

2.6.1 緒言

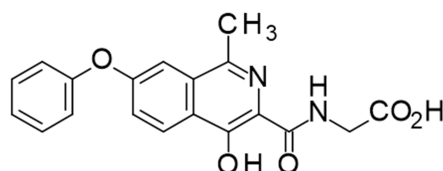
2.6.1.1 ロキサデュスタットの薬理作用及び化学構造式

ロキサデュスタット（以下、本薬）は米国ファイブロジエン社により見出された新規化学物質であり、アステラス製薬やアストラゼネカ社と共同開発された（FG-4592/ASP1517/AZD9941）。本薬は低酸素誘導因子（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 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。

HIF 経路はエリスロポエチン（EPO）遺伝子の発現を直接調節するので、本薬による HIF 経路の活性化は血液中の内因性 EPO の増加につながる。HIF 経路の活性化は EPO の産生を増やすだけでなく、鉄利用に関係する遺伝子発現も直接調節し、ヘモグロビン合成に必要な鉄利用を増加させる。すなわち、鉄吸収に関与する二価金属トランスポーター1（DMT1）及び十二指腸シトクロム b(Dcytb)、鉄輸送を担うトランスフェリン、腸上皮細胞等から血液中に鉄を排出するフェロポーチン、鉄再利用に重要なヘムオキシゲナーゼ-1 が HIF 経路により調節される [Haase, 2013]。これらに加え、HIF 経路の活性化は、主要な鉄調節ホルモンであるヘプシジンを低下させる。それにより、消化管での鉄の取り込みや、細胞からの鉄放出が高まり、生体内での鉄利用が亢進する。したがって、本薬による鉄利用の増加には、HIF 経路の活性化に伴うヘプシジンの低下も関与すると考えられる。

以上のように、本薬は HIF-PH 阻害を介して HIF 経路を活性化することにより、正常酸素状態においても、低酸素状態に暴露された際に生じる生体反応と同様の反応を誘導し、赤血球造血を促進する。

開発コード：	FG-4592, ASP1517, AZD9941
一般名 JAN：	（日本名）ロキサデュスタット；（英名）Roxadustat
化学名：	<i>N</i> -[(4-Hydroxy-1-methyl-7-phenoxyisoquinolin-3-yl)carbonyl]glycine
分子式：	C ₁₉ H ₁₆ N ₂ O ₅
分子量：	352.34
構造式：	



CAS 登録番号：	808118-40-3
-----------	-------------

2.6.1.2 想定する効能・効果と用法・用量

想定する効能・効果は透析施行中の腎性貧血である。赤血球造血刺激因子製剤で未治療の場合、通常、成人には、ロキサデュスタットとして1回 50 mg を開始用量とし、週3回経口投与する。以後は、患者の状態に応じて投与量を適宜増減するが、最高用量は1回 3.0 mg/kg を超えないこととする。赤血球造血刺激因子製剤から切り替える場合、通常、成人には、ロキサデュスタットとして1回 70 mg 又は 100 mg を開始用量とし、週3回経口投与する。以後は、患者の状態に応じて投与量を適宜増減するが、最高用量は1回 3.0 mg/kg を超えないこととする。

2.6.1.3 参考文献

Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev.* 2013;27(1):41-53.
Maxwell PH, Eckardt KU. HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(3):157-68.

目次

2.6.2	薬理試験の概要文	6
2.6.2.1	まとめ	6
2.6.2.1.1	効力を裏付ける試験	6
2.6.2.1.1.1	HIF-PH 酵素活性の阻害	6
2.6.2.1.1.2	正常げっ歯類における EPO 産生及び赤血球生成	7
2.6.2.1.1.3	貧血モデルラットにおける赤血球生成	7
2.6.2.1.1.4	代謝物の薬理的評価	7
2.6.2.1.2	副次的薬理試験	7
2.6.2.1.2.1	in vitro 試験	7
2.6.2.1.2.2	ラットの耐糖能に対する作用	8
2.6.2.1.2.3	コレステロールに及ぼす影響	8
2.6.2.1.3	安全性薬理試験	8
2.6.2.1.4	結論	9
2.6.2.2	効力を裏付ける試験	10
2.6.2.2.1	in vitro 酵素阻害	10
2.6.2.2.2	in vitro HIF- α 蓄積及び EPO 産生誘導	10
2.6.2.2.3	マウスにおける単回経口投与後の EPO 産生	11
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	12
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	13
2.6.2.2.6	炎症性貧血モデルラットにおける有効性	14
2.6.2.2.6.1	2 週間投与	14
2.6.2.2.6.2	4 週間投与	15
2.6.2.2.7	腎性貧血モデルラットにおける有効性	17
2.6.2.2.8	代謝物の効力を裏付ける試験	18
2.6.2.3	副次的薬理試験	18
2.6.2.3.1	受容体結合/酵素アッセイ	18
2.6.2.3.1.1	スクリーニング試験	18
2.6.2.3.1.2	濃度反応試験	19
2.6.2.3.1.3	甲状腺ホルモン受容体放射性リガンド結合試験	19
2.6.2.3.1.4	TR α 及び TR β レポーターアッセイ	19

2.6.2.3.2	ラットの耐糖能に対する作用	20
2.6.2.3.3	コレステロールに及ぼす影響	21
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	21
2.6.2.3.3.2	コレステロール低下作用の作用機序	23
2.6.2.4	安全性薬理試験	24
2.6.2.4.1	in vitro hERG チャンネル阻害	24
2.6.2.4.2	カニクイザルにおける心血管系への影響	25
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	26
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	27
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	28
2.6.2.4.6	麻酔ラットにおける心機能への影響	29
2.6.2.4.7	摘出心モデルにおける影響	31
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	33
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	34
2.6.2.4.10	ラットにおける中枢神経系への影響	35
2.6.2.4.11	ラットにおける呼吸系への影響	35
2.6.2.4.12	ラットにおける腎機能への影響	38
2.6.2.5	薬力学的薬物相互作用試験	40
2.6.2.6	考察及び結論	40
2.6.2.7	参考文献	42

表

表 2.6.2-1	各種水酸化酵素に対するロキサデュスタットの IC ₅₀ (µmol/L)	10
表 2.6.2-2	マウスにおける単回経口投与後の EPO 濃度	12
表 2.6.2-3	マウスにおける 1 週間間歇経口投与後の血液学的検査値	12
表 2.6.2-4	ラットにおける 4 週間間歇経口投与後の血液学的検査値	13
表 2.6.2-5	炎症性貧血モデルラットにおける 2 週間投与後の血液学的検査値	15
表 2.6.2-6	炎症性貧血モデルラットにおける 4 週間投与後の血液学的検査値	16
表 2.6.2-7	Sham ラットにおける 4 週間投与後の血液学的検査値	16
表 2.6.2-8	腎性貧血モデルラットにおける 2 週間投与後の血液学的検査値	18
表 2.6.2-9	リガンド結合試験の IC ₅₀ 及び Ki 値のまとめ	19

表 2.6.2-10	ラットに 15 日間間歇経口投与後の経口グルコース負荷試験における血糖値及び血漿インスリン値	21
表 2.6.2-11	ラットにおける経口投与後のコレステロール及びトリグリセリド値	23
表 2.6.2-12	hERG 電流阻害率	25
表 2.6.2-13	心拍数及び平均血圧	27
表 2.6.2-14	平均血圧及び心拍数	28
表 2.6.2-15	メトプロロール前投与群の心拍数及び平均血圧	29
表 2.6.2-16	心機能パラメータ	31
表 2.6.2-17	肺機能データ（雄）	37
表 2.6.2-18	肺機能データ（雌）	38
表 2.6.2-19	尿中電解質濃度，尿 pH 及び尿量（雄）	39
表 2.6.2-20	尿中電解質濃度，尿 pH 及び尿量（雌）	39

図

図 2.6.2-1	心拍数	26
図 2.6.2-2	心拍数の変化率	32
図 2.6.2-3	冠動脈圧の変化率	33

略語及び用語の一覧

略語及び用語	定義
BSA	ウシ血清アルブミン
BUN	血中尿素窒素
CBC	全血球計算
CCK _A	コレシストキニン A
CD	2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン
CHO	チャイニーズハムスター卵巣
CKD	慢性腎臓病
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
CREAT	クレアチニン
CV	心血管
D4.4	ドパミン受容体 D4.4
DA	ドパミン
DBD	DNA 結合ドメイン
Dcytb	十二指腸シトクロム b
DMT1	二価金属トランスポーター1
dP/dt max	左室内圧一次微分最大値
dP/dt min	左室内圧一次微分最小値
EC ₅₀	50%有効濃度
ECG	心電図
ELISA	酵素結合免疫測定法
EPO	エリスロポエチン
ESPVR	収縮末期圧容積関係
FDA	米国食品医薬局
FIH	HIF 阻害因子
GC-1	ソベチロム
GLP	医薬品安全性試験実施基準
Hamp	ヘプシジン蛋白をコードする遺伝子
Hb	ヘモグロビン
Hct	ヘマトクリット
HDL	高比重リポ蛋白コレステロール
HEK	ヒト胎児腎臓
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
HRE	HIF 応答配列
IC ₅₀	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
IL-1β	インターロイキン 1β
IL-6	インターロイキン 6
Insig-1 or -2	インスリン誘導性遺伝子 1 又は 2
K _i	阻害定数
K _{i int}	阻害定数切片
K _m	ミカエリス定数

略語及び用語	定義
LBD	リガンド結合ドメイン
LDL	低比重リポ蛋白コレステロール
MAP	平均動脈圧
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
MMTV	マウス乳がんウイルス
MONO	単球数
NE	ノルエピネフリン
NEU	好中球数
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
PLT	血小板数
PRSW	一回仕事量と拡張末期容積の関係
qPCR	定量的ポリメラーゼ連鎖反応
RBC	赤血球数
RDW	赤血球分布幅
RETI	網状赤血球数
SEAP	分泌型アルカリホスファターゼ
siRNA	低分子干渉RNA
T3	トリヨードチロニン
TIW	週3回
TNF- α	腫瘍壊死因子 α
TR	甲状腺ホルモン受容体
TR α	甲状腺ホルモン受容体 α
TR β	甲状腺ホルモン受容体 β
VEGF	血管内皮増殖因子
WBC	白血球数

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ロキサデュスタットは、経口活性のある低酸素誘導因子 (HIF) -プロリン水酸化酵素 (HIF-PH) 阻害薬である。その阻害により、転写因子である HIF- α 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。HIF 経路の活性化は、エリスロポエチン (EPO) に加え、鉄の吸収、輸送、動員及び再利用を促す種々の蛋白の産生も誘導することにより赤血球生成を促進する転写因子である [Haase, 2013]。ロキサデュスタットの薬理学的特性を明らかにするために一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。効力を裏付ける試験として、HIF-PH 阻害及び HIF 経路の活性化についてロキサデュスタットの *in vitro* 活性を評価した。ロキサデュスタットが EPO 産生及び赤血球生成に及ぼす影響は、正常なマウス及びラット、貧血モデルラットを含むげっ歯類を用いて検討した。ほとんどの反復投与試験では、臨床試験で用いる投与方法と同様にロキサデュスタットを間歇的に週 3 回 (TIW) 反復経口投与した。副次的薬理試験として、各種受容体、酵素、イオンチャンネル及びトランスポーターに対する活性を検討した。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、ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子 (hERG) チャンネルへのロキサデュスタットの作用を評価する *in vitro* 試験、心血管 (CV) 系 (カニクイザル)、呼吸系、中枢神経系 (CNS) 及び腎機能 (いずれもラット) を評価する *in vivo* 試験を GLP に準拠して実施した。さらに、ロキサデュスタットの CV 系への作用機序を評価する試験及び反復投与による CV 系への影響を評価する試験を実施した。これらの試験には、覚醒ラットを用いた経口投与及び静脈内投与試験、ラット摘出心灌流標本試験 (ランゲンドルフ試験)、麻酔ラットを用いた心機能試験、覚醒ラットを用いた局所血行動態試験及び覚醒下テレメータ装着ラットを用いた 28 日間反復経口投与試験が含まれる。

ロキサデュスタットの 2.6.2.2 効力を裏付ける試験、2.6.2.3 副次的薬理試験、及び 2.6.2.4 安全性薬理試験の結果の概要を以下に述べる。試験結果の表は 2.6.3 薬理試験概要表に示した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

ロキサデュスタットの HIF-PH 阻害薬としての効力として、一連の *in vitro* 及び *in vivo* の薬理試験において HIF 経路の活性化及び赤血球生成に対する影響を検討した。各試験の概要は 2.6.2.2 効力を裏付ける試験に述べ、概要表は 2.6.3.2 効力を裏付ける試験に示した。

2.6.2.1.1.1 HIF-PH 酵素活性の阻害

5 種類のケトグルタル酸依存性非ヘム鉄水酸化酵素活性に対するロキサデュスタットの阻害作用を評価した (2.6.2.2.1 *in vitro* 酵素阻害)。ロキサデュスタットは、HIF-PH であるプロリン水酸化酵素ドメイン (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) を競合的に阻害したが、HIF 阻害因子 (FIH) に対する活性は弱かった。Hep3B ヒト肝がん細胞に

において、ロキサデュスタットは、濃度の上昇に伴って HIF-2 α の蓄積、HIF により調節される遺伝子の転写活性化をもたらした。また、ロキサデュスタットは EPO の産生を増加させたが、その際、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 α (TNF- α) 及びインターロイキン 1 β (IL-1 β) の存在下でも EPO の産生増加が認められた (2.6.2.2.2 in vitro HIF- α 蓄積及び EPO 産生誘導)。

2.6.2.1.1.2 正常げっ歯類における EPO 産生及び赤血球生成

マウスにロキサデュスタットを単回経口投与すると、用量増に伴って血漿中 EPO 濃度は増加した (2.6.2.2.3 マウスにおける単回経口投与後の EPO 産生)。マウス又はラットにロキサデュスタットを TIW 反復経口投与すると、ヘモグロビン (Hb) 及びヘマトクリット (Hct) といった血液学的検査値が上昇した (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, 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)。

2.6.2.1.1.3 貧血モデルラットにおける赤血球生成

ラットにペプチドグリカン-多糖 (PG-PS) ポリマーを腹腔内注射することにより誘発される炎症性貧血モデルに、ロキサデュスタットを 2 週間又は 4 週間、TIW 反復経口投与すると、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) は上昇し、血清鉄値も増加した。ロキサデュスタットにより、肝におけるヘプシジン mRNA の発現が減少し、十二指腸では鉄吸収に関わる 2 種類の蛋白である、二価金属トランスポーター 1 (DMT1) 及び十二指腸シトクロム b (Dcytb, 4 週間投与) の mRNA 発現が増加した (2.6.2.2.6.1 2 週間投与, 2.6.2.2.6.2 4 週間投与)。

5/6 腎摘ラットを用いて、ロキサデュスタットの慢性腎不全に伴う貧血に及ぼす影響を検討した。2 週間に 5 回の 20 及び 40 mg/kg のロキサデュスタット経口投与により、Hb、Hct 及び赤血球数 (RBC) は用量依存的に増加した (2.6.2.2.7 腎性貧血モデルラットにおける有効性)。

2.6.2.1.1.4 代謝物の薬理的評価

ヒト血漿において、総薬物関連物質全体に対し、10%を超える血中代謝物は認められなかったため、代謝物の薬理的評価は実施しなかった (2.6.2.2.8 代謝物の効力を裏付ける試験)。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

ロキサデュスタットの副次的薬理試験として、in vitro にて各種結合試験及び酵素活性試験を実施し、また、2 つの in vivo 試験において血中のグルコース及びコレステロールに対する影響を検討した。各試験の概要は 2.6.2.3 副次的薬理試験に述べ、概要表は 2.6.3.3 副次的薬理試験に示した。

2.6.2.1.2.1 in vitro 試験

in vitro 試験として、神経伝達物質の受容体及びトランスポーター、イオンチャネル、及び特定の酵素などへの作用を評価した (2.6.2.3.1 受容体結合/酵素アッセイ)。これらの試験から、ロキ

サデュスタットはヒトコレシストキニン A (CCK_A) 受容体, ヒトノルエピネフリン (NE) トランスポーター及びヒトドパミン (DA) トランスポーターに濃度依存的に結合することが明らかになった。ロキサデュスタットは, 甲状腺ホルモン受容体 (TR) レポーターアッセイにおいて, TR β に対して弱いながらアゴニスト活性を有する可能性が示された。

2.6.2.1.2.2 ラットの耐糖能に対する作用

ロキサデュスタットの 15 日間 TIW 反復経口投与により, 糖負荷後の血糖値は用量依存的に低下し, 血漿インスリンの増加も確認された (2.6.2.3.2 ラットの耐糖能に対する作用)。これらの作用は, ロキサデュスタットの単回経口投与後には認められなかった。

2.6.2.1.2.3 コレステロールに及ぼす影響

ラットにロキサデュスタットを単回あるいは TIW 反復経口投与することにより, 空腹時血清総コレステロール, 高密度リポ蛋白コレステロール (HDL) 及び低密度リポ蛋白コレステロール (LDL) が低下した (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 の無細胞系アッセイでは評価した試験濃度範囲で, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 還元酵素 (HMGCR) 活性に対して阻害作用は認められなかった (2.6.2.3.3.2 コレステロール低下作用の作用機序)。Hep3B 細胞において, 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (CD) による HMGCR 蛋白量の増加は, ロキサデュスタット処理で大幅に減弱した。ロキサデュスタットは, HMGCR 蛋白の代謝を調節する Insig-2 の mRNA 発現を HIF 依存的に増加させた (2.6.2.3.3.2 コレステロール低下作用の作用機序)。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

安全性薬理試験は, CNS, 呼吸系, 腎臓及び CV 系へのロキサデュスタットの作用を評価するために実施した。各試験の概要は 2.6.2.4 安全性薬理試験に述べ, 概要表は 2.6.3.4 安全性薬理試験に示した。

ロキサデュスタットは, 93.2, 178.2 及び 291.2 $\mu\text{mol/L}$ の濃度において, hERG を発現したヒト胎児腎由来細胞 (HEK-293 細胞) の hERG 電流に対し, 濃度依存的な抑制作用を示した。hERG 電流阻害の IC₅₀ 値は, 析出が認められなかった濃度である 93.2 $\mu\text{mol/L}$ よりも高いと推定された (2.6.2.4.1 in vitro hERG チャンネル阻害)。

カニクイザルを用いた CV 系評価では, ロキサデュスタット 100 mg/kg の単回経口投与により, 心拍数 (HR) は最大 55%増加 (対照溶媒に比べて) したが, 30 mg/kg 以下ではいずれのパラメータ (心電図 (ECG), 血圧) にも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)。

CV 系評価に関する追加の安全性薬理試験では, 覚醒ラットにロキサデュスタットを単回静脈内ボラス投与 (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、それと同時に血圧の低下が認められた。 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の増加は抑制されたが、ロキサデュスタットにより誘発された血圧低下に対する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)。心機能試験では麻酔ラットに60 mg/kgを単回経口投与すると、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、全身血圧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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (28 $\mu\text{mol}/\text{L}$)まで、HR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)。局所血行動態試験では、覚醒ラットに30 mg/kgを単回静脈内投与すると、HRの急速な増加及び二相性の血圧応答が認められ、平均血圧は投与初期に一過性に上昇を示した後、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)。これらの作用は投与初期に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管拡張が認められた。28日間ラット反復投与試験では、20又は40 mg/kgの経口投与後に観察された1日目のHRの増加は、反復投与後15及び26日目に減弱した(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)。ロキサデュスタット40 mg/kg投与後に観察された血圧の低下は1日目と26日目は同程度であったが、15日目には認められなかった。

ラットへの300 mg/kgまでの単回経口投与では、投与に関連したCNSへの影響はいずれの用量においても認められなかった(2.6.2.4.10 ラットにおける中枢神経系への影響)。麻酔ラットへの単回静脈内投与では30 mg/kg以上で呼吸数及び分時換気量、100 mg/kgで一回換気量が増加した(2.6.2.4.11 ラットにおける呼吸系への影響)。生理食塩水を負荷したラットを用いた腎臓に対する安全性評価では、ロキサデュスタットの単回経口投与により、30 mg/kg以上で尿量、尿pH並びにナトリウム、カリウム及び塩化物の排泄量、100 mg/kg以上で尿中 K^+ 濃度が増加した(2.6.2.4.12 ラットにおける腎機能への影響)。

2.6.2.1.4 結論

ロキサデュスタットは、HIF-PH酵素の強力な経口阻害薬であり、*in vitro*でHIF-2 α を蓄積させ、その後のHIF経路により調節される遺伝子発現を増加させた。また、ロキサデュスタットは、CP4Hを阻害するが、FIHに対する活性は弱かった。ロキサデュスタットは、*in vitro*及び*in vivo*試験においてEPO産生を促したが、その際、炎症性サイトカイン(TNF- α 及びIL-1 β)の存在下でもEPOの産生が認められた。さらに、HIF経路の活性化に伴い、EPOとともに、赤血球生成に関わる鉄代謝関連蛋白質の発現が鉄の取り込み促進の方向に変動した。げっ歯類の貧血モデルにおいて、ロキサデュスタットは赤血球生成を促進した。

ロキサデュスタットは、治療用量よりも高用量の曝露により、 CCK_A 受容体やNE及びDAトランスポーターと相互作用し、また、 $\text{TR}\beta$ アイソタイプに対して、弱いながらアゴニスト活性を有

する可能性が示された。ラットにおいてロキサデュスタットの反復経口投与により糖負荷後の耐糖能の改善及びインスリン値の上昇が認められた。また、単回及び反復経口投与により血清コレステロール低下が認められた。この作用は HMGCR への直接的な阻害作用ではなく、Insig-2 の発現増加を介した HMGCR 蛋白の低下によるものと思われた。

CNS, 呼吸系, 腎臓及び CV 系への影響を評価した安全性薬理試験では、高用量曝露後の呼吸数及び HR の増加, 血圧の低下, 尿量の増加が認められた。CNS への影響は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 in vitro 酵素阻害

添付資料 4.2.1.1-1

α -[1- 14 C]-ケトグルタル酸からの $^{14}\text{CO}_2$ の放出を測定する方法を用いて、5 種類のケトグルタル酸依存性非ヘム鉄水酸化酵素活性に対するロキサデュスタットの阻害作用を検討した。

1 又は 40 $\mu\text{mol/L}$ の Fe^{2+} 存在下で、CP4H, PHD1, PHD2 及び PHD3, 並びに FIH に対するロキサデュスタットの IC_{50} 値を算出した (表 2.6.2-1)。

表 2.6.2-1 各種水酸化酵素に対するロキサデュスタットの IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)

	With BSA	Without BSA				
	CP4H	CP4H	PHD1	PHD2	PHD3	FIH
40 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+}	5.6	0.2	1.8	2.5	0.19	ND
1 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+}	ND	0.89	1.7	2.4	0.22	130

n=1, ND: not determined

ロキサデュスタットは、ケトグルタル酸と競合的に PHD1, PHD2, PHD3 及び CP4H を阻害し、 K_i 値はそれぞれ 0.10, 0.084, 0.36 及び 0.33 $\mu\text{mol/L}$ であった (Fe^{2+} 1 $\mu\text{mol/L}$ 存在下)。FIH に対する K_i 値は 200 $\mu\text{mol/L}$ 以上であった。PHD1, PHD2, PHD3, CP4H 及び FIH に対するケトグルタル酸の見かけの K_m 値 (平均値) は、それぞれ 0.35, 0.57, 4.2, 37 及び 37 $\mu\text{mol/L}$ であった。PHD2 に対し、ロキサデュスタットはペプチド基質 DLD19 及び補因子アスコルビン酸と、それぞれ不競合的及び非競合的に阻害する傾向を示した。阻害データの二次プロットにより算出された K_i 値は、DLD19 に対して 3.8 $\mu\text{mol/L}$, アスコルビン酸に対して 3.3 $\mu\text{mol/L}$ であった。PHD2 に対するペプチド基質 DLD19 及び補因子アスコルビン酸の見かけの K_m 値は、それぞれ 16 及び 9.8 $\mu\text{mol/L}$ であった。

2.6.2.2.2 in vitro HIF- α 蓄積及び EPO 産生誘導

添付資料 4.2.1.1-2

ロキサデュスタットによる正常酸素条件下での HIF- α の蓄積及び HIF 依存性遺伝子発現の誘導能について、Hep3B 細胞, 又はその派生クローン (1G6) を用いて検討した。1G6 細胞は、36 コ

ピーの HIF 応答配列 (HRE) を含み、分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) レポーター遺伝子の発現を誘導するレポータープラスミドが安定的に導入されている。また、一部の試験では HRE-SEAP レポーター配列を一過性に導入した Hep3B 細胞を用いた。

ロキサデュスタットで処理した細胞を用い、核抽出液中での HIF-2 α 分解の抑制、培養上清における SEAP の用量依存的誘導などを評価した。Hep3B 細胞又は 1G6 細胞へのロキサデュスタット処理 (それぞれ 20 $\mu\text{mol/L}$, 又は 3, 10 及び 30 $\mu\text{mol/L}$) により核内に HIF-2 α が蓄積した。1G6 細胞へのロキサデュスタット処理後の上清中 SEAP レベルは、30 $\mu\text{mol/L}$ 処理で対照溶媒処理の約 155 倍であった。また、上清中の EPO 濃度もロキサデュスタット濃度依存的に増加し、30 $\mu\text{mol/L}$ 処理で対照溶媒処理の約 34 倍であった。その際、上清中の VEGF 濃度は、対照溶媒処理の最大約 2 倍であった。EPO 応答の特性を一連の機序試験でさらに明らかにしたので、以下にまとめた。

Hep3B 細胞を炎症性サイトカインである TNF- α 及び IL-1 β の存在下で、対照溶媒又は各種濃度のロキサデュスタットで 24 又は 72 時間処理した。これらのサイトカインは Hep3B 細胞における低酸素誘導性 EPO 産生を抑制することが知られている [Faquin, 1992]。両サイトカインとも、対照溶媒処理細胞に比べ上清中の EPO 濃度を低下させた。ロキサデュスタット (30 $\mu\text{mol/L}$) は、TNF- α (0.4 ng/mL) 及び IL-1 β (10 ng/mL) の存在下においても、72 時間の未処置の対照細胞と比較して EPO 濃度を約 5.6~6.6 倍にまで増加させた。

インターロイキン 6 (IL-6) は多様な機能をもつサイトカインであり、炎症時にしばしば認められる。ある *in vivo* モデルにおいては催炎症作用を示し、またある *in vivo* モデルでは抗炎症作用を示すことが報告されている。低酸素状態で培養した Hep3B 細胞に対して、IL-6 は EPO の産生を相乗的に増加させることが報告されている [Faquin, 1992]。正常酸素状態で培養した Hep3B 細胞 (HRE-SEAP を一過性に発現) において、IL-6 (10 ng/mL) 単独では SEAP レベル又は EPO 濃度を増加させなかったが、ロキサデュスタットは IL-6 (10 ng/mL) との共刺激により、全ての試験濃度でロキサデュスタット単独で処理した培養と比較して SEAP レベル及び EPO 濃度を相乗的に増加させた。

以上、ロキサデュスタット処理により、HIF-PH の阻害に基づく HIF-2 α の急速な蓄積が誘導された。また、低酸素誘導 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 (TNF- α 及び IL-1 β) の存在下でも、ロキサデュスタットは EPO の産生を誘導した。それは機能的に HIF 依存性応答を引き起こしたためと思われる。

2.6.2.2.3 マウスにおける単回経口投与後の EPO 産生

添付資料 4.2.1.1-3

本試験の目的は、マウスにおいてロキサデュスタットの単回経口投与が血中 EPO 濃度に及ぼす影響を検討することである。

雄性 Swiss Webster マウス (1 群 4 匹) にロキサデュスタット (2, 6, 20 又は 60 mg/kg) 又は対照溶媒を単回経口投与した。投与 6 時間後に採血し、酵素結合免疫測定法 (ELISA) により血漿中の EPO 濃度を測定した。

血漿中 EPO 濃度は、6 mg/kg 以上のロキサデュスタットを投与した群で対照溶媒群よりも高かった (表 2.6.2-2)。EPO 濃度は用量増に伴って増加傾向を示し、60 mg/kg 群では対照溶媒群の約 23 倍となり、その差は統計学的に有意であった。

表 2.6.2-2 マウスにおける単回経口投与後の EPO 濃度

Roxadustat Dose (mg/kg)	0 (Control)	2	6	20	60
EPO (pg/mL)	107 ± 28	109 ± 12	160 ± 84	190 ± 62	2,511 ± 1,031*

Mean ± SD; n=4 animals/group

*p<0.05 vs. Control (Dunn's method)

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

添付資料 4.2.1.1-4

本試験の目的は、マウスにロキサデュスタットを 1 週間、TIW 反復経口投与した後の赤血球数を検討することである。

雄性 Swiss Webster マウス (1 群 8 匹) にロキサデュスタット (6, 20, 60, 100 又は 200 mg/kg) 又は対照溶媒を 3 回経口投与した。最終投与 3 日後に血液を採取し、血液学的検査及び血液生化学検査を行った。

TIW 反復経口投与後、Hb, Hct, 平均赤血球容積 (MCV), 網状赤血球数 (RETI) 及び RBC が用量増に伴って増加し、200 mg/kg 群では、これら全ての項目について対照溶媒群と比較して有意に高かった (表 2.6.2-3)。検討した最低用量 (6 mg/kg) においても Hb の統計学的に有意な増加が認められた。

表 2.6.2-3 マウスにおける 1 週間間歇経口投与後の血液学的検査値

Roxadustat Dose (mg/kg)	0 (Control)	6	20	60	100	200
WBC x10 ³ /µL	5.3 ± 0.7	6.7 ± 1.8*	5.0 ± 1.1	4.5 ± 0.9	4.0 ± 0.7	4.9 ± 1.3
RBC x10 ⁶ /µL	7.9 ± 0.5	8.2 ± 0.5	8.6 ± 0.3*	8.4 ± 0.4	8.9 ± 0.4*	9.5 ± 0.6*
Hb g/dL	13.4 ± 0.6	14.1 ± 0.5*	14.2 ± 0.5*	14.6 ± 0.5*	15.7 ± 0.6*	17.8 ± 1.0*
Hct %	39.1 ± 1.8	40.8 ± 1.4	40.9 ± 1.4	42.4 ± 1.4*	45.4 ± 1.6*	51.5 ± 2.7*
MCV fL	49.5 ± 1.0	50.1 ± 2.0	47.9 ± 1.3*	50.4 ± 1.6	51.3 ± 1.4	54.3 ± 1.7*
MCH pg	16.9 ± 0.3	17.4 ± 0.8	16.6 ± 0.4	17.4 ± 0.5	17.7 ± 0.2*	18.8 ± 0.4*
MCHC g/dL	34.1 ± 0.5	34.7 ± 0.6	34.6 ± 0.2	34.4 ± 0.5	34.6 ± 0.6	34.5 ± 0.5
PLT x10 ³ /µL	1,000 ± 51	991 ± 118	896 ± 65	980 ± 53	935 ± 77	809 ± 87*
RETI %	2.4 ± 0.5	2.3 ± 0.7	1.8 ± 0.9	3.9 ± 1.4	5.3 ± 1.0*	11 ± 3.3*
RETI x10 ³ /µL	187 ± 45	184 ± 53	152 ± 69	330 ± 113	470 ± 89*	1,050 ± 342*

Mean ± SD; n=8 animals/group

*p<0.05 versus control (Student-Newman-Keuls test)

対照溶媒群及び試験最高用量の 200 mg/kg 群から採取した血清について生化学検査を実施した。ロキサデュスタット 200 mg/kg 群の血中尿素窒素 (BUN) 及びグルコースの平均濃度は対照溶媒群より有意に低かったのに対し、総蛋白濃度は有意に高かった。その他の生化学検査値については 2 群間で有意差は認められなかった。

ロキサデュスタットは体重増加率に影響を与えなかった。一般状態の異常はいずれの群でも認められなかった。

以上、マウスにロキサデュスタット (6~200 mg/kg) を 1 週間 TIW 反復経口投与することにより、用量増に伴って赤血球生成増加が認められた。また、検討した最低用量 (6 mg/kg) でも有意に Hb を増加させた。

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

添付資料 4.2.1.1-5

本試験の目的は、投与回数の違いによる、ロキサデュスタット 4 週間投与後の赤血球生成作用を検討することである。

雄性 Sprague Dawley ラット (1 群 6 又は 8 匹) にロキサデュスタット (30 又は 60 mg/kg) 又は対照溶媒を 4 週間に亘り経口投与した。投与は 3 種類の投与回数 (週 1 回, 2 回又は 3 回) とした。毎週、血液を採取し全血球計算 (CBC) を行った。薬物投与終了 2 週間後にも CBC を行った。

ロキサデュスタット群では、対照溶媒群と比較し、試験 4 日目に血中 Hb, Hct 及び RETI が高値を示した。Hb, Hct 及び RBC の各値は投与期間とともに増加した。28 日目の CBC の結果を表 2.6.2-4 にまとめた。ロキサデュスタットの赤血球生成作用は、高用量及び高頻度投与により増加した。週 1 回投与でも、Hb 及び Hct の有意な増加を示した。薬物投与終了 2 週間後においても、30 及び 60 mg/kg 群の RBC, Hb 及び Hct の平均値はいずれの投与頻度でも、対照溶媒群よりも高かった。このことは RBC の寿命からも妥当な結果であった [Derelanko, 1987]。

表 2.6.2-4 ラットにおける 4 週間間歇経口投与後の血液学的検査値

Roxadustat Dose (mg/kg)		0 (Control)	30	60
Once Weekly Dosing	RBC x10 ⁶ /µL	7.3 ± 0.3	7.6 ± 0.4	7.8 ± 0.3
	Hb g/dL	14.7 ± 0.4	15.8 ± 0.4*	16.6 ± 0.7*
	Hct %	37.8 ± 1.4	40.8 ± 1.5*	42.4 ± 2.0*
Twice Weekly Dosing	RBC x10 ⁶ /µL	7.5 ± 0.5	8.2 ± 0.6*	8.4 ± 0.3*
	Hb g/dL	15.2 ± 0.7	17.4 ± 1.0*	19.0 ± 0.4*
	Hct %	39.0 ± 2.0	44.9 ± 3.2*	49.6 ± 1.5*
Thrice Weekly Dosing	RBC x10 ⁶ /µL	7.3 ± 0.5	8.9 ± 0.5*#	9.7 ± 0.4*\$
	Hb g/dL	14.9 ± 0.4	19.5 ± 0.5*#	20.5 ± 0.9*\$
	Hct %	37.5 ± 1.5	50.9 ± 2.1*#	55.1 ± 2.0*\$

Mean ± SD; n=6 or 8 animals/group

*p<0.05 versus respective control (Student-Newman-Keuls test)

\$p<0.05 versus 60 mg/kg once weekly and twice weekly dosing (Student-Newman-Keuls test)

#p<0.05 versus 30 mg/kg once weekly and twice weekly dosing (Student-Newman-Keuls test)

試験期間中、ロキサデュスタットは体重に影響を及ぼさず、一般状態の異常も認められなかった。

以上、ロキサデュスタットは各投与量及び投与頻度で有意に赤血球生成を促進し（週1回投与のRBCを除く）、高頻度の投与（TIW）でより大きな造血反応が認められた。

2.6.2.2.6 炎症性貧血モデルラットにおける有効性

2.6.2.2.6.1 2週間投与

添付資料 4.2.1.1-6

本試験の目的は、炎症性貧血モデルラットにおけるロキサデュスタット2週間投与の有効性を検討することである。

雌性 Lewis ラットに PG-PS ポリマーを腹腔内注射して関節炎及び貧血を誘導した（炎症性貧血ラット）。PG-PS ポリマー注射の4週間後からロキサデュスタット 40 mg/kg 又は対照溶媒（1群7～8匹）を2週間、TIW 反復経口投与した。Sham ラット（1群5匹）にはPG-PS ポリマーの代わりに生理食塩水を注射し、同様に対照溶媒又はロキサデュスタット 40 mg/kg を2週間、TIW 反復経口投与した。病態の進行は、足蹠腫脹、血液学的検査値及び血清鉄の各測定値を指標としてモニタリングした。PG-PS ポリマー注射の44日後に組織を採取し、鉄代謝関連遺伝子の mRNA 発現について定量的ポリメラーゼ連鎖反応（q-PCR）解析を行った。

炎症性貧血ラットでは、Sham 動物と比較して、薬物投与前には低色素性小球性貧血（Hb, Hct, RBC, MCV, MCHC 及び MCH の低値で判断）及び関節炎（足蹠腫脹で判断）が見られ、試験終了時にはこれらに加え血清鉄低値が認められた。

ロキサデュスタット 40 mg/kg を2週間 TIW 反復経口投与すると、炎症性貧血ラット動物における貧血の改善（Hb, Hct, RBC の増加、及び RETI の増加傾向）、小赤血球症の改善（MCV 及び MCH の増加）、色素減少症の改善（MCHC の増加）が認められた。結果を表 2.6.2-5 にまとめた。

ロキサデュスタットによる体重低下は認められなかった。ロキサデュスタットを投与した炎症性貧血ラット群の足蹠の重量及び白血球数（WBC）は炎症性貧血ラット対照溶媒群より有意に低かったことから、ロキサデュスタット投与後の足蹠炎症の軽減が示唆された。

表 2.6.2-5 炎症性貧血モデルラットにおける 2 週間投与後の血液学的検査値

Roxadustat Dose (mg/kg)	Anemic (PG-PS) Groups		Sham Groups	
	0 (Control)	40	0 (Control)	40
WBC x10 ³ /μL	37.1 ± 2.5	30.6 ± 1.3*	12.0 ± 0.4	8.8 ± 0.8
RBC x10 ⁶ /μL	7.9 ± 0.1	9.1 ± 0.1*	8.7 ± 0.2	10.0 ± 0.3*
Hb g/dL	11.6 ± 0.3	15.0 ± 0.3*	15.3 ± 0.4	19.6 ± 0.4*
Hct %	33.5 ± 0.6	42.2 ± 0.8*	43.1 ± 0.9	54.5 ± 0.9*
MCV fL	42.3 ± 0.3	46.4 ± 0.5*	49.3 ± 0.3	54.5 ± 0.8*
MCH pg	14.7 ± 0.1	16.5 ± 0.3*	17.5 ± 0.1	19.7 ± 0.2*
MCHC g/dL	34.6 ± 0.2	35.6 ± 0.3*	35.5 ± 0.2	36.1 ± 0.2
RDW %	23.8 ± 0.5	35.9 ± 1.1*	15.9 ± 0.1	28.1 ± 1.8*
RETI %	4.9 ± 0.9	7.1 ± 1.3	4.5 ± 2.1	9.4 ± 0.9*
RETI x10 ³ /μL	387 ± 67.8	644 ± 117	380 ± 172	944 ± 89.5*

Mean ± SEM; n=7-8 animals per PG-PS groups; n=4 animals per Sham groups (1 sample from each Sham group was excluded due to clotting)

*p<0.05 versus respective control (Student-Newman-Keuls test)

ロキサデュスタットは、炎症性貧血ラットでは血清鉄の項目に有意な影響を及ぼさなかったのに対し、Sham ラットでは有意に高い総鉄結合能及び不飽和鉄結合能を誘導した。ロキサデュスタットは、Sham ラットにおいて十二指腸での鉄トランスポーターDMT1 (Slc11a2) mRNA を有意に高発現させ、炎症性貧血ラットにおいて肝でのヘプシジン (Hamp) mRNA の発現を有意に低下させた。

以上、ロキサデュスタット (40 mg/kg) を 2 週間 TIW 反復経口投与すると、炎症性貧血ラット動物の低色素性小球性貧血が有意に改善し、また、関節炎に伴う足蹠炎症が軽減した。ロキサデュスタット投与により、炎症性貧血動物の肝でのヘプシジン mRNA の発現が低下した。Sham ラットでは十二指腸での鉄トランスポーターDMT1 mRNA の発現が上昇した。

2.6.2.2.6.2 4 週間投与

添付資料 4.2.1.1-7

同じ炎症性貧血モデルラットにおいて、ロキサデュスタットが低用量 (30 mg/kg) の長期間 (4 週間) 投与でも有効であるかを検討するため、追加試験を実施した。

雌性 Lewis ラットに PG-PS ポリマーを腹腔内注射することにより、炎症性貧血モデルを作製した。PG-PS ポリマー注射の 4 週間後からロキサデュスタット (30 mg/kg) 又は対照溶媒 (1 群 8 匹) を 4 週間、TIW 反復経口投与した。別の群の炎症性貧血ラットにダルベポエチン (30 μg/kg) を 4 週間、隔週で静脈内投与し、さらに別の群の炎症性貧血ラットにはグルコン酸ナトリウム第二鉄塩複合物 (1.5 mg/kg) を 4 週間、週 1 回静脈内投与した (1 群 7 匹)。PG-PS ポリマーを注射しなかった Sham ラットには、対照溶媒、ロキサデュスタット、ダルベポエチン及びグルコン酸ナトリウム第二鉄塩複合物を投与した (1 群 4 匹)。病態の進行は、血液学的検査値を指標としてモニタリングした。また、足蹠腫脹及び血液試料の鉄関連項目を測定した。PG-PS ポリマー注射の 8 週間後に組織を採取し、鉄代謝関連遺伝子の mRNA 発現について q-PCR 解析を行った。

炎症性貧血ラットでは、薬物投与前には低色素性小球性貧血（Hb, Hct, RBC, MCV, MCHC 及び MCH の低値で判断）がみられ、また試験終了時には血清鉄低値及び関節炎（足蹠重量増で判断）が認められた。Sham ラットにロキサデュスタットを4週間投与すると赤血球生成反応（Hb, Hct, RBC, MCV 及び MCH の増加）が誘導された。炎症性貧血ラットでは貧血の改善（Hb, Hct 及び RBC の増加）、小赤血球症の改善（MCV 及び MCH の増加）、及び血色素減少症の改善（MCHC 増加）が認められた。これに対し、ダルベポエチンは Sham ラットのみで赤血球生成反応（Hb, Hct 及び RBC の増加）を誘導し、炎症性貧血ラットの貧血を改善しなかった。グルコン酸第二鉄ナトリウムは、Sham ラット及び炎症性貧血ラットのいずれにおいても赤血球生成を誘導しなかった。血液学的検査の結果について、炎症性貧血ラットの値を表 2.6.2-6, Sham ラットの値を表 2.6.2-7 にまとめた。

表 2.6.2-6 炎症性貧血モデルラットにおける4週間投与後の血液学的検査値

	0 (Control)	Roxadustat 30 mg/kg	Darbepoetin 30 µg/kg	Sodium Ferric Gluconate Complex 1.5 mg/kg
RBC x10 ⁶ /µL	7.33 ± 0.25	8.61 ± 0.22*	7.81 ± 0.32	7.41 ± 0.17
Hb g/dL	9.5 ± 0.4	13.6 ± 0.3*	10.1 ± 0.5	9.6 ± 0.3
Hct %	28.8 ± 1.1	38.5 ± 1.0*	30.1 ± 1.2	29.0 ± 0.7
MCV fL	39.3 ± 0.5	44.8 ± 0.4*	38.6 ± 0.3	39.1 ± 0.2
MCH pg	13.0 ± 0.2	15.9 ± 0.4*	13.0 ± 0.1	13.0 ± 0.1
MCHC g/dL	33.0 ± 0.3	35.5 ± 0.6*	33.7 ± 0.3	33.2 ± 0.2
RDW %	26.2 ± 0.6	32.7 ± 0.8*	27.2 ± 1.1	27.7 ± 0.7
WBC x10 ³ /µL	32.2 ± 3.1	24.0 ± 2.9	36.2 ± 3.0	37.4 ± 5.4
MONO x10 ³ /µL	6.9 ± 1.4	2.3 ± 0.7*	6.7 ± 1.1	6.5 ± 1.3
NEU x10 ³ /µL	14.4 ± 1.3	11.0 ± 1.3	17.0 ± 1.5	16.8 ± 2.3

Roxadustat was dosed three times weekly via gavage. Darbepoetin or sodium ferric glucose complex were dosed every other week or once per week, respectively, by intravenous injection.

Mean ± SEM; n=7-8 animals/group

*p<0.05 versus control (Student-Newman-Keuls test)

表 2.6.2-7 Sham ラットにおける4週間投与後の血液学的検査値

	0 (Control)	Roxadustat 30 mg/kg	Darbepoetin 30 µg/kg	Sodium Ferric Gluconate Complex 1.5 mg/kg
RBC x10 ⁶ /µL	8.23 ± 0.09	10.17 ± 0.16*	11.96 ± 0.43*	8.07 ± 0.16
Hb g/dL	14.4 ± 0.2	19.5 ± 0.1*	19.8 ± 0.4*	14.1 ± 0.3
Hct %	41.2 ± 0.4	54.9 ± 0.6*	56.0 ± 1.1*	39.8 ± 0.7
MCV fL	50.0 ± 0.1	54.1 ± 0.2*	46.9 ± 0.9*	49.3 ± 0.1
MCH pg	17.5 ± 0.1	19.1 ± 0.1*	16.6 ± 0.3	17.4 ± 0.1
MCHC g/dL	35.0 ± 0.2	35.4 ± 0.2	35.3 ± 0.2	35.4 ± 0.2
RDW %	15.5 ± 0.3	25.9 ± 0.4*	25.8 ± 1.0*	16.1 ± 0.2
WBC x10 ³ /µL	5.2 ± 0.4	7.1 ± 0.6	5.6 ± 1.3	4.5 ± 0.4
MONO x10 ³ /µL	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0
NEU x10 ³ /µL	0.7 ± 0.1	2.4 ± 0.4	1.9 ± 0.4	0.8 ± 0.1

Roxadustat was dosed three times weekly via gavage. Darbepoetin or sodium ferric glucose complex were dosed every other week or once per week, respectively, by intravenous injection.

Mean ± SEM; n=4 animals/group

*p<0.05 versus control (Student-Newman-Keuls test)

ロキサデュスタットにより炎症性貧血ラットで血中の単球数 (MONO) が有意に減少したことから、このラットで炎症が抑制されたことが示唆されるが、足蹠腫脹に対する有意な影響は認められなかった。

血清鉄濃度は、炎症性貧血ラットで低値となった。炎症性貧血ラットでは、対照溶媒と比較して、ロキサデュスタットにより血清鉄値及びトランスフェリン飽和度が有意に増加したのに対し、グルコン酸第二鉄ナトリウム及びダルベポエチンは血清鉄の項目に有意な影響を及ぼさなかった。

遺伝子発現については、炎症性貧血ラットにおいて、対照溶媒と比較してロキサデュスタットにより、肝でのヘプシジン mRNA の発現は有意に減少し、十二指腸での鉄トランスporter-DMT1 (Slc11a2) mRNA 及び還元酵素 Dcytb mRNA の発現は有意に増加した。ダルベポエチン及びグルコン酸第二鉄ナトリウムは鉄代謝関連遺伝子に対してロキサデュスタット様の作用を示さなかった。

以上、ロキサデュスタットの TIW 反復経口投与により、炎症性貧血ラットで見られた低色素性小球性貧血が軽減された。また、肝でのヘプシジン mRNA 発現の減少、十二指腸での DMT1 及び Dcytb の mRNA 発現の増加、鉄状態の改善が認められた。これに対し、ダルベポエチンは、Sham ラットの Hb を 5 g/dL 以上増加させる用量を炎症性貧血ラットに投与しても、貧血を改善しなかった。

2.6.2.2.7 腎性貧血モデルラットにおける有効性

添付資料 4.2.1.1-8

本試験の目的は、左腎 2/3 の梗塞と同時対側腎切除 (5/6 腎摘) により誘導される腎性貧血モデルラットにおいて、ロキサデュスタット 2 週間投与の有効性を検討することである。

雄性 Sprague Dawley ラットに 5/6 腎摘出術又は擬似手術を施し、5 週間で貧血を発症させた。5/6 腎摘手術を施したラット (腎性貧血ラット, 1 群 8~9 匹) にロキサデュスタット (20 又は 40 mg/kg) 又は対照溶媒を 2 週間に亘って経口投与した。高用量の 40 mg/kg は、炎症性貧血モデルラットで効果がみられたことから選択した (2.6.2.2.6 炎症性貧血モデルラットにおける有効性)。低用量の 20 mg/kg は、貧血の改善に有効なロキサデュスタットの用量範囲を検討するために選択した。擬似手術を施したラット (Sham ラット) には、ロキサデュスタット (20 mg/kg) 又は対照溶媒を投与した。全ての投与は、1 週目は TIW、翌週は週 2 回とした。毎週、全血の血液学的検査と血清の血液生化学検査を実施した。また、2 週間投与後の血清鉄も評価した。

腎性貧血ラットでは Sham ラットに比べ体重が減少し、Hb、Hct 及び RBC の各値が低下したことから、貧血の発症が確認された。また、腎性貧血ラットでは BUN 及びクレアチニン (CREAT) の値も Sham ラットと比べて高かったことから、腎不全の発症が確認された。

ロキサデュスタットを 2 週間、TIW 反復経口投与したところ、いずれの群でも体重が増加した。腎性貧血ラットにロキサデュスタットを投与した結果、両用量とも対照溶媒群と比較して、Hb、Hct 及び RBC は有意に増加した。結果を表 2.6.2-8 にまとめた。

表 2.6.2-8 腎性貧血モデルラットにおける 2 週間投与後の血液学的検査値

Roxadustat Dose (mg/kg)	Sham		5/6 Nephrectomized		
	0 (Control)	20	0 (Control)	20	40
WBC x10 ³ /μL	12.3 ± 2.6	15.2 ± 2.6	15.3 ± 3.9	16.2 ± 4.3	16.0 ± 4.9
RBC x10 ⁶ /μL	8.8 ± 0.4	9.6 ± 0.4	7.0 ± 1.0	8.2 ± 0.7*	9.0 ± 0.7*
Hb g/dL	15.0 ± 0.5	17.8 ± 0.9*	12.7 ± 1.6	15.8 ± 0.9*	17.9 ± 1.9*
Hct %	44.1 ± 1.5	50.8 ± 2.2*	37.3 ± 4.3	45.5 ± 2.3*	51.1 ± 4.7*
MCV fL	50.3 ± 1.2	52.8 ± 1.5*	53.7 ± 2.7	56.0 ± 3.1*	56.5 ± 1.1*
MCH pg	17.1 ± 0.3	18.4 ± 0.6*	18.3 ± 1.1	19.5 ± 1.1*	19.8 ± 0.7*
MCHC g/dL	34.0 ± 0.5	34.9 ± 0.6	34.1 ± 1.0	34.8 ± 0.6	35.0 ± 0.8
RDW %	16.5 ± 0.7	21.4 ± 2.8*	17.7 ± 2.3	23.6 ± 3.5*	28.9 ± 3.9*
RETI %	4.5 ± 0.9	6.5 ± 1.3	9.6 ± 6.5	8.9 ± 5.1	9.0 ± 2.7
RETI x10 ³ /μL	389 ± 64	621 ± 135	617 ± 258	699 ± 325	795 ± 184

Mean ± SD; n=8-9 animals/group

*p<0.05 versus respective control (Student-Newman-Keuls test)

ロキサデュスタットは、投与 2 週後の腎性貧血ラット及び Sham ラットの CREAT, BUN 又は血清鉄に影響を及ぼさなかった。

以上、ロキサデュスタット (20 及び 40 mg/kg) を腎性貧血ラットに 2 週間 TIW 反復経口投与することにより、貧血が用量依存的に改善された (Hb, Hct 及び RBC)。一方、腎機能の血清マーカーへの影響は認められなかった。

2.6.2.2.8 代謝物の効力を裏付ける試験

代謝物の薬理的評価は実施しなかった。これは、FDA Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry Nov 2016 (FDA の医薬品代謝物の安全性試験ガイダンス 2016 年 11 月) (ICH ガイドラインを導入)

[<https://www.fda.gov/ucm/groups/fdagov-public/@fdagov-drugs-gen/documents/document/ucm079266.pdf>] に従い、ヒト血漿において、総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められなかったためである (2.6.4.5.3 動物種間の血漿中代謝物の比較)。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 受容体結合/酵素アッセイ

2.6.2.3.1.1 スクリーニング試験

添付資料 4.2.1.2-1

ロキサデュスタットの試験として、67 個の in vitro 放射性リガンド受容体結合試験と 16 個の in vitro 酵素活性試験を実施した。試験は [REDACTED] ([REDACTED], フランス) により確立された標準的な条件下で、濃度を 10 μmol/L として実施した。ロキサデュスタットは 4 つの試験で 35%を超える阻害を示した。すなわち、ロキサデュスタットのそれぞれ特異的な放射性リガンド結合に対

する阻害率は、ヒト CCK_A 受容体試験で 44%、ヒト DA 受容体 D4.4 (D4.4) 試験で 39%、ヒト NE トランスポーター試験で 46%、ヒト DA トランスポーター試験で 47%であった。

2.6.2.3.1.2 濃度反応試験

添付資料 4.2.1.2-2

ロキサデュスタット 10 μmol/L を用いたスクリーニング試験において、有意な阻害が認められた CCK_A 受容体、DA 受容体 D4.4、NE トランスポーター、及び DA トランスポーターについて (2.6.2.3.1.1 スクリーニング試験)、ロキサデュスタットによるリガンド結合阻害の濃度-反応曲線を作成した。試験には各ヒト標的蛋白を発現させたチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を用い、種々の濃度のロキサデュスタット存在下で標的蛋白に対する放射性リガンドの結合を測定した。

DA 受容体 D4.4 に対するリガンド結合の阻害率は、ロキサデュスタット濃度が試験最高濃度の 100 μmol/L まで 25%未満であった。リガンド結合阻害の明らかな濃度-反応曲線は、CCK_A 受容体試験と DA 及び NE トランスポーター試験で得られた。各試験における結合阻害の IC₅₀ 値と K_i 値を表 2.6.2-9 に示す。以上より、in vitro 結合データから、ロキサデュスタットはヒト CCK_A 受容体、ヒト NE トランスポーター及びヒト DA トランスポーターに濃度依存的に結合することが示された。

表 2.6.2-9 リガンド結合試験の IC₅₀ 及び K_i 値のまとめ

Assay	IC ₅₀ (μmol/L)	K _i (μmol/L)
CCK _A receptor	9.9	7.4
DA receptor D4.4	Not calculable	Not calculable
NE transporter	15	11
DA transporter	18	11

2.6.2.3.1.3 甲状腺ホルモン受容体放射性リガンド結合試験

添付資料 4.2.1.2-3

ロキサデュスタットの TR への結合能を検討した。試験では、ラット肝臓の膜画分の TR と [¹²⁵I] トリヨードチロニンとの結合に対する阻害作用を評価した。陽性対照薬物として、内因性 TR リガンドであるトリヨードチロニン (T3)、及び TR アゴニストであるソベチロム (GC-1) を用いた。

本試験において、T3 及び GC-1 の IC₅₀ 値は、それぞれ 66 pmol/L 及び 45 pmol/L であったのに対し、ロキサデュスタットの IC₅₀ 値は 0.13 μmol/L であった。これらの結果から、ロキサデュスタットはラット肝の TR に結合能を有するが、その結合親和性は T3 及び GC-1 よりそれぞれ約 2000 倍及び約 2900 倍弱いことが確認された。

2.6.2.3.1.4 TR_α 及び TR_β レポーターアッセイ

添付資料 4.2.1.2-4, 4.2.1.2-5

██████████ (██████████, 米国) にて TR α 及び TR β レポーターアッセイを用いて、ロキサデュスタットが TR の転写活性を調節する可能性を検討した。これらのアッセイに使用されたレポーター細胞は、ヒト TR の天然型 N 末端 DNA 結合ドメイン (DBD) を酵母の Gal4 DBD に置換したハイブリッド型受容体を発現している。このレポーター細胞は、Gal4 上流の活性化配列に機能的に連結したルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むため、ハイブリッド型 TR が活性化されると定量可能なルシフェラーゼが発現する。

TR α レポーター細胞において、T3 及び GC-1 はいずれもルシフェラーゼ活性をそれぞれ最大 3396 倍及び 2276 倍増加させ、それらの EC₅₀ 値はそれぞれ 5.1 nmol/L 及び 347 nmol/L であった。これに対し、ロキサデュスタットを最大 300 μ mol/L の濃度まで処理したところ、その濃度範囲内でのルシフェラーゼ活性化は最大でも 36 倍であった。これは、T3 で得られた最大活性化値の 1.0% であった。ロキサデュスタットの EC₅₀ 値は算出できなかった。

TR β レポーター細胞において、T3 及び GC-1 はいずれもルシフェラーゼ活性をそれぞれ最大 3863 倍及び 3969 倍増加させ、それらの EC₅₀ 値はそれぞれ 75 nmol/L 及び 2.6 μ mol/L であった。これに対し、ロキサデュスタットを 300 μ mol/L の濃度まで検討したところ、その濃度範囲内でのルシフェラーゼ活性化は最大でも 56 倍であった。これは、T3 で得られた最大活性化の 1.5% であった。ロキサデュスタットの EC₅₀ 値は算出できなかった。

さらに、別のレポーターアッセイ系、すなわち、██████████ (██████████, 米国) による GeneBLAzer TR α 及び TR β レポーターアッセイを用いて、ロキサデュスタットが TR の転写活性を調節する可能性を検討した。

██████████ TR アッセイに使用されるレポーター細胞は、HEK293T 細胞にヒト TR のリガンド結合ドメイン (LBD) と酵母 Gal4 の DBD の融合蛋白を発現している。このレポーター細胞は、Gal4 上流の活性化配列に機能的に連結させた β -ラクタマーゼレポーター遺伝子も含まれるため、TR LBD がアゴニストで活性化されると定量可能な β -ラクタマーゼが発現する。

TR α レポーター細胞における T3 及び GC-1 の EC₅₀ 値はそれぞれ 59 pmol/L 及び 1.8 nmol/L であった。ロキサデュスタットを最大 300 μ mol/L の濃度まで検討したところ、その濃度範囲内で得られた活性化倍率は最大で T3 の最大活性化値の 15% であった。ロキサデュスタットの EC₅₀ 値は算出できなかった。

TR β レポーター細胞における T3 及び GC-1 の EC₅₀ 値はそれぞれ 208 pmol/L 及び 574 pmol/L であった。ロキサデュスタットを最大 300 μ mol/L の濃度まで処理したところ、その濃度範囲内で得られた活性化倍率は最大で T3 の最大活性化値の 39% であり、EC₅₀ 値は 0.2 μ mol/L と算出された。

2.6.2.3.2 ラットの耐糖能に対する作用

添付資料 4.2.1.2-6

ラット及びカニクイザルを用いた毒性試験において、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 ラットにおける 26 週間間歇投与試験; カニクイザル: 2.6.6.3.7 カニクイザルにおける 4 週間連日投与試験, 及び 2.6.6.3.8 カニクイザルにお

ける 22 週間間歇投与試験)。本試験の目的は、ラットの経口耐糖能試験時のグルコース恒常性に対するロキサデュスタットの影響を検討することである。

雄性 Sprague Dawley ラットにロキサデュスタット (12.5, 25 又は 50 mg/kg) 又は対照溶媒を単回経口投与、又は 15 日間 TIW 反復経口投与した (1 群 8 匹)。単回投与試験では投与の 6 時間後、15 日間投与試験では最終投与の 6 時間後に、一晩絶食条件下で経口グルコース (2 mg/g) 負荷試験を実施した。各動物から、グルコース負荷前、負荷 10, 30, 60 及び 120 分後に血液を採取した。各時点で、血糖値を速やかに測定し、さらに血漿中のインスリン濃度及びロキサデュスタット濃度を測定した。

ロキサデュスタット (12.5, 25 又は 50 mg/kg) の単回経口投与 6 時間後に実施した経口グルコース負荷試験では、いずれのロキサデュスタット群とも対照溶媒群と比較して血糖値及びインスリン濃度の有意な変化は見られなかった。

一方、ロキサデュスタットを 15 日間 TIW 反復経口投与したところ、グルコース負荷後の血糖値上昇が抑制され、その効果は高用量のほうが低用量より大きかった (表 2.6.2-10)。また、グルコース負荷後の血漿インスリン濃度は増加した。血漿中のロキサデュスタット濃度は単回経口投与と 15 日間 TIW 反復経口投与で同様であった。これらの結果から、ロキサデュスタットの 15 日間 TIW 反復経口投与により経口グルコース負荷後の血糖値上昇は有意に抑制され、その作用は血漿インスリンの増加を伴うことが示された。

表 2.6.2-10 ラットに 15 日間間歇経口投与後の経口グルコース負荷試験における血糖値及び血漿インスリン値

Parameter	Time (minutes)	Roxadustat Dose (mg/kg)			
		0 (Control)	12.5	25	50
Glucose mg/dL	0	108 ± 9	106 ± 15	96 ± 10	87 ± 7
	10	158 ± 25	153 ± 22	131 ± 13*	109 ± 7*
	30	172 ± 26	161 ± 10	140 ± 20*	114 ± 13*
	60	188 ± 33	165 ± 24*	145 ± 13*	132 ± 15*
	120	139 ± 21	130 ± 18	112 ± 10*	104 ± 9*
Insulin pg/mL	0	286 ± 97	391 ± 399	484 ± 332	561 ± 470
	10	1,026 ± 524	1,406 ± 1,150	1,709 ± 903	1,905 ± 1,263*
	30	916 ± 314	1,211 ± 511	1,794 ± 575*	1,452 ± 625
	60	797 ± 411	1,014 ± 627	1,197 ± 430	1,157 ± 559
	120	409 ± 179	527 ± 281	723 ± 325	625 ± 316

Mean ± SD; n=7-8 animals/group

*p<0.05 versus control at same timepoint (Bonferroni post-test)

2.6.2.3.3 コレステロールに及ぼす影響

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

添付資料 4.2.1.2-7

毒性試験においてロキサデュスタットを反復経口投与したとき、血中コレステロール値はカニクイザルでは用量依存的な減少、ラットでも減少が認められた（ラット：2.6.6.3.5 F344 ラットにおける26週間間歇投与試験, カニクイザル:2.6.6.3.7 カニクイザルにおける4週間連日投与試験, 2.6.6.3.8 カニクイザルにおける22週間間歇投与試験, 及び2.6.6.3.9 カニクイザルにおける52週間間歇投与試験）。本試験の目的は、ラットにロキサデュスタットを単回又は4週間TIW反復経口投与したときに、本薬がコレステロール及びトリグリセリドの血清中濃度に及ぼす影響を検討することである。

雄性Sprague Dawleyラット(1群10匹)に对照溶媒またはロキサデュスタットを単回(60 mg/kg)もしくは4週間(15及び30 mg/kg)TIW反復経口投与した。単回投与試験では、初回投与の2日前まで(ベースライン)、及び投与24時間後に絶食条件下で血液を採取し、脂質パラメータ及びグルコースを測定した。TIW反復投与試験では、ベースライン、及び初回、7回目及び13回目(最終)の投与24時間後に絶食条件下で血液を採取し、脂質パラメータ及びグルコースを測定した。また、最終投与後、血液試料を採取して血液学的検査を実施した。

全群とも、ベースラインの血清の総コレステロール、LDL、HDL、トリグリセリド及びグルコースは同様であった。对照溶媒群の総コレステロール及びLDLは投与後全ての採血時点において、HDLは最終採血時点においてベースラインと比較して減少した。ロキサデュスタット群ではいずれの用量、いずれの採血時点においても、ベースラインと比較し、血清の総コレステロール、HDL及びLDLは有意に低下し、その低下の程度は对照溶媒群より大きかった。TIW反復経口投与ラットにおけるこれらの減少は用量依存的であった。LDLは、ロキサデュスタット初回投与後(15、30又は60 mg/kgでそれぞれ1、3又は1例)、7回目投与後(30 mg/kgで4例)、及び13回目投与後(15又は30 mg/kgでそれぞれ2又は5例)に定量限界以下となった。LDL/HDL比もロキサデュスタット群で对照溶媒群より低い傾向があり、30 mg/kgの初回投与後のみ統計学的な有意差が認められた。4週間の投与後、30 mg/kg群のLDL/HDL比は对照溶媒群の値と同様であった。この時点でLDL/HDL比が正常値まで回復したのは、LDLが定量限界又はわずかに上回る程度で推移したのに対し、HDLが経時的に減少したためであった(表2.6.2-11)。

血清トリグリセリドは、ロキサデュスタットの初回投与後に用量依存的に増加し、30及び60 mg/kg群では对照溶媒群と比較して有意差が認められた。30 mg/kg群の増加は投与2週及び4週後も維持された(表2.6.2-11)。空腹時血糖値は、60 mg/kg単回投与群、及びいずれの用量のTIW反復投与群とも、どの時点でも对照溶媒群と統計学的な有意差は認められなかった。TIW反復経口投与ラットにおける最終投与24時間後の血中Hb、Hct、及びRBCは、ロキサデュスタットの用量に依存して有意に増加した。この結果は、ロキサデュスタットのHIF-PH阻害を介したHIF経路の活性化による赤血球生成作用と一致した。

以上、ロキサデュスタットのTIW反復経口投与により、用量依存的に、空腹時血清総コレステロール、HDL及びLDLが低下し、空腹時血清トリグリセリドが増加した。これらの変化は、初回投与後から認められた。LDL/HDL比もロキサデュスタット投与後に低下する傾向があった。ま

た、ロキサデュスタットはいずれの時点でも空腹時血糖値に影響を及ぼさなかった。赤血球生成はロキサデュスタットのTIW 反復経口投与により用量依存的に増加した。

表 2.6.2-11 ラットにおける経口投与後のコレステロール及びトリグリセリド値

Roxadustat Dose (mg/kg)	Time (days)	Intermittent Dosing			Single Dose
		0 (Control)	15	30	60
Triglycerides mg/dL	Baseline	49 ± 4	59 ± 6	65 ± 5	53 ± 5
	2	41 ± 3	63 ± 5	104 ± 18†	98 ± 12#†
	16	41 ± 3	53 ± 3	90 ± 14†	-
	30	36 ± 3*	67 ± 4	94 ± 15†	-
Total cholesterol mg/dL	Baseline	64 ± 4	64 ± 4	66 ± 4	63 ± 4
	2	50 ± 2*	40 ± 3*	35 ± 2*†	37 ± 2#†
	16	49 ± 2*	37 ± 3*†	28 ± 2*†	-
	30	45 ± 2*	35 ± 2*	25 ± 1*†	-
HDL mg/dL	Baseline	49 ± 3	48 ± 3	50 ± 3	49 ± 3
	2	43 ± 2	32 ± 2*†	25 ± 1*†	27 ± 2#†
	16	44 ± 2	33 ± 2*†	22 ± 2*†	-
	30	40 ± 2*	29 ± 2*†	17 ± 1*†	-
LDL mg/dL	Baseline	17 ± 2	17 ± 2	17 ± 2	17 ± 1
	2	11 ± 1*	7 ± 1*†	4 ± 0.2*†	5 ± 0.5#†
	16	11 ± 1*	6 ± 1*†	4 ± 0.2*†	-
	30	9 ± 1*	5 ± 1*	4 ± 0.1*†	-
LDL/HDL Ratio	Baseline	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.03
	2	0.26 ± 0.02*	0.21 ± 0.02*	0.18 ± 0.01*†	0.21 ± 0.02#
	16	0.24 ± 0.01*	0.18 ± 0.01*	0.20 ± 0.01*	-
	30	0.22 ± 0.01*	0.18 ± 0.01*	0.24 ± 0.02*	-

Mean ± SEM; n=10 animals/group

LDL values that were lower than the lower limit of quantification were replaced with the lower limit of quantification (3.86 mg/dL) for calculation.

*p<0.05 versus respective baseline (Dunnett's post-test)

†p<0.05 versus control at same time point (Bonferroni post-test)

#p<0.05 versus baseline (paired t-test)

-Not applicable

2.6.2.3.3.2 コレステロール低下作用の作用機序

添付資料 4.2.1.2-8, 4.2.1.2-9

ロキサデュスタットの *in vivo* コレステロール低下作用の機序を検討するため、*in vitro* 試験として、コレステロール生合成経路の律速酵素である HMGCR に対する影響を検討した。

まず、無細胞系酵素アッセイを用いてロキサデュスタットの HMGCR 酵素活性に及ぼす影響を検討したところ、本薬は 0.33~100 μmol/L の濃度範囲で阻害作用を示さなかった。

次に、ヒト Hep3B 肝がん細胞を用いて、ロキサデュスタットの細胞内 HMGCR 蛋白濃度に及ぼす影響を検討した。細胞を対照溶媒又はロキサデュスタット (30 又は 60 μmol/L) で 24 時間前処

理後、培地を除去し、細胞膜からコレステロールを除去する薬物である CD（終濃度 1%）で 1 時間処置した。その後再び培地を除去し、細胞を対照溶媒又はロキサデュスタット（30 又は 60 $\mu\text{mol/L}$ ）の存在下で 6 時間処置した。CD 処置した対照溶媒処理細胞の HMGCR 蛋白濃度は、CD 処置しなかった細胞と比較して増加した（ウエスタンブロット解析）。この CD 処置による HMGCR 蛋白濃度の増加は、ロキサデュスタット処理により大幅に低下した。

さらに、ロキサデュスタットが HMGCR 蛋白濃度に及ぼす影響が HIF 依存的かを検討した。Hep3B 細胞に対照（非標的）低分子干渉リボ核酸（siRNA）又は HIF-1 α と HIF-2 α の両方の遺伝子発現を抑制する siRNA のいずれかをトランスフェクションした。2 日後、細胞を CD 1% で 1 時間処置した。その後さらに、細胞を対照溶媒又はロキサデュスタット（60 $\mu\text{mol/L}$ ）の存在下で 6 時間処理した。上記の結果同様、対照 siRNA 細胞では、対照溶媒処理と比較してロキサデュスタットは、CD 処置後の HMGCR 蛋白濃度を低下させた。HIF-1 α /HIF-2 α siRNA で前処理した細胞では、ロキサデュスタットによる HMGCR 蛋白濃度の低下作用は認められなかったことから、ロキサデュスタットが HMGCR に及ぼす影響は、HIF 依存的であることが示唆された。

HMGCR 蛋白の代謝は小胞体膜蛋白 Insig-1 及び Insig-2 により制御されていることから [Nguyen, 2007], 上述の siRNA 実験の際、ロキサデュスタットが Insig の mRNA 量に影響を及ぼすかを検討した。ロキサデュスタットにより Insig-1 及び Insig-2 の mRNA 発現が HIF 依存的に増加した。その際、Insig-2 の mRNA 増加は Insig-1 の mRNA 増加より大きかった。

これらの *in vitro* 試験から、ロキサデュスタットは HMGCR 酵素活性を直接的には阻害しないものの、HIF 依存的に細胞内の HMGCR 蛋白濃度を制御することが示唆された。ロキサデュスタットによる HMGCR 蛋白濃度の制御は Insig-2 の発現増加による可能性が高く、そのことが *in vivo* で認められる本薬によるコレステロール低下作用に関与すると考えられる。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 *in vitro* hERG チャネル阻害

添付資料 4.2.1.3-1

本試験の目的は、ロキサデュスタットが hERG チャネルを介するカリウム電流（hERG 電流）を阻害する潜在的可能性を評価することである。

hERG チャネルを安定発現させた HEK293 細胞を用いて、voltage clamp 法により hERG 電流への影響を検討した *in vitro* 試験により、測定濃度 93.2, 178.2 及び 291.2 $\mu\text{mol/L}$ において、ロキサデュスタットを評価した。被験物質適用 12 分後の時点での最大 tail 電流を、各濃度 3 又は 4 個の別個の細胞を用いて測定した。最終濃度 60 nmol/L のテルフェナジンを陽性対照として用いた。

ロキサデュスタットの hERG チャネルに対する作用を表 2.6.2-12 に示す。178.2 及び 291.2 $\mu\text{mol/L}$ の測定濃度で析出が観察されたため、ロキサデュスタットによる hERG 電流阻害の正確な IC₅₀ 値を算出できなかったが、析出が認められなかった最高濃度の 93.2 $\mu\text{mol/L}$ よりも高いと推定した。

表 2.6.2-12 hERG 電流阻害率

Roxadustat Dose ($\mu\text{mol/L}$)	0 (Control)	93.2	178.2	291.2	Terfenadine (60 nmol/L)
Number of Cells	3	3	4	3	3
% Inhibition	0.4 \pm 0.2	16.8 \pm 1.8*	38.2 \pm 1.7*	52.8 \pm 1.9*	84.3 \pm 2.9

Mean \pm SEM; * p <0.05 vs. control (Dunnett's multiple comparisons)

2.6.2.4.2 カニクイザルにおける心血管系への影響

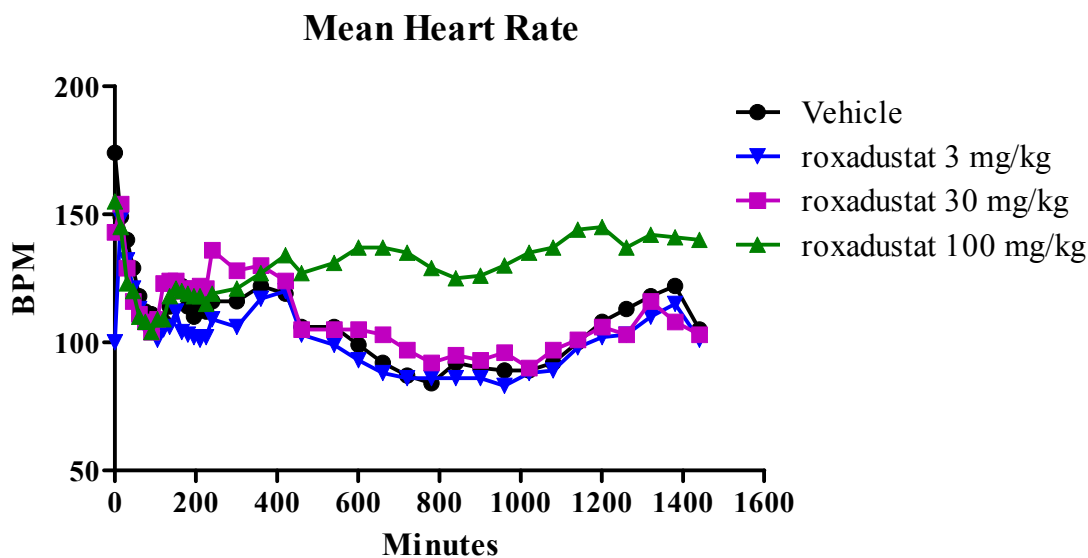
添付資料 4.2.1.3-2

本試験の目的は、覚醒下テレメータ装着カニクイザルにロキサデュスタットを単回経口投与したときの心循環への影響を評価することである。

覚醒雄性カニクイザル（4匹）にロキサデュスタットを投与し、テレメトリーにより、HR、全身血圧（収縮期、拡張期及び平均）及びECG（P波持続時間、PR間隔、QRS持続時間、QT間隔、R波振幅及びFridericia式 $QT_c=QT/RR^{1/3}$ ）を用いて計算した補正QT（ QT_c ）間隔）に対するロキサデュスタットの急性作用を評価した。ロキサデュスタットの3, 30又は100 mg/kg並びに対照溶媒を4例のカニクイザルにラテン方格法にて7日間隔で単回経口投与して、各投与後24時間血行動態及びECGパラメータを測定した（投与後4時間までは15分ごと、その後は24時間まで1時間ごと）。

HRの結果の要約を図2.6.2-1に示す。ロキサデュスタットはいずれの用量においてもECGパラメータを変化させなかった。ロキサデュスタットを3, 30又は100 mg/kgの用量で投与後、被験物質に関連した血圧の変化は認められなかった。ロキサデュスタット3又は30 mg/kg投与後、被験物質に関連したHRの変化は認められなかった。ロキサデュスタット100 mg/kgの投与により投与約7時間後から24時間後まで、対照溶媒に比べて持続的なHRの増加が認められた。同時点の対照溶媒群の値との差は最大55%であり、この期間中の最大平均HRは145拍/分であった。

図 2.6.2-1 心拍数



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

添付資料 4.2.1.3-3 (参)

本試験の目的は、ラットにロキサデュスタットを静脈内投与したときの HR 及び血圧への影響を評価することである。

覚醒雄性 Sprague Dawley ラット (1 群 10 匹) にロキサデュスタット (30 又は 60 mg/kg) 又は対照溶媒を単回静脈内ボラス投与した。

麻酔下で大腿動脈及び静脈にカニューレを留置した。一晚回復後、カニューレを留置した動物を個別のケージに収容し、カニューレを保護しながら動物がケージ内で自由に動けるようにするため、Covance インフュージョンハーネスを装着した。動物を安定させながら、大腿動脈から全身血圧を 30 分以上連続記録した。その後、ロキサデュスタットを 2 mL/kg の投与容量で大腿静脈のカニューレを通じて単回静脈内投与した。投与後 4 時間、全身血圧を連続記録した。全身血圧記録から平均、収縮期及び拡張期血圧並びに HR を測定した。ベースラインの測定は投与 30 分前及び投与直前に行い、ロキサデュスタット又は対照溶媒投与後は 30 分ごとに 4 時間測定した。カテーテルが閉塞した動物は試験から除外したため、動物数は対照溶媒群で 6 匹、ロキサデュスタット群でいずれも 9 匹となった。

HR 及び平均血圧データを表 2.6.2-13 に示す。ロキサデュスタット 30 又は 60 mg/kg の単回静脈内投与により、ベースライン値と比べて収縮期、拡張期及び平均血圧が有意に低下し、それと同時に HR の増加が認められた。HR の増加と血圧の低下は投与後の最初の 2 時間で次第に発現し、試験終了時 (投与 4 時間後) まで維持した。

表 2.6.2-13 心拍数及び平均血圧

Roxadustat Dose (mg/kg)	0 (Control)		30		60	
	Heart Rate (BPM)	Mean Blood Pressure (mmHg)	Heart Rate (BPM)	Mean Blood Pressure (mmHg)	Heart Rate (BPM)	Mean Blood Pressure (mmHg)
Baseline	379 ± 23	97 ± 4	372 ± 18	113 ± 9	401 ± 49	109 ± 8
1	380 ± 25	94 ± 3	431 ± 23*	98 ± 8*	465 ± 34*	93 ± 5*
2	399 ± 45	100 ± 6	487 ± 26*	93 ± 9*	513 ± 17*	88 ± 5*
4	402 ± 22	97 ± 8	477 ± 18*	94 ± 5*	502 ± 16*	86 ± 4*

Mean ± SD; n=6-9 animals/group (data from animals with truncated readings were excluded from analysis); *p<0.05 vs baseline (time -0.5; Dunnett's post-test); BPM = beats per minute

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

添付資料 4.2.1.3-4 (参)

本試験の目的は、ラットにロキサデュスタットを経口投与したときの HR 及び血圧への影響を評価することである。

覚醒雄性 Sprague Dawley ラット (1 群 10 匹) にロキサデュスタット (3, 10, 30 又は 60 mg/kg) 又は対照溶媒を単回経口投与した。

麻酔下で胃及び大腿動脈にカニューレを留置した。一晚回復後、カニューレを留置した動物を個別のケージに収容し、カニューレを保護しながら動物がケージ内で自由に動けるようにするため、Covance インフュージョンハーネスを装着した。動物を安定させながら、動脈カニューレから全身血圧を 1 時間以上連続記録した。その後、ロキサデュスタットを 5 mL/kg の投与容量で、胃カニューレを通じて単回経口投与した。投与後 24 時間、全身血圧を連続記録した。全身血圧記録から平均、収縮期及び拡張期血圧並びに HR を測定した。ベースラインの測定は投与 1 時間及び 30 分前に行い、投与後は 30 分ごとに 24 時間測定した。カテーテルが閉塞した動物は試験から除外したため、動物数は対照、ロキサデュスタット 3, 30 及び 60 mg/kg 群で 9 匹、ロキサデュスタット 10 mg/kg 群で 10 匹となった。

ロキサデュスタットの単回経口投与により、投与後 24 時間の間に用量依存的な血圧の低下及び HR の増加が認められた (表 2.6.2-14)。10 mg/kg までの用量では変化は認められなかった。30 及び 60 mg/kg 群では投与後の最初の 2~4 時間、平均血圧に低下傾向が認められ、HR は増加した。その後は、両パラメータとも部分的に回復したが、HR は、24 時間試験の終了前の複数の時点において、対照溶媒群に比べて依然増加していた。

以上、雄性 Sprague Dawley ラットへのロキサデュスタットの単回経口投与により、用量依存的に血圧が低下し、それと同時に HR の増加が認められた。最大の変化は高用量群 (30 又は 60 mg/kg) で、投与 4 時間後までに認められた。血圧及び HR は投与 24 時間後、部分的に対照溶媒群の値まで回復した。

表 2.6.2-14 平均血圧及び心拍数

Roxadustat Dose (mg/kg)		0 (Control)	3	10	30	60
Mean Blood Pressure (mmHg)	Baseline	105 ± 10	104 ± 6	106 ± 11	99 ± 7	103 ± 10
	2	102 ± 8	102 ± 6	102 ± 10	94 ± 8	96 ± 8
	4	107 ± 8	103 ± 4	104 ± 10	91 ± 4	96 ± 8
	6	112 ± 9	109 ± 7	108 ± 11	98 ± 8	99 ± 8
	8	113 ± 7	109 ± 12	107 ± 8	100 ± 7	98 ± 8
	12	112 ± 8	107 ± 5	109 ± 8	103 ± 8	102 ± 10
	24	117 ± 15	112 ± 7	108 ± 6	105 ± 5	106 ± 10
Heart Rate (BPM)	Baseline	407 ± 45	393 ± 24	422 ± 45	402 ± 30	397 ± 41
	2	416 ± 39	411 ± 24	429 ± 58	489 ± 33*	508 ± 10*
	4	406 ± 26	409 ± 24	451 ± 38	495 ± 28*	509 ± 16*
	6	436 ± 26	438 ± 34	458 ± 38	483 ± 30*	508 ± 18*
	8	431 ± 41	440 ± 56	440 ± 50	477 ± 36	490 ± 19*
	12	420 ± 31	402 ± 21	436 ± 54	461 ± 47	449 ± 51
	24	420 ± 58	410 ± 42	415 ± 52	435 ± 42	440 ± 44

Mean ± SD; n=9-10 animals/group (animals with truncated readings were excluded from analysis); *p<0.05 vs baseline (time -0.5; Tukey's post-test)

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

添付資料 4.2.1.3-5 (参)

本試験の目的は、ラットを用いてロキサデュスタットに対する HR 及び血圧応答へのアドレナリン作動系の関与を評価することである。

β₁-アドレナリン受容体遮断薬であるメトプロロール (10 mg/kg) を前投与した覚醒下の雄性 Sprague Dawley ラット (1 群 10 匹) にロキサデュスタット (60 mg/kg) 又は対照溶媒を胃カニューレを通じて単回経口投与した。

麻酔下で胃、大腿静脈及び大腿動脈カニューレを留置した。一晚回復後、カニューレを留置した動物を個別のケージに収容し、カニューレを保護しながら動物がケージ内で自由に動けるようにするため、Covance インフュージョンハーネスを装着した。メトプロロール 10 mg/kg 又は生理食塩水 2 mL/kg のいずれかを、大腿静脈カニューレを通じて静脈内投与した。10 分後、ロキサデュスタットを 5 mL/kg の投与容量で単回経口投与した。ラットでは、メトプロロールの半減期が短いため、初回投与の 2 時間後に、2 回目のメトプロロール又は生理食塩水の投与を行った。ベースライン測定ではロキサデュスタット投与前 (1 時間及び 30 分前) に HR 及び全身血圧を記録し、投与後は 30 分ごとに 4 時間記録した。

HR 及び平均血圧データの要約を表 2.6.2-15 に示す。生理食塩水を前投与したラットにロキサデュスタットを投与すると、HR は投与 30 分後から 2 時間後まで徐々に増加した。投与 2 時間後、

HR はベースラインの投与前値よりも約 30%高く、4 時間後の試験終了時まで、これらの値が持続した。

メトプロロールの前投与により、ロキサデュスタット投与後に認められる初期の HR 増加が抑制された。このメトプロロールの作用は、ロキサデュスタット投与 1.5 時間後から試験終了時までには減弱した。これらの結果から、メトプロロールによる β_1 -アドレナリン受容体遮断により、ロキサデュスタット投与後の初期の HR 増加は抑制されるが、その後、HR に対するロキサデュスタットの作用がより増大すると、メトプロロールによる β_1 -受容体遮断は HR の増加を完全に抑制するには不十分となることが示された。

ラットへのロキサデュスタットの投与により、平均血圧は投与 2.5 時間後から 4 時間後まで有意に低下し、この作用はメトプロロールによる影響を受けなかった。収縮期及び拡張期血圧の結果も同様であった。

以上、ロキサデュスタット 60 mg/kg の単回経口投与により、雄性 Sprague Dawley ラットにおいて HR が有意に増加し、平均血圧が低下した。 β_1 -受容体拮抗薬であるメトプロロールによるアドレナリン受容体遮断により HR の増加は部分的に抑制されたが、平均血圧の低下への影響は認められなかった。

表 2.6.2-15 メトプロロール前投与群の心拍数及び平均血圧

	Time (hours)	Metoprolol Vehicle	Metoprolol Roxadustat 60 mg/kg	Saline Vehicle	Saline Roxadustat 60 mg/kg
Heart Rate (BPM)	Baseline	381 ± 21	395 ± 30	405 ± 31	388 ± 26
	1	348 ± 13*	360 ± 21	403 ± 31	442 ± 38*
	2	326 ± 16*	379 ± 37	412 ± 26	503 ± 23*
	4	373 ± 26	470 ± 26*	416 ± 38	512 ± 27*
Mean Blood Pressure (mmHg)	Baseline	94 ± 3	97 ± 7	94 ± 11	92 ± 6
	1	89 ± 5	97 ± 7	92 ± 12	98 ± 6
	2	81 ± 5*	83 ± 9*	91 ± 10	86 ± 3
	4	89 ± 6	80 ± 7*	94 ± 7	82 ± 7*

Mean ± SD; n= 10 animals/group; *p<0.05 vs. baseline (time -0.5; Dunnett's post-test)

2.6.2.4.6 麻酔ラットにおける心機能への影響

添付資料 4.2.1.3-6 (参)

本試験の目的は、麻酔ラットにロキサデュスタットを 30 又は 60 mg/kg の用量で単回経口投与したときの心機能への影響を評価することである。

投与前の平均体重が全ての群で同程度になるように、雄性 Sprague Dawley ラットを体重に基づいて 3 群 (1 群 10 匹) のいずれかに割り付けた。ロキサデュスタットを 0 (対照溶媒)、30 又は 60 mg/kg の用量、5 mL/kg の投与容量で単回経口投与した。投与 4 時間後に動物を麻酔して人工換気を行い、血管内 Millar 圧容積カテーテルを用いて全身血圧及び左室心機能を測定した。心機能測定後は動物を安楽死させた。

心機能パラメータの要約を表 2.6.2-16 に示す。対照溶媒投与に比べ、ロキサデュスタット 60 mg/kg の単回経口投与では、有意に高い HR、一回仕事量、心拍出量、一回拍出量、最大容積、拡張末期容積、左室圧一次微分最大値 (dP/dt max) における左室容積及び拡張末期圧が認められ、有意に低い全身血圧、収縮末期圧、dP/dt max における左室圧、弛緩時定数 (Tau)、動脈弾性率及び総末梢血管抵抗が認められた。負荷依存性 (駆出率及び dP/dt max) 及び負荷非依存性 (収縮末期圧容積関係 (ESPVR) 勾配及び一回仕事量と拡張末期容積の関係 (PRSW)) の心収縮性の指標は有意に変化しなかった。60 mg/kg 群では、左室圧一次微分最小値 (dP/dt min) の統計学的に有意でない 14% の減少も認められた。dP/dt min は 30 mg/kg 群において同程度の統計学的に有意な減少 (15%) が認められたため、60 mg/kg 群でみられた減少は本化合物に関連すると判断した。

ロキサデュスタット 30 mg/kg の単回投与では、60 mg/kg と同様の変化が認められたが、対照溶媒群との差は、全身血圧、Tau、dP/dt max における左室圧及び収縮末期圧を除いて統計学的に有意でなかった。ロキサデュスタット 30 mg/kg 投与後の ESPVR 勾配の有意な減少は 60 mg/kg 投与後には認められなかったため、偶発的なものであり、ロキサデュスタットには関連しないと判断した。

これらの結果は動脈血管拡張薬で認められる圧反射応答と類似しており、ロキサデュスタット 60 mg/kg 投与後に観察された総末梢血管抵抗の減少に対する反射性の心応答と考えられる。血管拡張による動脈抵抗の減少により、全身血圧、動脈弾性率及び収縮末期圧は低下する。全身血圧の低下は圧反射を介して、HR 及び心臓への静脈還流の反射性増加 (拡張末期容積及び拡張末期圧の増加) をもたらす。静脈還流の増加からはロキサデュスタットが動脈床を優先的に拡張し、静脈循環の容量血管は拡張しないことが示唆される。静脈還流の増加はフランク・スターリング機序により、一回拍出量を増加させる。一回拍出量の増加と HR の増加が組み合わさると心拍出量が増加し、それにより全身血圧の低下が軽減される。dP/dt max における左室容積の増加及び dP/dt max における左室圧の低下も、それぞれ拡張末期容積の増加、全身血圧の低下により認められた。最終的に、負荷依存性の心弛緩指標である dP/dt min は増加し (負の絶対値が小さくなり)、収縮末期圧の低下により、Tau が減少した。HR の増加も Tau の減少に寄与した可能性がある。負荷依存性及び負荷非依存性の心収縮性の指標はロキサデュスタットの投与により変化しなかった。

以上、麻酔及び人工換気を行った雄性 Sprague-Dawley ラットへのロキサデュスタット単回経口投与後に認められた心機能の変化は、総末梢血管抵抗の減少に対する反射応答と一致していた。ロキサデュスタットに関連した心収縮性の変化は認められなかった。

表 2.6.2-16 心機能パラメータ

Roxadustat Dose (mg/kg)	0 (Control)	30	60
Stroke Work (mmHg x μ L)	28,890 \pm 7,551	30,730 \pm 7,322	37,264 \pm 8,418*
Cardiac Output (μ L/min)	79,244 \pm 15,695	102,047 \pm 37,775	129,968 \pm 33,779*
Stroke Volume (μ L)	342 \pm 77	377 \pm 85	451 \pm 103*
Maximum Volume (μ L)	486 \pm 81	541 \pm 71	594 \pm 106*
End-systolic Volume (μ L)	168 \pm 38	180 \pm 88	157 \pm 79
End-diastolic Volume (μ L)	448 \pm 77	508 \pm 65	545 \pm 91*
Mean Blood Pressure (mmHg)	89 \pm 11	73 \pm 7*	72 \pm 5*
End-systolic Pressure (mmHg)	100 \pm 20	80 \pm 7*	78 \pm 6*
End-diastolic Pressure (mmHg)	4.5 \pm 2.7	6.2 \pm 3.2	8.3 \pm 4.5*
Heart rate (bpm)	235 \pm 29	266 \pm 49	289 \pm 47*
Ejection Fraction (%)	76.7 \pm 9.0	73.2 \pm 14.8	81.0 \pm 13.8
Arterial Elastance (mmHg/ μ L)	0.32 \pm 0.15	0.23 \pm 0.08	0.19 \pm 0.09*
dP/dt max (mmHg/sec)	7,131 \pm 1,074	7,316 \pm 463	7,800 \pm 1,355
dP/dt min (mmHg/sec)	-6,756 \pm 1,288	-5,741 \pm 535*	-5,843 \pm 760
Pressure at dP/dt max (mmHg)	71.4 \pm 9.2	62.6 \pm 3.3*	64.0 \pm 7.2*
Volume at dP/dt max (μ L)	446 \pm 86.2	515 \pm 64.4	555 \pm 93.6*
Tau (ms)	11.1 \pm 1.4	9.4 \pm 1.6*	9.3 \pm 1.8*
ESPVR Slope (mmHg/ μ L)	0.364 \pm 0.136	0.255 \pm 0.065*	0.313 \pm 0.096
PRSW (mmHg)	62.7 \pm 9.8	57.4 \pm 12.4	63.9 \pm 9.1
Total Peripheral Resistance (mmHg.min/mL)	1.18 \pm 0.34	0.81 \pm 0.29*	0.62 \pm 0.33*

Mean \pm SD; n= 10 animals/group; *p<0.05 vs. control group (Dunnett's post-test)

2.6.2.4.7 摘出心モデルにおける影響

添付資料 4.2.1.3-7 (参)

本試験の目的は、ラット摘出心灌流標本を用いてロキサデュスタットが HR への直接的な心作用を示すかどうか検討することである。

雄性 Sprague Dawley ラットを、対照溶媒群、ロキサデュスタット 1, 3 又は 10 μ g/mL 群、イソプロテレノール 20 nmol/L (陽性対照) 群の計 5 群 (1 群 6 匹) のいずれかに無作為に割り付けた。動物をイソフルランで麻酔して、その心臓を摘出し、直ちに一定流量 (11 \pm 0.5 mL/min) のランゲンドルフ灌流心装置 (Radnoti) に装着した。心臓は上行大動脈を介して逆向きに灌流し、クレブス緩衝液で 30 分間安定化した。HR, 左心室発生圧, 冠動脈灌流圧, 左室拡張末期圧, dP/dt max, 冠動脈抵抗及び二重積 (HR \times 左心室発生圧) の血行動態パラメータを、対照溶媒、イソプロテレノール又はロキサデュスタット溶液の灌流前、灌流中及び灌流後に測定した。血行動態パラメー

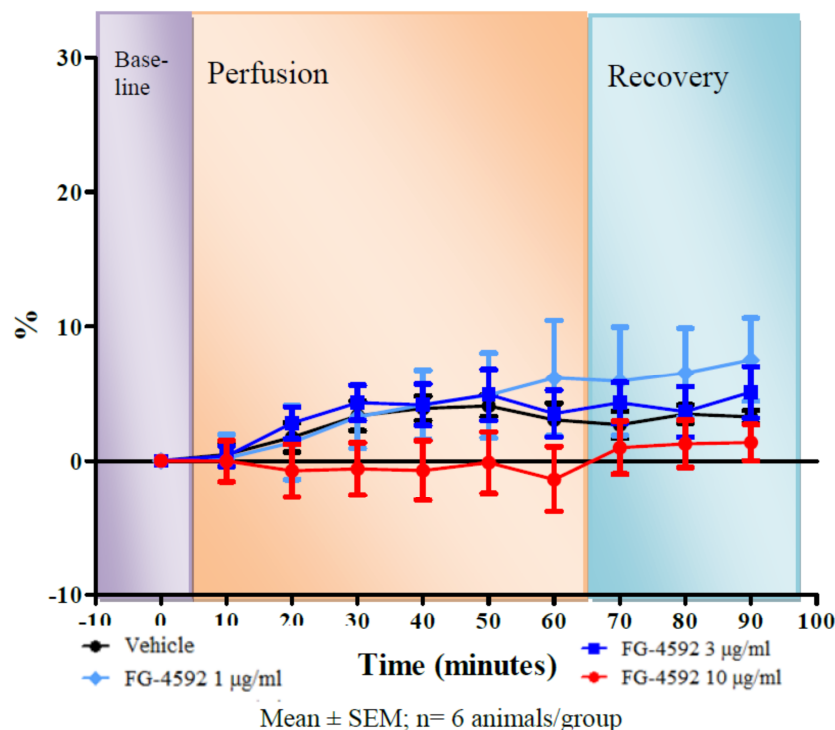
タは、被験物質灌流中 60 分間連続記録し（イソプロテレノールは 10 分間）、その後クレブス緩衝液で 30 分間（イソプロテレノールは 80 分間）回復させた。

このラット摘出心モデルにおいてロキサデュスタットの灌流は、対照溶媒に比べて、HR（図 2.6.2-2）、左心室発生圧、二重積、 $dP/dt \max$ 又は左室拡張末期圧に影響しなかった。ロキサデュスタットは全ての濃度において、対照溶媒に比べて冠動脈圧（図 2.6.2-3）及び冠動脈抵抗を用量依存的に有意に減少させた。最高濃度では冠動脈圧及び冠動脈抵抗は灌流開始後 10 分以内に減少し、灌流 20 分以内に減少が最大（ベースラインの約 30%）となった。いずれのパラメータも、その後のロキサデュスタット灌流中は低値を維持し、休薬期間中にベースライン値に回復した。冠動脈圧の低下は冠動脈抵抗を減少させるロキサデュスタットの血管拡張作用と一致していた。

陽性対照であるイソプロテレノールは、 β_1 -アドレナリン作動性の変時及び変力作用から予想されるように、HR、左心室発生圧、二重積及び $dP/dt \max$ を増加させた。また、イソプロテレノールは、 β_2 -アドレナリン作動性の血管拡張作用から予想されるように、冠灌流圧及び冠動脈抵抗を減少させた。

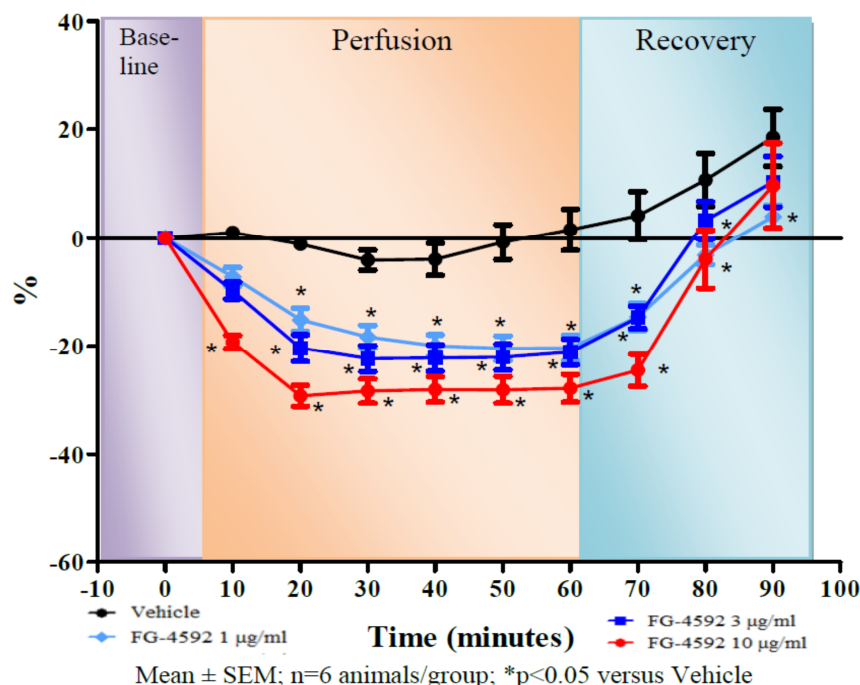
以上、これらの結果からロキサデュスタットは HR や心収縮性に対する直接的な心作用を示さないことが確認された。ロキサデュスタットは冠動脈床に対する血管拡張作用と一致した、冠動脈圧及び冠動脈抵抗の減少が認められた。

図 2.6.2-2 心拍数の変化率



FG-4592= roxadustat

図 2.6.2-3 冠動脈圧の変化率



FG-4592= roxadustat; statistical method= Bonferroni post-test

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

添付資料 4.2.1.3-8 (参)

本試験の目的は、覚醒ラットにロキサデュスタットを静脈内投与したときの局所血行動態への影響を評価することである。

雄性 Sprague-Dawley ラットの腹部下行大動脈、上腸間膜動脈及び左腎動脈周囲に血流プローブを留置した。カテーテルは化合物投与用を頸静脈、血圧測定用 [Fretwell & Woolard, 2013] 及び血漿中化合物濃度を測定するための採血用のカテーテルを尾動脈に留置した。回復後、第1群又は第2群 (7~9匹) に動物を割り付けた。1日目に両群に対照溶媒を 2 mL/kg の投与容量で静脈内ボラス投与した。2日目は第1群及び第2群にロキサデュスタットをそれぞれ3及び30 mg/kg の用量で静脈内投与した。3日目は両群ともに休薬日とした。4日目は両群とも 1 mL/kg の投与容量で、10分間ヒドララジン (1.25 mg/kg/h) を注入した。HR (血圧信号から測定)、平均動脈圧 (MAP) 並びに腎動脈、腸間膜動脈及び後肢血管床の血流を評価した。

対照溶媒投与はいずれの群においても、生理学的に意義のある CV 系への影響を生じなかった。同様に、ロキサデュスタットを 3 mg/kg の用量で投与したときも、MAP が僅かに低下したのみで、局所血行動態への影響はほとんど認められなかった。ロキサデュスタットを 30 mg/kg の用量で投与すると、HR の大幅な増加及び MAP の二相性応答が認められた。高用量投与後の最初の 30 分間、初期の昇圧応答により MAP が上昇し、その後、降圧応答が生じ、ベースラインに比べて MAP

が有意に低下したが（90分以降）、HRの増加は維持された。血圧の低下は、3つの全ての血管床において、投与60～360分後の顕著かつ持続的な血管拡張を伴っていたが、特に腎血管及び腸間膜血管床では、血流の著しい減少が投与1～30分後にも認められた。

対照的に、ヒドララジンの投与によりHRは有意に増加し、それと同時に単相性の降圧応答が認められた。ヒドララジンによるHRの増加及びMAPの低下は、腎動脈、腸間膜動脈及び後肢血流の有意な増加を伴い、投与開始後5分以内に明らかになり、2.5時間以上持続した。

ロキサデュスタットの総血漿中濃度は投与1分後の時点で最大となり、その濃度は3及び30 mg/kgでそれぞれ18.60, 148.22 µg/mLであった。

以上、ロキサデュスタット30 mg/kgの投与によりHRの増加及び二相性の血圧応答が認められ、MAP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。これらの作用は高用量において3つの全ての血管床の血管拡張を伴っており、この場合も腎動脈及び腸間膜動脈血管床において、投与初期に一過性の血流減少を含む二相性の応答が認められた。

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

添付資料 4.2.1.3-9

本試験の目的は、ラットにロキサデュスタットを反復投与したときのCV系の変化（HR及び血圧）を評価することである。また、ロキサデュスタットの曝露量も測定した。

雄性 Sprague Dawley ラット（主試験：1群6匹，トキシコキネティクス（TK）：1群3匹）にロキサデュスタット（20又は40 mg/kg）又は対照溶媒を10 mL/kgの投与容量で、4週間TIW反復経口投与した。主要評価項目はテレメトリーシステムで測定した1, 15及び26日目の血圧（収縮期、拡張期及び平均）及びHRとした。1, 15及び26日目の血行動態データはロキサデュスタットの影響を対照溶媒と比較評価するため、ベースライン値に対して標準化した（投与2時間前からのデルタ変化）。また、経時的な血行動態応答を比較するため、血行動態データをベースライン値及び同時点の対照溶媒群の値に対して標準化した（投与2時間前及び同時点の対照溶媒群からの二重デルタ変化）。また、運動量、死亡／瀕死、一般状態、体重、臨床病理パラメータ（血液検査及び血液生化学検査）及び血漿中ロキサデュスタット濃度も評価した。

ロキサデュスタットを20及び40 mg/kgの用量でTIW反復経口投与すると、ベースラインで標準化した1, 15及び26日目のHRは対照溶媒群に比べて増加した（デルタ解析）。いずれの用量においても、対照溶媒と比べたHR増加の程度は1日目に比べて15及び26日目は有意に小さかった（二重デルタ解析）。15及び26日目のHR増加は両用量とも同程度であった。ロキサデュスタット20 mg/kg群では対照溶媒群に比べていずれの日においてもベースラインで標準化した血圧に顕著な変化は認められなかった（デルタ解析）。ロキサデュスタット40 mg/kg群では対照溶媒群に比べて、ベースラインで標準化した1及び26日目の血圧が低下していたが、15日目には血圧の低下は認められなかった（デルタ解析）。対照溶媒と比べた血圧低下の程度は、1日目と26日目で同程度であった（二重デルタ解析）。

試験中に死亡又はロキサデュスタットに関連した一般状態、体重変化又は運動量の差は認められなかった。

ロキサデュスタットに関連した血液検査パラメータの変化として、20 及び 40 mg/kg で対照溶媒群に比べて赤血球量及び RETI の増加が認められた。ロキサデュスタットに関連した血液生化学検査パラメータの変化として、20 及び 40 mg/kg で対照溶媒群に比べて血清 HDL の減少が認められた。両用量ともに、1 日目には血清 LDL の減少傾向がみられたが、統計学的には有意でなかった。

1, 15 及び 26 日目の TK 動物を用いて、血漿中ロキサデュスタット濃度を測定した。その結果、対照溶媒群ではロキサデュスタットは検出されず、20 及び 40 mg/kg 群では、用量依存的な濃度が観察された。

以上、ロキサデュスタット 20 及び 40 mg/kg 投与後に認められた 1 日目の HR の増加は TIW 反復経口投与後 15 及び 26 日目に減弱した。ロキサデュスタット 20 mg/kg の投与は血圧に影響しなかった。ロキサデュスタット 40 mg/kg の投与後に認められた血圧の低下は、1 日目と 26 日目は同程度であったが、15 日目には認められなかった。ロキサデュスタットの薬理作用に関連する赤血球量及び RETI の増加が 20 及び 40 mg/kg 群で認められた。血清 HDL の減少も両用量群で認められた。40 mg/kg 群の血漿中ロキサデュスタット濃度は全ての時点において、20 mg/kg 群に比べて高かった。

2.6.2.4.10 ラットにおける中枢神経系への影響

添付資料 4.2.1.3-10

本試験の目的は、ラットにロキサデュスタットを単回経口投与したときの投与後 24 時間までの神経薬理作用を評価することである。

覚醒雌雄 Sprague Dawley ラット(1 群雌雄各 5 匹)にロキサデュスタット(30, 100 又は 300 mg/kg)又は対照溶媒を単回経口投与した。投与後に動物をプレキシグラス[®]製の蓋付きケースに收容した。ケースは排泄物を検出するための吸収紙の上に置いた。この環境ではラットは自由に動くことができ、投与 15, 30 及び 45 分, 1, 2, 3, 4 及び 24 時間後の時点で薬理又は毒性作用の徴候(発作/痙攣, 覚醒反応, 驚愕反応, 発声, 興奮, 腹部の緊張低下, 分泌物の増加, 身震い, 握力低下, 不動, 運動活性, 運動失調, 異常姿勢, 常同行動, 排泄, 呼吸低下, 立毛, 正向反射の消失, 瞳孔径, 侵害刺激(疼痛)反応, 角膜反射及び耳介反射)を観察した。全ての動物の体温を、投与 60 分(±5 分)後の時点で測定した。

各観察時点において、ロキサデュスタット 30, 100 又は 300 mg/kg 群で明らかな神経薬理学的又は毒性学的徴候は検出されず、体温への有意な影響も認められなかった。

2.6.2.4.11 ラットにおける呼吸系への影響

添付資料 4.2.1.3-11

本試験の目的は、麻酔ラットにロキサデュスタットを静脈内投与したときの投与後 30 分間の肺機能への影響を評価することである。

麻酔雌雄 Sprague Dawley ラット (1 群雌雄各 4 匹) にロキサデュスタット (10, 30 又は 100 mg/kg) 又は対照溶媒を静脈内投与した。

絶食下の動物をウレタン麻酔した。食道内圧の測定から胸腔内圧を求めるため、食道カテーテルを留置した。自発呼吸を促すため気管カニューレを留置し、全身プレチスモグラフで肺機能パラメータを評価した。肺機能パラメータには、一回換気量、分時換気量及び呼吸数が含まれた。呼吸ごとに、胸腔内圧、一回換気量及び気流速度の測定値から気道抵抗及び動肺コンプライアンスを算出した。頸静脈カテーテルへの 5 分間の静脈内投与により、ロキサデュスタットを投与した。肺機能は投与前、投与期間終了時、投与終了後最初の 5 分間は 1 分ごと、その後は 5 分ごとに 30 分間以上評価した。

結果の要約を表 2.6.2-17 及び表 2.6.2-18 に示す。30 mg/kg 群の雄性ラット 1 匹が静脈内投与中に死亡した。この動物は剖検しなかったため、死因は特定されなかった。ロキサデュスタット 10 mg/kg の投与により、麻酔下の雌雄ラットの肺機能に対する生物学的に意義のある影響は認められなかった。気道抵抗及び動肺コンプライアンスは、雌雄ともに、いずれの用量においても影響は認められなかった。ロキサデュスタット 30 mg/kg の静脈内投与により、雄では呼吸数 (約 19%)、雌では呼吸数と分時換気量の両方 (約 30%) が増加した。100 mg/kg の用量では、呼吸数 (雄で 51.3%、雌で 45.8%) 及び分時換気量 (雄で 69.6%、雌で 64.9%) が有意に増加した。100 mg/kg 群の雄では、一回換気量が投与 30 分後にベースラインに比べて有意に増加した (19%) が、雌では変化しなかった。

以上、ロキサデュスタットの静脈内投与により、30 mg/kg 以上で呼吸数及び分時換気量、100 mg/kg で一回換気量が増加した。

表 2.6.2-17 肺機能データ (雄)

Roxadustat Dose (mg/kg)	Time (minutes)	Respiratory Rate (breaths/min)	Tidal Volume (mL)	Minute Volume (mL/min)
0 (Control)	Baseline	106 ± 9.18	1.47 ± 0.16	152 ± 7.57
	End Infusion	113 ± 8.28	1.45 ± 0.14	161 ± 12.6
	5	115 ± 8.18	1.45 ± 0.13	165 ± 15.6
	15	112 ± 7.48	1.44 ± 0.16	159 ± 12.2
	30	121 ± 15.1*	1.48 ± 0.17	172 ± 8.39
10	Baseline	113 ± 10.3	1.40 ± 0.05	157 ± 12.6
	End Infusion	124 ± 7.52	1.35 ± 0.06	166 ± 8.35
	5	123 ± 6.77	1.36 ± 0.07	166 ± 6.18
	15	131 ± 10.8*	1.37 ± 0.09	176 ± 6.33
	30	124 ± 12.0	1.36 ± 0.07	167 ± 7.85
30	Baseline	113 ± 8.05	1.29 ± 0.08	146 ± 17.5
	End Infusion	135 ± 9.85*	1.28 ± 0.04	173 ± 15.4*
	5	128 ± 12.1	1.28 ± 0.04	164 ± 19.6
	15	131 ± 10.7*	1.29 ± 0.04	169 ± 18.8
	30	124 ± 9.03	1.27 ± 0.02	155 ± 11.1
100	Baseline	111 ± 11.2	1.30 ± 0.11	142 ± 12.9
	End Infusion	148 ± 20.5*	1.32 ± 0.15	187 ± 18.2*
	5	147 ± 16.8*	1.22 ± 0.15	173 ± 19.9*
	15	161 ± 15.8*	1.41 ± 0.13	214 ± 15.5*
	30	163 ± 18.1*	1.55 ± 0.16*	241 ± 16.0* [#]

Mean ± SEM; n=3-4 animals/group

*p≤0.05 vs. baseline (Bonferroni multiple comparison test)

#p≤0.05 vs. control at the same time point (Bonferroni multiple comparison test)

表 2.6.2-18 肺機能データ (雌)

Roxadustat Dose (mg/kg)	Time (minutes)	Respiratory Rate (breaths/min)	Tidal Volume (mL)	Minute Volume (mL/min)
0 (Control)	Baseline	84.3 ± 6.70	1.40 ± 0.10	117 ± 9.94
	End Infusion	84.6 ± 5.81	1.41 ± 0.08	119 ± 9.91
	5	84.4 ± 6.34	1.40 ± 0.09	117 ± 8.94
	15	83.0 ± 6.77	1.53 ± 0.17	129 ± 21.3
	30	90.0 ± 6.83	1.54 ± 0.16	137 ± 17.3
10	Baseline	114 ± 7.24	1.20 ± 0.06	136 ± 5.01
	End Infusion	119 ± 7.37	1.17 ± 0.06	139 ± 6.48
	5	117 ± 6.74	1.18 ± 0.07	137 ± 8.72
	15	117 ± 7.51	1.20 ± 0.03 [#]	140 ± 9.08
	30	118 ± 9.76	1.29 ± 0.09	153 ± 20.2
30	Baseline	126 ± 6.69	1.25 ± 0.04	156 ± 6.92
	End Infusion	152 ± 6.53 ^{*#}	1.28 ± 0.06	192 ± 15.5 [#]
	5	151 ± 9.04 ^{*#}	1.21 ± 0.04	182 ± 11.3
	15	159 ± 2.26 ^{*#}	1.24 ± 0.06	195 ± 9.23 [*]
	30	160 ± 3.67 ^{*#}	1.30 ± 0.07	207 ± 12.2 ^{*#}
100	Baseline	126 ± 16.4	1.22 ± 0.08	149 ± 8.87
	End Infusion	161 ± 20.4 ^{*#}	1.31 ± 0.09	204 ± 12.6 ^{*#}
	5	161 ± 18.4 ^{*#}	1.18 ± 0.05	190 ± 24.2 ^{*#}
	15	167 ± 18.6 ^{*#}	1.27 ± 0.06	214 ± 30.4 ^{*#}
	30	183 ± 18.9 ^{*#}	1.32 ± 0.09	246 ± 36.6 ^{*#}

Mean ± SEM; n=4 animals/group

*p≤0.05 vs. baseline (Bonferroni multiple comparison test)

#p≤0.05 vs. control at the same time point (Bonferroni multiple comparison test)

2.6.2.4.12 ラットにおける腎機能への影響

添付資料 4.2.1.3-12

本試験の目的は、ラットにロキサデュスタットを単回経口投与したときの投与後4時間の尿量、尿 pH 及び尿中電解質への影響を評価することである。

雌雄 Sprague Dawley ラット (1 群雌雄各 5 匹) にロキサデュスタット (30, 100 又は 300 mg/kg) 又は対照溶媒を単回経口投与した。

動物は 16~18 時間絶食させたが、投与 90~130 分前まで水は自由に摂取させた。ロキサデュスタット (投与容量 10 mL/kg) の経口投与直後、ラットに生理食塩水 (25 mL/kg) を経口負荷し、排尿を促すようマッサージを行い、個別の代謝ケージに収容し、氷冷容器で 4 時間 (±5 分) 採尿した。4 時間後に尿量を記録し、尿 pH を測定し、尿中電解質 (Na⁺, K⁺及び Cl⁻) 濃度を評価した。

結果の要約を表 2.6.2-19 及び表 2.6.2-20 に示す。ロキサデュスタット 30, 100 及び 300 mg/kg の単回経口投与により、雌雄ラットにおいて、対照溶媒群に比べて尿量が有意に増加した。尿量の増加は雄では用量に依存したが、雌ラットでは用量に依存しなかった。尿 pH は雌では全ての用量群、雄では 100 及び 300 mg/kg 群で、対照溶媒群に比べて有意に高かった。尿中 K⁺濃度も雌雄ともに 100 及び 300 mg/kg 群では有意に高かった。尿中 Na⁺及び Cl⁻濃度はいずれの用量においてもロキサデュスタットによる有意な影響は認められなかった。Na⁺及び Cl⁻の排泄量は雄では全ての用量群、雌では 30 及び 100 mg/kg 群で対照溶媒群に比べて有意に高かった。K⁺の排泄量は雌では全ての用量群、雄では 100 及び 300 mg/kg 群で有意に高かった。

以上、ロキサデュスタットは 30 mg/kg 以上で尿量、尿 pH 並びに Na⁺、K⁺及び Cl⁻の排泄量、100 mg/kg 以上で尿中 K⁺濃度を増加させた。

表 2.6.2-19 尿中電解質濃度、尿 pH 及び尿量 (雄)

Roxadustat Dose (mg/kg)		0 (Control)	30	100	300
Urine Volume (mL)		4.2 ± 0.12	7.2 ± 0.58*	9.4 ± 0.49*	10.8 ± 0.41*
Percent Difference in Urine Volume from Control		-	71.4	123.8	157.1
pH		6.29 ± 0.13	6.73 ± 0.20	7.04 ± 0.12*	7.12 ± 0.05*
Electrolyte Concentrations (mEq/L)	Na ⁺	50 ± 11	73 ± 9	67 ± 3	56 ± 3
	K ⁺	22 ± 5	27 ± 2	46 ± 2*	53 ± 3*
	Cl ⁻	62 ± 13	85 ± 5	81 ± 2	67 ± 2
Electrolyte Excreted/ 100 grams of body weight (µEq)	Na ⁺	108 ± 25	268 ± 40*	316 ± 33*	299 ± 18*
	K ⁺	46 ± 11	98 ± 11	215 ± 22*	284 ± 15*
	Cl ⁻	133 ± 30	306 ± 27*	378 ± 29*	356 ± 10*

Mean ± SEM; n = 5 animals/group; *p<0.05 vs. control (Tukey HSD Multiple Comparison test)

表 2.6.2-20 尿中電解質濃度、尿 pH 及び尿量 (雌)

Roxadustat Dose (mg/kg)		0 (Control)	30	100	300
Urine Volume (mL)		3.5 ± 0.27	7.9 ± 0.66*	8.7 ± 0.37*	6.2 ± 0.56*
Percent Difference in Urine Volume from Control		-	125.7	148.6	77.1
pH		6.38 ± 0.07	7.16 ± 0.04*	7.02 ± 0.05*	6.92 ± 0.17*
Electrolyte Concentrations (mEq/L)	Na ⁺	88 ± 10	79 ± 6	78 ± 4	75 ± 5
	K ⁺	34 ± 3	35 ± 2	54 ± 3*	63 ± 6*
	Cl ⁻	88 ± 8	78 ± 6	89 ± 4	74 ± 3
Electrolyte Excreted/ 100 grams of body weight (µEq)	Na ⁺	173 ± 29	339 ± 27*	373 ± 23*	261 ± 38
	K ⁺	67 ± 8	148 ± 8*	256 ± 13*	207 ± 8*
	Cl ⁻	173 ± 26	334 ± 28*	421 ± 9*	253 ± 26

Mean ± SEM; n = 5 animals/group; *p<0.05 vs. control (Tukey HSD Multiple Comparison test)

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

ロキサデュスタットを用いた薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

HIF は、細胞環境における酸素濃度の変化に対する生理学的反応を調整する重要な転写因子である [Semenza, 1998 ; Semenza, 2000]。HIF は、EPO 及び EPO 受容体の発現のみならず、鉄の吸収及び再利用を促すその他の蛋白も誘導する [Peyssonaux, 2008]。HIF 経路の活性化は、HIF のプロテアソーム分解を誘発する酵素 HIF-PH (PHD1~3) により制御されている。

遺伝子組み換えヒト PHD 変異体を用いて、ロキサデュスタットは PHD1, PHD2 及び PHD3 の 3 種類全てと、CP4H を競合的に阻害した。一方、FIH に対する活性は弱かった。ロキサデュスタットは CCK_A 受容体、NE トランスポーター及び DA トランスポーターに親和性を示したが、末梢及び中枢の広範な薬物標的因子に対して、臨床的に問題となる濃度ではほとんど親和性を示さなかった。ロキサデュスタットは TR β に対して弱いながらアゴニスト活性を示したが、その親和性は陽性対照薬と比較して弱かった。したがって、ロキサデュスタットは CCK_A 受容体、NE トランスポーター、DA トランスポーター及び TR β に対して低親和性を持つ HIF-PH 阻害薬である。

Hep3B 細胞や 1G6 細胞をロキサデュスタットで処理すると、用量依存的に EPO 産生が増加するが、その際、TNF- α 及び IL-1 β などの炎症性サイトカイン存在下でも EPO 産生は増加した。

正常マウス又はラットにロキサデュスタットを経口投与したとき、用量依存的に血中 EPO 濃度の増加及び赤血球生成の亢進が認められた。ロキサデュスタットは、PG-PS ポリマー誘発性慢性炎症ラット及び 5/6 腎摘誘導性腎不全ラットに見られる貧血を軽減した。さらに、ロキサデュスタットは、小赤血球症及び血色素減少症への効果からも、鉄利用を改善したと考えられる。

いくつかの反復投与毒性試験においてロキサデュスタットにより血漿中グルコースが低下したため、ラットを用いた経口耐糖能試験を行った。ロキサデュスタットの投与により、糖負荷後の血糖値は血漿インスリンの増加を伴い用量依存的に低下した。これらの結果から、ラットでは、ロキサデュスタットはグルコース誘発インスリン分泌反応を亢進することにより、糖負荷後の血糖値を低下させることが示唆される。

また、一部の毒性試験において、ロキサデュスタットの投与により血清コレステロール値の低下がみられた。追加の *in vitro* 試験から、ロキサデュスタットは HMGCR 酵素活性を直接的には阻害しないものの、HIF 依存的に細胞内の HMGCR 蛋白濃度を減少させることが示唆された。これは HIF 経路を介した Insig-2 の発現増加によるものと考えられ、それが本薬のコレステロール低下作用に関与すると考えられる。

ロキサデュスタットの CV 系への作用は、*in vitro* では hERG 試験、*in vivo* ではカニクイザル及びラットを用いた試験で検討した。*in vitro* hERG チャネル試験では、ロキサデュスタットに濃度依存的な抑制作用が認められ、IC₅₀ 値は 93.2 μ mol/L よりも高いと推定された。テレメータ装着カニクイザルでは、試験で検討した最高用量である 100 mg/kg まで、ロキサデュスタット単回経口

投与による QTc 間隔への影響は認められなかった。カニクイザルでは、100 mg/kg の単回経口投与により、同時点の対照溶媒群に比べ、HR の増加が投与 7 時間後から認められ、観察期間の終了時である投与 24 時間後まで持続した。

カニクイザルで認められた HR 増加の機序を解明するため、覚醒ラットを用いて、HR と血圧の両方に対するロキサデュスタットの影響を評価する試験を実施した。ロキサデュスタット 30 及び 60 mg/kg の経口及び静脈内投与により血圧が低下し、HR が増加した。これらの変化は用量依存的であり、経口投与後 4 時間の間に最大となった。 β_1 -アドレナリン受容体遮断薬であるメトプロロール (10 mg/kg 静脈内投与) はロキサデュスタット 60 mg/kg 投与後に認められた HR の増加を部分的に抑制したが、平均血圧の低下には影響しなかった。ロキサデュスタットは HIF-PH の阻害薬であり、理論的には臓器及び組織中で HIF を誘導する。誘導型一酸化窒素合成酵素、ヘムオキシゲナーゼ-1、アドレノメデュリンなどの HIF 標的遺伝子は血管拡張を誘導することが知られているため [Guillemin & Krasnow, 1997; Hu, 2003]、ロキサデュスタット投与後の HR 増加は、組織中 HIF 濃度の上昇による血管拡張に対する反射応答であると考えられる。

この仮説を確認するため、ラットを用いた追加試験を実施した。ランゲンドルフ試験において、ロキサデュスタット 1~10 $\mu\text{g/mL}$ は HR への直接的な心作用を示さず、冠血管床に対する血管拡張作用と一致した冠動脈圧及び冠動脈抵抗の減少が認められた。麻酔下のラットを用いた心機能試験により、ロキサデュスタット 60 mg/kg の単回経口投与後、総末梢血管抵抗の減少に対する反射応答と一致した心パラメータの変化が認められた。覚醒下のラットを用いて腎動脈、腸間膜動脈及び後肢血管床の血流量を調べた局所血行動態試験では、ロキサデュスタット 30 mg/kg の単回静脈内投与後、3 つの全ての血管床において血管拡張が認められた。

これらの追加試験の結果から、ロキサデュスタット投与後に認められた HR の増加が、少なくとも部分的には、血管拡張に対して血圧を生理学的範囲に維持するための反射応答であるという仮説が裏付けられる。ロキサデュスタット経口投与の数時間後という応答の時期は、HIF 活性化及び HIF 標的遺伝子の転写と一致している。また、局所血行動態試験では、ロキサデュスタット静脈内投与 (30 mg/kg) 後数分以内に心血管系の迅速な応答も観察された。この応答は HR の増加、血圧の上昇及び局所血流量の減少を特徴としていた。この初期応答の時期からは、HIF 標的遺伝子の転写を介している可能性は低いと考えられる。この応答は臨床投与経路 (経口投与) とは異なる投与経路 (静脈内投与) を用いて観察されたため、その臨床的意義は不明である。

また、ラットを用いた 28 日間 TIW 反復経口投与 (20 及び 40 mg/kg) 試験により、反復投与後に HR の応答が減弱することが示された。

ロキサデュスタットを最大 300 mg/kg までラットに経口投与したとき、CNS への影響は認められなかった。麻酔ラットを用いた呼吸系への影響の評価では、ロキサデュスタットの静脈内投与により、30 mg/kg 以上で呼吸数及び分時換気量、100 mg/kg で一回換気量が増加した。腎機能へのロキサデュスタットの影響は、生理食塩水を負荷したラットを用いて検討した。ロキサデュスタットは、30 mg/kg 以上で尿量、尿 pH 並びに尿中 Na^+ 、 K^+ 及び Cl^- の排泄量、100 mg/kg 以上で尿中

K⁺濃度を増加させた。腎機能に対する試験では潜在的可能性を検出するため、生理学的な量を上回る量の生理食塩水を強制負荷した。そのため、これらの結果の臨床的意義は不明である。

以上の非臨床試験の結果より、ロキサデュスタットはEPO産生及び赤血球生成を増加させるHIF-PH阻害薬であることが示された。また、ロキサデュスタットはラットの炎症及び慢性腎臓病のモデルにおいて貧血を改善した。ロキサデュスタットはCNSに影響を及ぼさない一方、高用量では、HR増加（血管拡張作用と関連）、呼吸促進及び尿量増加をもたらした。

2.6.2.7 参考文献

Derelanko MJ. Determination of erythrocyte life span in F-344, Wistar, and Sprague-Dawley rats using a modification of the [³H]diisopropylfluorophosphate ([³H]DFP) method. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1987;9(2):271-276.

Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood*. 1992;79(8):1987-1994.

Fretwell LV, Woolard J. Cardiovascular responses to retigabine in conscious rats under normotensive and hypertensive conditions. *Br J Pharmacol*. 2013;169(6):1279-89.

Guillemin K, Krasnow MA. The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell*. 1997;89(1):9-12.

Haase VH. Regulation of erythropoiesis by hypoxia-inducible factors. *Blood Rev*. 2013;27(1):41-53.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(24):9361-9374.

Nguyen AD, McDonald JG, Bruik 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.

Peyssonnaud C, Nizet V, Johnson RS. Role of the hypoxia inducible factors HIF in iron metabolism. *Cell Cycle*. 2008;7(1):28-32.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8(5):588-594.

Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;88(4):1474-1480.

目次

2.6.3	薬理試験概要表.....	2
2.6.3.1	薬理試験：一覧表.....	2
2.6.3.2	効力を裏付ける試験.....	5
2.6.3.3	副次的薬理試験.....	9
2.6.3.4	安全性薬理試験.....	12
2.6.3.5	薬力学的薬物相互作用試験.....	18

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：ロキサデュスタット

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report/Study Number	CTD Number
Primary Pharmacodynamics					
In vitro Enzyme Inhibition	In Vitro Assay	NA	FibroGen	301_05_3010_056AMNDII	4.2.1.1-1
In vitro HIF Accumulation and EPO Production	In Vitro Assay	NA	FibroGen	301_05_3040_057	4.2.1.1-2
Single Dose Study on EPO secretion in Mice	Swiss Webster	po	FibroGen	301_05_3510_048	4.2.1.1-3
Intermittent Dosing Study on Erythropoiesis in Mice	Swiss Webster	po	FibroGen	301_05_3510_049	4.2.1.1-4
Intermittent Dosing Study on Erythropoiesis in Rats	Sprague Dawley	po	FibroGen	301_05_3510_037	4.2.1.1-5
Efficacy in PG-PS Rat Model of Anemia of Chronic Disease (2 weeks)	Lewis	po	FibroGen	301_07_3510_121_A01	4.2.1.1-6
Efficacy in PG-PS Rat Model of Anemia of Chronic Disease (4 weeks)	Lewis	po	FibroGen	301_05_3510_047_A01	4.2.1.1-7
Efficacy in 5/6 Nephrectomy Rat Model of Anemia Associated to Chronic Kidney Failure	Sprague Dawley	po	FibroGen	301_06_3510_071_A01	4.2.1.1-8
Secondary Pharmacodynamics					
In Vitro Receptor Binding and Enzyme Inhibition Profile	In Vitro Assay	NA	██████████	301_13_3010_009A2	4.2.1.2-1
In Vitro Dose Response Curves for Ligand and Receptor Binding	In Vitro Assay	NA	██████████	301_04_3010_010	4.2.1.2-2
Thyroid Receptor Radioligand Binding Assay	In Vitro Assay	NA	██████████	301_16_3040_187	4.2.1.2-3
Thyroid Receptor alpha and beta Reporter Assay	In Vitro Assay	NA	██████████	301_16_3040_185	4.2.1.2-4
Thyroid Receptor alpha and beta Reporter Assay	In Vitro Assay	NA	██████████	301_16_3040_186	4.2.1.2-5
Glucose Tolerance Test in Rats	Sprague Dawley	po	FibroGen	3510-10-047	4.2.1.2-6
Effect on Cholesterol and Triglycerides in Rats	Sprague Dawley	po	FibroGen	3510-12-005	4.2.1.2-7

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report/Study Number	CTD Number
In Vitro Mechanism of Action of Cholesterol Lowering Effect on HMGCR Enzyme Activity	In Vitro Assay	NA	FibroGen	301_16_3040_184	4.2.1.2-8
In Vitro Mechanism of Action of Cholesterol Lowering Effect on HIF dependence on HMGCR	In Vitro Assay	NA	FibroGen	350_15_3040_001	4.2.1.2-9
Safety Pharmacology Studies					
In Vitro hERG Assay ^a	In Vitro	NA	████████	301_05_3510_038	4.2.1.3-1
Effects on Cardiovascular System in Monkeys ^a	Cynomolgus	po	████████	301_05_3510_025	4.2.1.3-2
Effect on Heart Rate and Blood Pressure after single iv Dosing in Conscious Rats	Sprague Dawley	iv	FibroGen	3510-09-090	4.2.1.3-3
Effect on Heart Rate and Blood Pressure after single po Dosing in Conscious Rats	Sprague Dawley	po	FibroGen	3510-10-014	4.2.1.3-4
Effect of Adrenergic Blockade on Heart Rate and Blood Pressure in Conscious Rats	Sprague Dawley	po	FibroGen	3510-10-063	4.2.1.3-5
Effect on Cardiac Function in Anesthetized Rats	Sprague Dawley	po	FibroGen	3510-15-009	4.2.1.3-6
Effect on Isolated Heart in Rats	Sprague Dawley (ex vivo)	Perfusion	FibroGen	3510-15-064	4.2.1.3-7
Effects on Cardiovascular System and Regional Hemodynamics in Conscious Rats	Sprague Dawley	iv	████████	BE001764-07	4.2.1.3-8
Effect on Heart Rate and Blood Pressure with Repeated Dosing in Conscious Rats ^a	Sprague Dawley	po	████████	352016002	4.2.1.3-9
Effects on CNS in Rats ^a	Sprague Dawley	po	████████	301_05_3510_022	4.2.1.3-10
Effects on Pulmonary System in Anesthetized Rats ^a	Sprague Dawley	iv	████████	301_05_3510_023	4.2.1.3-11

^a GLP

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report/Study Number	CTD Number
Effects on Renal Function in Rats ^b	Sprague Dawley	po	██████████	301_05_3510_024	4.2.1.3-12

CNS: Central nervous system; EPO: Erythropoietin; hERG: Human ether-à-go-go-related gene; HIF: Hypoxia-inducible factor; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; iv: Intravenous administration; NA: Not applicable; PG-PS: Peptidoglycan-polysaccharide; po: Oral administration

^b GLP

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	Report/Study Number	CTD Number
In Vitro Enzyme Inhibition	Recombinant human enzymes	NA	Up to 200 $\mu\text{mol/L}$	NA	Order of enzyme inhibitory potency (based on IC_{50} using 1 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} and 100 $\mu\text{mol/L}$ alpha-ketoglutaric acid) was $\text{PHD3} > \text{CP4H} \sim \text{PHD1} \sim \text{PHD2} \gg \text{FIH}$.	301_05_3010_056AMNDII	4.2.1.1-1
In Vitro HIF Accumulation and EPO Production	Hep3B cells	NA	0, 3, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$	NA	Rapid accumulation of HIF-2 α and secretion of EPO in vitro even in the presence of pro-inflammatory cytokines known to suppress EPO secretion.	301_05_3040_057	4.2.1.1-2
Single Dose Study on EPO Secretion	Mouse/ Swiss Webster	po	0, 2, 6, 20, 60	M/4	Dose-dependent increase in plasma EPO at ≥ 6 mg/kg 6 hours after dosing, with statistically significant increase at 60 mg/kg.	301_05_3510_048	4.2.1.1-3
Intermittent Dosing Study on Erythropoiesis	Mouse/ Swiss Webster	po	0, 6, 20, 60, 100, 200 ^c	M/8	Dose-dependent increases in Hb and Hct at ≥ 6 mg/kg, with statistically significant increase in Hb at ≥ 6 mg/kg, and Hct at ≥ 60 mg/kg.	301_05_3510_049	4.2.1.1-4

^c TIW for 1 week

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	Report/Study Number	CTD Number
Intermittent Dosing Study on Erythropoiesis	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 30, 60 ^d	M/6 or 8	Increased RETI on Day 4 with both doses. Increased Hct and Hb on Day 7 to a peak on Day 28 at both doses. TIW dosing regimen resulted in greater erythropoietic response than less frequent twice or once a week dosing regimens.	301_05_3510_037	4.2.1.1-5
Efficacy in PG-PS Model of Anemia of Chronic Disease (2 weeks)	Rat/ Lewis	po	0, 40 ^e	PG-PS Vehicle: F/8 PG-PS Roxadustat: F/7 Sham: F/5	After 2 weeks of treatment, roxadustat corrected anemia in PG-PS injected animals by significantly increasing Hb, Hct, RBC, MCV, MCH and MCHC compared to vehicle. Roxadustat also reduced paw inflammation and hepatic hepcidin mRNA in PG-PS injected animals.	301_07_3510_121_A01	4.2.1.1-6

^d Once per week, twice per week or TIW for 4 weeks

^e TIW for 2 weeks

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	Report/Study Number	CTD Number
Efficacy in PG-PS Model of Anemia of Chronic Disease (4 weeks)	Rat/ Lewis	po	0, 30 ^f	PG-PS: F/7 or 8 Sham: F/4	After 4 weeks of treatment, roxadustat corrected anemia in PG-PS injected animals by significantly increasing Hb, Hct, RBC, MCV, MCH, and MCHC compared to vehicle. Roxadustat also increased serum iron, serum transferrin saturation, duodenal iron transporter DMT1 mRNA, duodenal ferric reductase Dcytb mRNA, and decreased hepatic hepcidin mRNA. The comparator darbepoetin increased erythropoiesis (Hb, RBC and Hct) in sham animals but not in PG-PS-injected anemic animals. Ferric gluconate did not affect hematologic parameters in either sham or PG-PS injected anemic animals.	301_05_3510_047_A01	4.2.1.1-7
Efficacy in 5/6 Nephrectomy Model of Anemia Associated to Chronic Kidney Failure	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 20, 40 ^g	M/8 or 9	Roxadustat at both doses corrected anemia by normalizing Hb, Hct and RBC in nephrectomized animals. Roxadustat did not affect markers of kidney failure compared to vehicle.	301_06_3510_071_A01	4.2.1.1-8

CP4H: Collagen prolyl 4-hydroxylase; Dcytb: Duodenal cytochrome b; DMT1: Divalent metal transporter 1; EPO: Erythropoietin; F: Female; FIH: Factor inhibiting HIF; Hct: Hematocrit; Hb: Hemoglobin; HIF: Hypoxia-inducible factor; M: Male; MCH: Mean corpuscular hemoglobin; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: Mean

^f TIW for 4 weeks

^g TIW for 1 week, followed by twice per week for second week

corpuscular volume; NA: Not applicable; PG-PS: Peptidoglycan-polysaccharide; PHD: Prolyl hydroxylase domain; po: Oral administration; RBC: Red blood cell; RETI: Reticulocyte; TIW: Three times weekly.

2.6.3.3 副次的薬理試験

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/No. per Group	Noteworthy Findings	Report/Study Number	CTD Number
In Vitro Receptor Binding and Enzyme Inhibition Profile	In Vitro Assay (receptors, transporters, ion channels and enzymes)	NA	10 µmol/L	NA	Significant inhibition (>35%) in CCK _A receptor, D4.4, NE transporter and DA transporter assays at 10 µmol/L.	301_13_3010_009A2	4.2.1.2-1
In Vitro Dose Response Curves for Ligand and Receptor Binding	In Vitro Assay (human receptors and transporters)	NA	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 20, 50, 100 µmol/L	NA	CCK _A receptor: IC ₅₀ = 9.9 µmol/L, K _i = 7.4 µmol/L; D4.4: less than 25% inhibition up to 100 µmol/L; DA transporter: IC ₅₀ = 18 µmol/L, K _i = 11 µmol/L; NE transporter: IC ₅₀ = 15 µmol/L, K _i = 11 µmol/L.	301_04_3010_010	4.2.1.2-2
Thyroid Receptor Radioligand Binding Assay	In Vitro Assay (rat receptors)	NA	Up to 100 µmol/L	NA	TR ligand (T3) and TR agonist (sobetirome) had IC ₅₀ of 66 pmol/L and 45 pmol/L, respectively. Roxadustat exhibited IC ₅₀ of 0.13 µmol/L.	301_16_3040_187	4.2.1.2-3
Thyroid Receptor alpha and beta, Luciferase Reporter Assay ()	In Vitro Assay (human receptors)	NA	Up to 300 µmol/L	NA	Roxadustat exhibited weak activity in the TR _α and TR _β assays. TR activation with roxadustat was only 1.0% and 1.5% of the maximal activation observed with the endogenous ligand (T3) in the TR _α and TR _β assays, respectively.	301_16_3040_185	4.2.1.2-4

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/No. per Group	Noteworthy Findings	Report/Study Number	CTD Number
Thyroid Receptor alpha and beta, beta Lactamase Reporter Assay ([REDACTED])	In Vitro Assay (human receptors)	NA	Up to 300 µmol/L	NA	Roxadustat exhibited weak activity in TRα and TRβ reporter assays. TR reporter activation with roxadustat was 15% and 39% of maximal activation observed with the endogenous ligand (T3) in the TRα and TRβ assays, respectively. Roxadustat EC ₅₀ was 0.2 µmol/L in the TRβ assay. EC ₅₀ could not be determined in the TRα assay.	301_16_3040_186	4.2.1.2-5
Glucose Tolerance Test	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 12.5, 25, 50 – single or TIW ^h	M/8	Single administration of roxadustat 6 hours prior to glucose tolerance test had no significant effect on blood glucose or plasma insulin. TIW administration for 15 days resulted in significantly lower blood glucose and higher plasma insulin at 25 and 50 mg/kg during glucose tolerance test.	3510-10-047	4.2.1.2-6
Effect on Cholesterol and Triglycerides	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 15, 30 – TIW ⁱ 60-Single	M/10	Statistically significantly higher triglyceride levels and lower cholesterol levels (including HDL and LDL levels) compared to vehicle control.	3510-12-005	4.2.1.2-7

^h TIW for 15 daysⁱ TIW for 4 weeks

Type of Study	Species/Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/No. per Group	Noteworthy Findings	Report/Study Number	CTD Number
In Vitro Mechanism of Action of Cholesterol Lowering Effect on HMGCR Enzyme Activity	In Vitro Assay (human enzyme)	in vitro	0.33-100 μ mol/L	NA	No significant inhibition of HMGCR enzyme activity was observed at any of the test concentrations.	301_16_3040_184	4.2.1.2-8
In Vitro Mechanism of Action of Cholesterol Lowering Effect on HIF dependence on HMGCR	In Vitro Assay (human hepatoma cells)	in vitro	0, 30, 60 μ mol/L	NA	The increase in HMGCR protein levels following CD exposure, was reduced in cells that had been treated with roxadustat. This effect was HIF-dependent. Roxadustat increased expression of Insig-2 mRNA, and of Insig-1 mRNA to a lesser extent.	350_15_3040_001	4.2.1.2-9

CCK_A: Cholecystokinin A; CD: 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin; D4.4: Dopamine receptor D4.4; DA: Dopamine; EC₅₀: Concentration required for 50% efficacy; EPO: Erythropoietin; F: Female; Hct: Hematocrit; HDL: High density lipoprotein cholesterol; Hb: Hemoglobin; HMGCR: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; IC₅₀: Concentration required for 50% inhibition; LDL: Low density lipoprotein cholesterol; M: Male; NA: Not applicable; NE: Norepinephrine; po: Oral administration; RBC: Red blood cell; T3: Triiodothyronine TIW: Three times weekly; TR: Thyroid hormone receptor; TR α : Thyroid hormone receptor-alpha; TR β : Thyroid hormone receptor-beta.

2.6.3.4 安全性薬理試験

被験物質：ロキサデュスタット

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report/ Study Number	CTD Number
Cardiovascular System	Human embryonic kidney cell expressing human ether-à-go-go potassium channel	in vitro	0, 100, 200, 300 µmol/L Positive control: Terfenadine (60 nmol/L)	3 or 4	IC ₅₀ of hERG current blockade by roxadustat was estimated to be > 93.2 µmol/L Target concentrations [Measured concentration] and inhibition rates were: 100 µmol/L [93.2 µmol/L]: 16.8% 200 µmol/L [178.2 µmol/L]: 38.2% 300 µmol/L [291.2 µmol/L]: 52.8% (precipitation was observed at 200 µmol/L or more) Positive control terfenadine hERG inhibition at 60 nmol/L: 84.3%	GLP (US FDA, MHLW, OECD)	301_05_3510_038	4.2.1.3-1

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report/ Study Number	CTD Number
Cardiovascular System	Monkey/ Cynomolgus	po	0, 3, 30, 100 ^j	M/4	Administration of 100 mg/kg resulted in a sustained greater heart rate from approximately 7 to 24 hours post-dose as compared to control values. The maximum percent difference from time-matched control values was 55% and the maximum mean heart rate during this time was 145 beats per minute. No effect on blood pressure or ECG parameters was observed at any dose level.	GLP (US FDA, OECD)	301_05_3510_025	4.2.1.3-2
Cardiovascular System (conscious)	Rat/ Sprague Dawley	iv (bolus)	0, 30, 60 ^j	M/6-9	Significant decrease in systolic, diastolic and mean blood pressure with a concomitant increase in heart rate when compared to baseline levels with a single administration of 30 or 60 mg/kg roxadustat.	Non-GLP	3510-09-090	4.2.1.3-3
Cardiovascular System (conscious)	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 3, 10, 30, 60 ^j	M/9-10	There were no changes up to 10 mg/kg roxadustat. 30 and 60 mg/kg roxadustat decreased blood pressure and simultaneously increased heart rate in a dose-dependent manner.	Non-GLP	3510-10-014	4.2.1.3-4

^j Single dose

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report/ Study Number	CTD Number
Cardiovascular System (conscious, under adrenergic blockade)	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 60 ^k	M/10	60 mg/kg roxadustat significantly increased heart rate and decreased mean blood pressure. β_1 -adrenergic blockade with 10 mg/kg metoprolol (iv) partially prevented the increase in heart rate and did not affect the decrease in mean blood pressure.	Non-GLP	3510-10-063	4.2.1.3-5
Cardiovascular System (anesthetized)	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 30, 60 ^k	M/10	Changes in cardiac function at 60 mg/kg roxadustat were consistent with a reflex response to decreased total peripheral resistance. No effect on cardiac contractility was observed.	Non-GLP	3510-15-009	4.2.1.3-6
Cardiovascular System (isolated heart)	Rat/ Sprague Dawley	Perfusion	0, 1, 3, 10 $\mu\text{g/mL}$ ^l	M/6	Roxadustat did not exert direct cardiac effect on heart rate at any concentration. Roxadustat reduced coronary artery resistance at all concentrations.	Non-GLP	3510-15-064	4.2.1.3-7

^k Single dose^l Perfusion for 60 minutes

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report/ Study Number	CTD Number
Cardiovascular System (conscious, regional hemodynamics)	Rat/ Sprague Dawley	iv	0, 3, 30 ^m	M/7-9	30 mg/kg: increase in heart rate and biphasic blood pressure response, with an early transient elevation in mean arterial pressure were followed by a prolonged decrease. In addition, an early short-lived reduction in flow to the renal and mesenteric vascular beds was followed by vasodilatation in renal, mesenteric and hindquarters vascular beds at 30 mg/kg. Response to arterial vasodilator hydralazine (1.25 mg/kg) was monophasic: hydralazine increased heart rate and decreased mean arterial pressure with concomitant increases in blood flow to renal, mesenteric and hindquarters vascular beds.	Non-GLP	BE001764-07	4.2.1.3-8

^m Single dose

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report/ Study Number	CTD Number
Cardiovascular System (conscious, 28 day)	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 20, 40 ⁿ	M/6	Increase in heart rate observed on Day 1 with 20 and 40 mg/kg was diminished on Days 15 and 26. No change in blood pressure was observed with 20 mg/kg. Decreases in blood pressure of similar magnitude were observed on Days 1 and 26 with 40 mg/kg. No decrease in blood pressure was observed on Day 15 with 40 mg/kg.	GLP (US FDA, MHLW, OECD)	352016002	4.2.1.3-9
CNS	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 30, 100, 300 ^o	M & F/5	No roxadustat-related neuro pharmacological or toxicological effects were observed at any dose. No effect on body temperature was observed at any dose.	GLP (US FDA, MHLW, OECD)	301_05_3510_022	4.2.1.3-10
Pulmonary System (anesthetized)	Rat/ Sprague Dawley	iv infusion	0, 10, 30, 100 ^o	M & F/4	No effect on pulmonary parameters was observed at 10 mg/kg. Increased respiratory rate in males and females and increased minute volume in females were observed at 30 mg/kg. Significantly increased respiratory rate and minute volume in males / females and tidal volume in males were observed at 100 mg/kg.	GLP (US FDA, MHLW, OECD)	301_05_3510_023	4.2.1.3-11

ⁿ TIW for 28 days^o Single dose

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender/ No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report/ Study Number	CTD Number
Renal System	Rat/ Sprague Dawley	po	0, 30, 100, 300 ^P	M & F/5	Significant increases in urine volume, pH and Na ⁺ , K ⁺ and Cl ⁻ excretion ratios at ≥30 mg/kg in males/females (except pH and K ⁺ excretion ratio in males at 30 mg/kg, and Na ⁺ and Cl ⁻ excretion ratios in females at 300 mg/kg). Significant increases in urine K ⁺ concentration ≥100 mg/kg in males/females.	GLP (US FDA, MHLW, OECD)	301_05_3510_024	4.2.1.3-12

CNS: Central nervous system; F: Female; hERG: Human ether-à-go-go-related gene; iv: Intravenous administration; M: Male; po: Oral administration; IC₅₀: Concentration required for 50% inhibition; TIW: Three times weekly.

^P Single dose

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

実施なし