733.

Flamme I, Oehme F, Ellinghaus P, Jeske M, Keldenich J, Thuss U. Mimicking Hypoxia to Treat Anemia: HIF-Stabilizer BAY 85-3934 (Molidustat) Stimulates Erythropoietin Production without Hypertensive Effects. PloS ONE. 2014;9(11):e111838.

Fong GH, and Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. Cell Death Differ. 2008;15(4):635-641.

Garrido P, Ribeiro S, Fernandes J, Vala H, Bronze-da-Rocha E, Rocha-Pereira P, et al. Iron-Hepcidin Dysmetabolism, Anemia and Renal Hypoxia, Inflammation and Fibrosis in the Remnant Kidney Rat Model. PLoS ONE. 2015;10(4):e0124048.

Garrido P, Ribeiro S, Fernandes J, Vala H, Rocha-Pereira P, Bronze-da-Rocha E, et al. Resistance to Recombinant Human Erythropoietin Therapy in a Rat Model of Chronic Kidney Disease Associated Anemia. Int. J. Mol. Sci. 2016;17(1):28.

Haase VH. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;299(1):F1-F13.

Haase VH. HIF-prolyl hydroxylases as therapeutic targets in erythropoiesis and iron metabolism. Hemodial Int. 2017;21 (Suppl 1):S110-S124.

Harville EW; Viikari JS.A, Raitakarii OT. Preconception cardiovascular risk factors and pregnancy outcome. Epidemiology. 2011;22(5):724-730.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B and Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1α (HIF-1α) and HIF-2α in Hypoxic Gene Regulation. Mol Cell Biol. 2003;23(24): 9361-9374.

Hwang S, Nguyen AD, Jo Y, Engelking LJ, Brugarolas J, DeBose-Boyd RA. Hypoxia-inducible factor 1α activates insulin-induced gene 2 (Insig-2) transcription for degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase in the liver. J Biol Chem. 2017;292(22):9382-9393.

Ishikawa M, Saito K, Urata M, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Comparison of circulating lipid profiles between fasting humans and three animal species used in preclinical studies: mice, rats and rabbits. Lipids Health Dis. 2015;14:104.

Jain MR, Joharapurkar AA, Pandya V, Patel V, Joshi J, Kshirsagar S, et al. Pharmacological Characterization of ZYAN1, a Novel Prolyl Hydroxylase Inhibitor for the Treatment of Anemia. Drug Res. 2016;66(02):107-112.

Kaelin, Jr. WG, Ratcliffe PJ. Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. Mol Cell. 2008;30(4):393-402.

Khoury J, Haugen G, Tonstad S, Froslie KF, Henriksen T. Effect of a cholesterol–lowering diet during pregnancy on maternal and fetal Doppler velocimetry: the CARRDIP study. Am J Obstet Gynecol. 2007;196(6):549.e1-e7.

Kuwahira I, Heisler N, Piiper J, Gonzalez NC. Effect of chronic hypoxia on hemodynamics, organ blood flow and O_2 supply in rats. Respir Physiol. 1993;92(2):227-238.

Luksenburg H, Weir A, Wager R. FDA Briefing Document Oncologic Drugs Advisory Committee: Safety Concerns Associated with Aranesp (darbepoetin alfa) Amgen, Inc. and Procrit (epoetin alfa) Ortho Biotech, L.P., for the Treatment of Anemia Associated with Cancer Chemotherapy. 4th May 2004.

Macdougall IC, Cooper AC. Hyporesponsiveness to erythropoietic therapy due to chronic inflammation. Eur J Clin Invest. 2005;35(Suppl 3):32-35.

Maxwell PH, Eckardt KU. HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. Nat Rev Nephrol. 2016;12(3):157-168.

Nguyen AD, McDonald JG, Bruick RK, DeBose-Boyd RA. Hypoxia Stimulates Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase through Accumulation of Lanosterol and Hypoxia-Inducible Factor-mediated Induction of Insigs. J Biol Chem. 2007;282(37):27436-27446.

Nikonenko AG, Radenovic L, Andjus PR, Skibo GG. Structural features of ischemic damage in the hippocampus. Anat Rec (Hoboken). 2009;292(12):1914-1921.

Oluwole AA, Adegbesan-Omilabu MA Okunade KS. Preterm delivery and low maternal serum cholesterol level: Any correlation? Int. J Reprod Contracept Obstet Gynecol. 2014;3(2):442-446.

Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen C, Cooper ME, de Zeeuw D, Eckardt KU, et al. A Trial of Darbepoetin Alfa in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. N Engl J Med. 2009;361(21):2019-2032.

Provenzano R, Besarab A, Sun CH, Diamond SA, Durham JH, Cangiano JL, et al. Oral Hypoxia–Inducible Factor Prolyl Hydroxylase Inhibitor Roxadustat (FG-4592) for the Treatment of Anemia in Patients with CKD. Clin J Am Soc Nephrol. 2016a;11(6):982-991.

Provenzano R, Besarab A, Wright S, Dua S, Zeig S, Nguyen P, et al. Roxadustat (FG-4592) Versus Epoetin Alfa for Anemia in Patients Receiving Maintenance Hemodialysis: A Phase 2, Randomized, 6- to 19-Week, Open-Label, Active-Comparator, Dose-Ranging, Safety and Exploratory Efficacy Study. Am J Kidney Dis. 2016b;67(6):912-924.

Ribeiro S, Garrido P, Fernandes J, Vala H. Rocha-Pereira P, Costa E, et al. Pathological and molecular mechanisms underlying resistance to recombinant human erythropoietin therapy in the remnant kidney rat model of chronic kidney disease associated anemia. Biochimie. 2016;125:150-162.

Robinson SH, Tsong M. Hemolysis of “stress” reticulocytes: a source of erythropoietic bilirubin formation. J Clin Invest. 1970;49(5):1025-1034.

Saarelainen H; Laitinen T; Raitakari OT, Juonala M, Heiskanen N, Lyyra-Laitinen T, et al. Pregnancy-related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women. Circ J. 2006;70(6):768-772.

Sartor RB, Anderle SK, Rifai N, Goo DA, Cromartie WJ, Schwab JH. Protracted Anemia Associated with Chronic, Relapsing Systemic Inflammation Induced by Arthropathic Peptidoglycan-Polysaccharide Polymers in Rats. Infect Immun. 1989;57(4):1177-1185.

Slingo ME, Turner PJ, Christian HC, Buckler KJ, Robbins PA. The von Hippel-Lindau Chuvash mutation in mice causes carotid-body hyperplasia and enhanced ventilatory sensitivity to hypoxia. J Appl Physiol. 2014;116(7):885-892.

Smith TG, Brooks JT, Balanos GM, Lappin TR, Layton DM, Leedham DL, et al. Mutation of von Hippel–Lindau Tumour Suppressor and Human Cardiopulmonary Physiology. PLoS Medicine. 2006;3(7):e290.

Szczech LA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan DN, Sapp S, Califf RM, et al. Secondary analysis of the CHOIR trial epoetin-α dose and achieved hemoglobin outcomes. Kidney Int. 2008;74(6):791-798.

Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, et al. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. Blood. 2008;111(6):3229-3235.

Umbrello M, Dyson A, Feelisch M, Singer M. The key role of nitric oxide in hypoxia: hypoxic vasodilation and energy supply-demand matching. Antioxid Redox Signal. 2013;19(14):1690-1710.

Vaziri ND, Liang K. Down-regulation of VLDL receptor expression in chronic experimental renal failure. Kidney Int. 1997;51(3):913-919.

Wiczling P, Krzyzanski W, Żychlińska N, Lewandowski K, Kaliszan R. The quantification of reticulocyte maturation and neocytolysis in normal and erythropoietin stimulated rats. Biopharm Drug Dispos. 2014;35(6):330-340.

Wong BW, Kuchnio A, Bruning U, Carmeliet P. Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. Trends Biochem Sci. 2013;38(1):3-11.

Woodburn KW, Schatz PJ, Fong KL, Wilson SD, Ferrell T, Spainhour CB, et al. Preclinical safety and pharmacology of Hematide, a peptidic erythropoiesis stimulating agent (ESA), in rats and monkeys. Drug Chem Toxicol. 2008;31(2):229-244.

Yilmaz MI, Solak Y, Covic A, Goldsmith D, Kanbay M. Renal Anemia of Inflammation: The Name Is Self-Explanatory. Blood Purif. 2011;32(3):220-225.

Yin W, Carballo-Jane E, McLaren DG, Mendoza VH, Gagen K, Geoghagen NS, et al. Plasma lipid profiling across species for the identification of optimal animal models of human dyslipidemia. J Lipid Res. 2012;53(1):51-65.

Yu X, Fang Y, Liu H, Zhu J, Zou J, Xu X, et al. The balance of beneficial and deleterious effects of hypoxia-inducible factor activation by prolyl hydroxylase inhibitor in rat remnant kidney depends on the timing of administration. Nephrol Dial Transplant. 2012;27(8):3110-3119.

Yuan G, Peng YJ, Reddy VD, Makarenko VV, Nanduri J, Khan SA, et al. Mutual antagonism between hypoxia-inducible factors 1α and 2α regulates oxygen sensing and cardio-respiratory homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(19):E1788-1796.