バフセオ錠 150mg
バフセオ錠 300mg
製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.4　非臨床試験の概括評価

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.4　非臨床試験の概括評価 6
2.4.1　非臨床試験計画概略 6
2.4.1.1　薬理試験 7
2.4.1.2　薬物動態試験 8
2.4.1.3　毒性試験 8
2.4.2　薬理試験 9
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 9
2.4.2.1.1　*In vitro* 試験 9
2.4.2.1.2　*In vivo* 試験 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 11
2.4.3.1　吸収 11
2.4.3.2　分布 11
2.4.3.3　代謝 12
2.4.3.4　排泄 12
2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用 12
2.4.4　毒性試験 13
2.4.4.1　単回投与毒性試験 13
2.4.4.2　反復投与毒性試験 13
2.4.4.2.1　ラットを用いた反復投与毒性試験 14
2.4.4.2.2　イヌを用いた反復投与毒性試験 14
2.4.4.3　遺伝毒性試験 15
2.4.4.4　がん原性試験 15
2.4.4.5　生殖発生毒性試験 15
2.4.4.6　その他の試験 16
2.4.5　総括及び結論 16
2.4.5.1　薬理試験 16
2.4.5.2　薬物動態 19
2.4.5.3　毒性試験 20
2.4.6　参考文献一覧 22

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ACE	angiotensin-converting enzyme	アンギオテンシン変換酵素
ADME	Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion	吸収，分布，代謝及び排泄
AUC	area under the plasma (milk) concentration-time curve	血漿（乳汁）中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-last}}$	area under the plasma (milk) concentration-time curve from zero up to the last quantifiable concentration time point	投与開始から最終濃度定量可能時点までの血漿（乳汁）中濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	area under the (plasma) concentration-time curve from zero up to infinity with extrapolation of the terminal phase	末端消失相を無限大時間まで外挿した（血漿中）濃度-時間曲線下面積
BA	bioavailability	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein	乳がん耐性たん白質
BSEP	bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CAMK	calcium/calmodulin-dependent protein kinase	Ca^{2+}／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ
CHO 細胞	chinese hamster ovary cell	チャイニーズハムスター卵巣由来細胞
CKD	chronic kidney disease	慢性腎臓病
Cl	chloride	クロール
CL	total clearance	全身クリアランス
C_{max}	maximum (plasma) concentration after administration	最高（血漿中）濃度
EPO	erythropoietin	エリスロポエチン
eq.	equivalent	当量
ESA	erythropoiesis stimulating agent	赤血球造血刺激因子
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
h	hour	時間
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
Hct	hematocrit	ヘマトクリット
HEK293 細胞	human embryonic kidney cells 293	ヒト胎児腎由来細胞 293
hERG	human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HIF	hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
HIF-PH	hypoxia inducible factor prolyl hydroxylase	低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素
HPLC-RI	high performance liquid chromatograph with radioactivity detector	放射能検出器付き高速液体クロマトグラフ

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
HPMC	hydroxypropyl methylcellulose	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
K	potassium	カリウム
K_i	inhibition constant	阻害定数
LC-MS/MS	liquid chromatograph – tandem mass spectrometer	液体クロマトグラフタンデム質量分析計
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	multidrug and toxin extrusion	多剤・毒素排出
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration	平均赤血球ヘモグロビン濃度
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
mRNA	messenger RNA	メッセンジャーRNA
MRP	multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連たん白質
Na	sodium	ナトリウム
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P450	cytochrome P450	シトクロム P450
P_{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
pBZD	peripheral benzodiazepine	末梢性ベンゾジアゼピン
P-gp	P-glycoprotein	P-糖たん白質
PHD	prolyl hydroxylase domain enzyme	プロリン水酸化酵素
QWBA	quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RDW	red blood cell distribution width	赤血球容積粒度分布幅
SLE	supported liquid extraction	液液抽出 SLE 法
$t_{1/2}$	terminal elimination half-life in concentration-time course	濃度推移末端消失相の半減期
TDI	time-dependent inhibition	時間依存的阻害
Tg	transgenic	トランスジェニック
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	time to reach maximum (plasma) concentration	最高（血漿中）濃度到達時間
UDPGA	uridine-5´-diphospho-α-D-glucuronic acid	ウリジン-5’-二リン酸-α-D-グルクロン酸

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
UGT	uridine-5´-diphospho-α-D-glucuronosyltransferase	ウリジン-5’-二リン酸-α-D-グルクロン酸転移酵素
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子
VHL	Von-Hippel-Lindau	フォン・ヒッペル・リンドウ
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.4　非臨床試験の概括評価

MT-6548（一般名：バダデュスタット）はプロリン水酸化酵素（以下，PHD）を阻害する，経口腎性貧血治療薬である．

2.4.1　非臨床試験計画概略

低酸素誘導因子（以下，HIF）は，主に酸素感受性機能を有する HIF-α サブユニット及び恒常的に発現する HIF-β サブユニットから形成されるヘテロ二量体の転写因子である．HIF-α には HIF-1α，HIF-2α 及び HIF-3α の 3 つのアイソフォームが同定されている．HIF-3α は転写活性化に重要な C-terminal transactivation domain を欠いており [1]，低酸素環境への適応性獲得という点においては，HIF-1α 及び HIF-2α が中心的な役割を担っている．

各 HIF-α サブユニットの分子構造内には oxygen-dependent degradation domain と呼ばれる領域が存在し，正常酸素濃度下では同領域内の 2 つのプロリン残基（P402 及び P564）が PHD によって水酸化される．PHD により水酸化を受けた HIF-α は Von-Hippel-Lindau（以下，VHL）と結合し，VHL，elongin B 及び elongin C から成る VBC 複合体によるユビキチン化を受け，速やかに 26S プロテアソームによる分解へと導かれる．なお，PHD 遺伝子は PHD1，PHD2 及び PHD3 の 3 つのアイソザイムが同定されており，いずれも HIF-1α 及び HIF-2α の調節に関与している [2]．結果として，正常酸素濃度下では，細胞内 HIF-α 存在量が著しく減少し，HIF-α–HIF-β から成るヘテロ二量体を形成できず，HIF 経路を介した低酸素応答は抑制されている．

一方，低酸素濃度下では，酸素を補因子とする PHD 活性が低下するため，HIF-α は 26S プロテアソームによる分解を免れて安定化し，細胞内 HIF-α 存在量が増加する．核内に移行した HIF-α は HIF-1β とヘテロ二量体を形成して，標的遺伝子上流に存在する DNA 上の低酸素応答配列に結合し，遺伝子発現を転写レベルで誘導する [3),4)]．

HIF の標的遺伝子の中には，エリスロポエチン（以下，EPO），EPO 受容体，血管内皮増殖因子（以下，VEGF），トランスフェリン，トランスフェリン受容体，フェロポーチン及び二価金属トランスポーターといった赤血球産生，細胞増殖，細胞保護，鉄吸収及び鉄利用に関連した遺伝子が含まれ，それらのたん白発現量が変動することで，生体内の酸素輸送能が高まり，低酸素環境への適応性を獲得する [5)~9)]．

EPO は低酸素に応答して主に腎臓及び肝臓で産生される糖たん白質であり，赤血球系造血前駆細胞に発現する EPO 受容体に作用して骨髄における赤血球産生を促進する．EPO の主要な産生臓器は胎生期では肝臓であるが，出生後には腎臓に切り替わり，その割合はおよそ腎臓 9 に対し，肝臓 1 であるとされている．一方で，重度の低酸素状態に晒されると，生体内の EPO 総産生量に占める肝臓の比率が最大で約 3 割に達することもある [10)]．

慢性腎臓病（以下，CKD）は腎機能が慢性的に低下した状態を示す疾患概念であるが，その原因疾患によらず CKD が進行するに連れて，多くの患者で貧血症状が見られるようになる [11),12)]．CKD に伴う貧血，すなわち腎性貧血の主な原因は，腎臓が持つ重要な機能の 1 つである EPO 産生能が低下し，相対的に EPO が不足するためである [13)~15)]．そのため，腎性貧血に対する有効な治療法は不足した EPO を補うことであり，臨床現場では EPO 受容体に結合して

作用する赤血球造血刺激因子製剤（以下，ESA）が広く使用され，多くの患者で高い治療効果が得られている．一方で，保存期の腎性貧血患者を対象とした複数の ESA 治療介入試験において，13.0 g/dL 又は 13.5 g/dL 以上と高い目標 Hb 値を設定した患者群では，心血管イベント（心筋梗塞，心不全又は心不全による入院，脳卒中など）のリスクが上昇することが示された（CHOIR 試験 [16]及び TREAT 試験 [17]）．CHOIR 試験の二次解析の結果，高用量 ESA の使用頻度が心血管イベントリスクの上昇と相関する可能性が示唆され [18]，また CHOIR 試験データを利用した別の二次解析の結果では，週当たりの ESA 使用量が高い群ほど心血管イベント及び死亡リスクが増加し，ESA の使用量が患者予後を規定する重要な因子である可能性が示唆された [19]．

PHD 活性を阻害し HIF-α を安定化することは，EPO をはじめとする遺伝子発現変動を介した生体内の酸素輸送能を高めることで，腎性貧血に対して有用な治療法と成り得る．また，PHD 活性低下による HIF-α 安定化は，本来生体が低酸素環境への適応性を獲得するために備えている経路であり，これを模倣する低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素（以下，HIF-PH）阻害薬は急激な EPO 濃度増加及び Hb 値上昇を引き起こす可能性が少なく，安定的に Hb 値上昇を維持する腎性貧血治療薬となることが期待される．

非臨床試験では，MT-6548 の薬理，薬物動態及び毒性の特徴を明らかにすることを目的とし，各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した．なお，投与経路及び投与量の記載については［2.6.3］［2.6.5］［2.6.7］に示した．

2.4.1.1　薬理試験

MT-6548 の効力を裏付ける試験として，*in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した．*In vitro* 試験では PHD1，PHD2 及び PHD3 の各アイソフォームに対する阻害作用，HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量増加作用，HIF の標的遺伝子である EPO 及び VEGF 分泌に及ぼす作用をそれぞれ評価した．また，海外マスバランス試験（CI-0008 試験）［2.7.2.2.2.1.4］結果から，ヒト血漿中主要代謝物として検出された MT-6548 O-グルクロン酸抱合体の PHD2 に対する阻害作用を評価した．*In vivo* 試験では，正常動物を用いて，MT-6548 の血中 EPO 増加作用及び赤血球造血亢進作用を評価した．

MT-6548 の副次的薬理試験として，各種受容体等に対するリガンド結合阻害作用及び酵素阻害作用を評価した．本剤が HIF 安定化作用に基づき肺高血圧症を引き起こすリスクを評価するために，テレメトリー測定により肺動脈圧に対する影響を検討した．

MT-6548 の安全性薬理試験として，中枢神経系，心血管系，呼吸器系及び腎／泌尿器系に及ぼす影響について評価した．安全性薬理試験は医薬品規制調和国際会議（以下，ICH）S7A ガイドライン及び S7B ガイドラインに従い，医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（以下，GLP）に準拠して実施した．

2.4.1.2　薬物動態試験

MT-6548 の動物における吸収，分布，代謝及び排泄（以下，ADME）について検討した．薬物動態相互作用に関する評価は MT-6548 に加え，MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体についても評価した．

In vivo 試験では，ラット及びイヌに絶食又は非絶食条件下において MT-6548 又は[^{14}C]標識 MT-6548 を静脈内又は経口投与した．

In vitro 試験において，Caco-2 細胞を用いた膜透過試験，ヒトを含む各種動物血漿を用いたたん白結合試験，各種動物の肝ミクロソームを用いた薬物代謝試験，ウリジン-5'-二リン酸-α-D-グルクロン酸転移酵素（以下，UGT）発現系ミクロソームを用いた代謝分子種の同定試験，ヒト肝ミクロソームを用いた薬物代謝酵素阻害試験，ヒト凍結肝細胞を用いた薬物代謝酵素誘導試験及び Caco-2 細胞，トランスポーターを発現させた細胞や膜小胞を用いたトランスポーターの輸送並びに阻害試験を実施した．

2.4.1.3　毒性試験

MT-6548 の非臨床安全性評価として，単回経口投与毒性試験（ラット及びイヌ），反復経口投与毒性試験（ラット 6 ヶ月間まで，イヌ 9 ヶ月間まで），遺伝毒性試験（細菌を用いた復帰突然変異試験，ほ乳類培養細胞を用いた染色体異常試験，GreenScreen Assay，ラット末梢血リンパ球染色体異常試験及びラット肝コメットアッセイ），がん原性試験［ラット 2 年間及び rasH2 トランスジェニックマウス（以下，Tg）6 ヶ月間］，生殖発生毒性試験（ラット受胎能・初期胚発生試験，ラット及びウサギ胚・胎児発生試験，並びにラット出生前後発生・母体機能試験），急性期死亡の死因検討試験（*in vitro* 溶血性試験，ラット 6 日間反復投与試験），及び光毒性試験（光吸収スペクトル，*in vitro* 光毒性試験，及び *in vivo* 光毒性試験）を実施した．

主な毒性試験に使用するげっ歯類としては，一般的に汎用されており経口投与時に十分な曝露が得られたラットを，同様の理由から非げっ歯類としてはイヌを選択した．また，背景データが豊富なことから，生殖発生毒性試験の非げっ歯類にはウサギを，がん原性試験にはマウス及びラットを選択した．MT-6548 の臨床投与形態を考慮して，反復投与は 1 日 1 回の経口投与とした．

また，代謝物単独での安全性評価の対象外とされるグルクロン酸抱合体を除き，投与薬物に関連する総ての物質の曝露量の 10%を超える代謝物は認められなかったため，ICH M3 (R2)に従って，代謝物単独の毒性試験は実施しなかった．非臨床毒性試験で用いた原薬の不純物プロファイルは臨床試験で用いた原薬及び市販医薬品で用いる予定の原薬ロットの不純物プロファイルと同等である．ICH Q3A (R2)ガイドライン及び ICH Q3B (R2)ガイドラインに規定された安全性確認の必要な閾値を超える不純物はなかったため，個々の不純物に対する非臨床安全性試験は実施しなかった．ICH M7 (R1)ガイドラインに従って実施された，実際の不純物及び潜在的な不純物の遺伝毒性評価結果については，［2.3.S.2.6］項に記載されている．製造工程における管理の詳細については［2.3.S.2.3］項及び［2.3.S.2.4］項に，原薬の規格及び試験法につ

いては［2.3.S.4.1］項にそれぞれ記載されている．主な毒性試験は，ICH M3 (R2) ガイドライン及びその他安全性評価に関する ICH ガイドラインに従い，GLP に準拠して実施した．

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

2.4.2.1.1　*In vitro* 試験

MT-6548 はヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 に対して阻害作用を示し，その 50%阻害濃度（以下，IC_{50} 値）は，それぞれ 15.36 nmol/L，11.83 nmol/L 及び 7.63 nmol/L であった．ヒト肝臓由来細胞株である Hep3B 細胞及びヒト臍帯静脈内皮細胞（以下，HUVEC）を用いた検討では，MT-6548 を 3 μmol/L 以上の濃度で 6 又は 24 時間処理すると，MT-6548 の濃度に応じて HIF-1α たん白発現量を反映するシグナル強度が 1.3～1706.9 倍増加した．HIF-2α たん白発現量に関して，Hep3B 細胞においては MT-6548 による反応性が乏しく，そのシグナル強度増加は 1.0～1.4 倍であった．一方，HUVEC においては MT-6548 により 1.7～82.6 倍増加した．

加えて，MT-6548 は 10 μmol/L 以上の濃度では Hep3B 細胞の EPO 分泌量を有意に増加させた一方で，MT-6548 は 30 μmol/L においても VEGF 分泌量に有意な作用を認めなかった．

MT-6548 のヒト血漿中における主要な代謝物 MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 に対する IC_{50} 値は，2.31 μmol/L であった．

2.4.2.1.2　*In vivo* 試験

正常マウスに MT-6548 を単回静脈内投与（60 mg/kg）又は 4 日間反復経口投与（1 日 3 回，270 mg/kg/日）すると血中 EPO 濃度が増加し，4 日間反復経口投与では網状赤血球比率の増加も認められた．MT-6548 を 7 日間反復経口投与（1 日 1 回，200 mg/kg/日）すると，Hb 値，Hct 値，平均赤血球容積（以下，MCV）及び平均赤血球ヘモグロビン量（以下，MCH）が有意に増加し，脾臓重量の増加及び髄外造血の亢進が認められた．更に，MT-6548 を 28 日間反復経口投与（1 日 1 回，100 mg/kg/日）すると，赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH 及び赤血球容積粒度分布幅（以下，RDW）が対照群と比較して有意に増加した．

同様に，正常ラットに MT-6548 を単回経口投与（1 日 1 回，50 及び 150 mg/kg/日）すると，投与 6 時間後をピークとして，投与 3～24 時間後の血中 EPO 濃度増加が認められた．その一方で，血中 VEGF 濃度には影響が認められなかった．MT-6548 を 8 日間反復経口投与（1 日 1 回，150 mg/kg/日）すると，赤血球数，Hb 値，Hct 値，RDW 及び網状赤血球比率が増加し，肝臓における髄外造血が亢進した．更に，MT-6548 を 14 日間反復経口投与（1 日 1 回，30 及び 90 mg/kg/日）すると，投与 1，7 及び 14 日後に血清 EPO 濃度が増加し，90 mg/kg/日投与群では赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH，RDW 及び網状赤血球数が対照群と比較して有意に増加した．

2.4.2.2　副次的薬理試験

MT-6548 の副次的薬理試験として, 各種受容体等に対するリガンド結合阻害作用及び酵素阻害作用を評価した．MT-6548 は 10 μmol/L の濃度で，末梢性ベンゾジアゼピン受容体（以下，pBZD）に対するリガンドの結合を 70%阻害した．更に，アンギオテンシン変換酵素（以下，ACE）及び Ca^{2+}／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ（以下，CAMK2α）の酵素活性を 10 μmol/L でそれぞれ 60 及び −89%阻害した．ACE については MT-6548 自体が測定系に影響を及ぼした可能性も示唆された．その他の受容体などに対しては，10 μmol/L の濃度で 50%以上又は −50%以下の結合阻害を示さなかった．pBZD 及び ACE に対する作用の濃度依存性を検討した結果，MT-6548 は 300 μmol/L まで pBZD に作用しなかったが，ACE に対して濃度依存的な阻害作用を示し，IC_{50} 値は 72 μmol/L であった．CAMK2α については，MT-6548 は中枢移行性が低いこと（組織分布試験で脳内最高濃度は，血漿中最高濃度に対してラット及びイヌで，それぞれ 1/50 及び 1/100［2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.2］），機能観察総合評価法（以下，FOB）及び毒性試験で行動所見が認められなかったことから濃度依存性の評価を実施しなかった．更に，本剤が HIF 安定化作用に基づき肺高血圧症を引き起こすリスクを評価するために，MT-6548 の 30 及び 90 mg/kg/日をラットへ 29 日間反復経口投与し，テレメトリー測定により，肺動脈圧に対する影響を検討した．その結果, 90 mg/kg/日において肺動脈圧の上昇が認められたものの，右心肥大の指標である Fulton index（右心房と右心室の合計重量/左心房，左心室及び心室中隔の合計重量）にはいずれの用量でも影響は認められなかった．

2.4.2.3　安全性薬理試験

ラットを用いた FOB による一般状態及び行動観察では，120，180 及び 360 mg/kg で投与 8 時間後にのみ排便量が減少したが，最高用量の 360 mg/kg においても一般症状及び行動，並びに神経系に関連する評価パラメータに影響しなかった. MT-6548 はヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子（以下，hERG）電流をすべての処理濃度で阻害したが，濃度依存性は明確でなく，阻害率は 23%でプラトーに達した．

覚醒下ラットを用いたテレメトリー試験では, 最低用量の 120 mg/kg 以上で心拍数の増加が, 180 mg/kg 以上では血圧の軽度な低下及び体温の低下が認められた．覚醒下イヌを用いたテレメトリー試験では, 最低用量の 60 mg/kg 以上で心拍数の増加及び血圧の低下が認められたが, 最高用量の 360 mg/kg まで心電図パラメータ，体温及び活動量には影響が認められなかった．覚醒下ラットにおいて呼吸数, 分時換気量, 一回換気量を測定した結果, 最高用量の 360 mg/kg で投与 8～9 時間後に一回換気量及び分時換気量を増加させたが, 呼吸数には影響しなかった．ラットを用いた腎排泄パラメータ及び水分摂取量への影響の評価では，最高用量の 360 mg/kg まで腎機能に影響しなかった．

2.4.3　薬物動態試験

2.4.3.1　吸収

ラット及びイヌに MT-6548 を単回経口投与したとき，血漿中 MT-6548 濃度はそれぞれ 0.5 時間～2.0 時間，0.4 時間～0.5 時間で C_{max} に到達し，その半減期は 1.1 時間～2.3 時間及び 3.2 時間～4.2 時間であった．静脈内投与後のラット及びイヌにおける CL は 145～226 mL/h/kg 及び 230～275 mL/h/kg であった．また，経口投与及び静脈内投与後の $AUC_{0-\infty}$から算出した BA は，ラット及びイヌにおいてそれぞれ 75%～117%及び 93%～154%であった．ラット及びイヌの薬物動態パラメータに明らかな性差は認められなかった．

ラット及びイヌに MT-6548 をそれぞれ 6 ヶ月間及び 9 ヶ月間反復経口投与したとき，C_{max} 及び AUC_{0-last} はラットでは雌雄共に投与量に応じて増加するか又は用量比よりもやや低く増加し，イヌでは雌雄共にほぼ投与量に応じて増加するか又は用量比よりも高く増加した．曝露量に明らかな性差はなく，反復投与による明らかな曝露量の変動はなかった．

Caco-2 細胞を用いて膜透過性を検討した結果，MT-6548 は高い膜透過性を有していた．

2.4.3.2　分布

ラットに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したとき，すべての組織中放射能濃度は投与後 2 時間で最も高く，その後，血漿中放射能濃度の消失と共に速やかに減少し，半減期は 2.3 時間～6.7 時間であった．イヌに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したとき，眼球中放射能濃度は投与後 4 時間で最も高く，そのほかの組織中放射能濃度は投与後 2 時間で最も高かった．精巣及び副腎における組織中放射能濃度の半減期は 19.5 時間又は 14.9 時間でやや緩やかに消失し，そのほかの組織では血漿中放射能濃度の消失と共に速やかに減少し，半減期は 3.8 時間～8.3 時間であった．

妊娠ラットに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したとき，投与 1 及び 8 時間後における母体の肝，腎皮質及び腎髄質の放射能濃度は母体血液よりも高く，胎児を含むそのほかの組織の放射能濃度は母体血液よりも低かった．胎児中で放射能が検出されたことから MT-6548 又はその代謝物の胎児への移行が示された．

MT-6548 のマウス，ラット，ウサギ，イヌ及びヒトの *in vitro* 血漿たん白結合率は，マウスで 93.2%～96.6%，ラットで 96.4%～99.2%，ウサギで 98.1%～99.3%，イヌで 95.6%～98.2%，ヒトで 99.5%～99.8%であった．MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体のヒトの *in vitro* 血漿たん白結合率は，86.5%～87.8%であった．ラット及びイヌに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したときの放射能の血液／血漿濃度比は，いずれも 1 以下であり血球への移行性は低いことが示された．

2.4.3.3　代謝

MT-6548 の動物又はヒトの主な代謝物として，O-グルクロン酸抱合体，グルコース抱合体，

B504，アシルグルクロン酸抱合体，グルタチオン抱合関連代謝物が認められた．そのうちヒトにおける主要な代謝物はO-グルクロン酸抱合体及びB504であり，ヒト特異的な代謝物は認められなかった．[^{14}C]標識 MT-6548 をラット及びイヌに経口投与したとき，いずれの動物種においても血漿中の主成分は MT-6548 であった．また，ヒト肝，腎及び小腸ミクロソームを用いた検討より，肝及び腎ミクロソームにおいては O-グルクロン酸抱合体が検出され，小腸ミクロソームにおいてはアシルグルクロン酸抱合体と考えられるピークが検出された．

ヒトUGT発現系ミクロソームを用いた検討により，MT-6548のO-グルクロン酸抱合代謝にはUGT1A1，UGT1A7，UGT1A8及びUGT1A9が，アシルグルクロン酸抱合代謝にはUGT1A1及びUGT2B7が関与することが示唆された．

2.4.3.4　排泄

[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したとき，ラットでは投与後 168 時間までに投与放射能の 12.0%～12.3%が尿中に，86.1%～86.6%が糞中に排泄された．イヌでは投与後 168 時間までに投与放射能の 14.6%～18.8%が尿中に，79.6%～84.1%が糞中に排泄された．また，胆管カニュレーションを施したラットに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したとき，投与後 72 時間までに投与放射能の 80.4%～82.9%が胆汁中に排泄された．更にラット胆汁へ排泄された MT-6548 又はその代謝物のうち約 23%は再吸収され，腸肝循環が認められた．以上の結果より，ラット及びイヌにおける MT-6548 及びその代謝物の主要な排泄経路は，胆汁を介した糞中への排泄であると考えられた．

分娩後の授乳ラットに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したときの $AUC_{0\text{-last}}$ の乳汁／母体血漿中放射能濃度比は 6.13 であり，MT-6548 又はその代謝物は乳汁中へ移行することが示された．

2.4.3.5　薬物動態学的薬物相互作用

シトクロム P450（以下，P450）分子種の代謝活性に及ぼす影響について検討した結果，MT-6548 は CYP2B6，CYP2C8，及び CYP2C9 に対し阻害作用を示し，阻害定数（以下，K_i 値）はそれぞれ 110，25.1 及び 48.6 μmol/L であった．一方，MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体は CYP2B6，CYP2C8，及び CYP2C9 に対して阻害作用を示さなかった．また MT-6548 の P450 に対する時間依存的阻害（以下，TDI）作用を検討した結果，CYP2B6 及び CYP3A4/5（基質：テストステロン及びミダゾラム）活性残存率は，1300 μmol/L においてニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（以下，NADPH）非存在下に比べて NADPH 存在下において，それぞれ 17.3%，14.6%及び 16.7%減少した．一方，MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体は TDI 作用を示さなかった．P450 誘導能についてヒト凍結肝細胞を用いて検討した結果，MT-6548 は CYP2B6mRNA に対して発現量の増加作用を示した．一方，CYP3A4mRNA に対して発現量の減少及び CYP3A4/5 代謝活性の低下作用を示した．UGT 分子種の代謝活性に及ぼす影響につ

いて検討した結果，MT-6548 は UGT1A1 に対し阻害作用を示し，IC_{50} 値は 110 μg/mL（358.7 μmol/L）であった．一方，O-グルクロン酸抱合体は阻害作用を示さなかった．また，UGT1A1 誘導能についてヒト凍結肝細胞を用いて検討した結果，MT-6548 は mRNA 発現量の増加作用を示した．

P-糖たん白質（以下，P-gp）及び乳がん耐性たん白質（以下，BCRP）における MT-6548 の輸送能を検討した結果，P-gp の基質ではないが，BCRP の基質であることが示された．また MT-6548 は，BCRP の典型的基質輸送に対し阻害作用を示し，IC_{50} 値は 10.4 μg/mL であった．P-gp に関しても阻害作用を示したものの，その阻害作用は弱く最高評価濃度（80 μg/mL）において 50%以下であった．多剤耐性関連たん白質 2（以下，MRP2）における MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体の輸送能を検討した結果，MRP2 の基質であることが示された．MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体は，P-gp 及び BCRP の典型的基質輸送に対し阻害作用は示さなかった．有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1 及び 1B3（以下，OATP1B1 及び OATP1B3），有機アニオントランスポーター1 及び 3（以下，OAT1 及び OAT3），有機カチオントランスポーター2（以下，OCT2），及び多剤・毒素排出（以下，MATE）1 及び 2-K たん白質における細胞内取り込みを検討した結果，MT-6548 は OATP1B1，OAT1 及び OAT3 の基質であり，OATP1B1，OAT1 及び OAT3 に対しては阻害作用を示し，IC_{50} 値はそれぞれ 4.02，3.76 及び 0.336 μg/mL であった．一方，MP-6548 の O-グルクロン酸抱合体は，OATP1B3 及び OAT3 の基質であった．OAT1 及び OAT3 に対しては阻害作用を示し，IC_{50} 値はそれぞれ 5.93 及び 9.10 μg/mL であった．

2.4.4　毒性試験

2.4.4.1　単回投与毒性試験

ラット及びイヌを用いて，単回経口投与毒性試験を実施した．概略の致死量は，ラットでは 200 mg/kg 超，イヌでは 700 mg/kg 超であった．主な毒性変化は，ラットでは体重減少，赤血球数，Hb，Hct，血小板数，白血球数及び好中球数の高値，トリグリセリドの高値，肝臓の空胞化及び炎症などであり，イヌでは嘔吐であった．

2.4.4.2　反復投与毒性試験

ラットを用いた 7 日間（非 GLP 試験），14 日間，4 週間，3 ヶ月間及び 6 ヶ月間反復経口投与毒性試験，並びにイヌを用いた 7 日間（非 GLP 試験），14 日間，4 週間，3 ヶ月間及び 9 ヶ月間反復経口投与毒性試験を実施した．

2.4.4.2.1　ラットを用いた反復投与毒性試験

ラットを用いた反復投与毒性試験において，最小致死量は 6 ヶ月間反復投与毒性試験における 60 mg/kg/日であった．7 日間反復投与毒性試験における急性期死亡の死因に関しては，溶

血の影響などを検討した結果，特異的な要因は見出されず，複合的な要因と考えられた（2.4.4.6）．一方，14 日間以上の反復投与毒性試験における亜急性から慢性期死亡の死因は薬理作用の過剰発現に起因した赤血球増加が関連するものと考えられた．

主な毒性は過剰な薬理作用に基づく変化であった．すなわち，HIF 安定化による赤血球増加に伴う変化の増悪化が種々の臓器で認められた．薬理作用に関連する所見に加えて，各試験では以下の所見が認められた．7 日間反復投与毒性試験（0, 200, 400, 500, 600, 750 及び 2000 mg/kg/日）では 500 mg/kg/日以上で死亡が，200 mg/kg/日以上では，体重増加量の低値が認められた．14 日間反復投与毒性試験（0，30，120 及び 240 mg/kg/日）では，240 mg/kg/日で体重増加量及び摂餌量の低値，腎尿細管の空胞化などの変化が認められ，無毒性量は 120 mg/kg/日と結論した．4 週間反復投与毒性試験（0，40，80，120 及び 200 mg/kg/日）では，200 mg/kg/日で死亡が見られ，無毒性量は雌雄ともに 120 mg/kg/日と結論した．3 ヶ月間反復投与毒性試験（0, 40, 80/70 及び 120/90 mg/kg/日）では，80/70 mg/kg/日以上で死亡／瀕死例が認められ，無毒性量は雌雄ともに 40 mg/kg/日と結論した．なお，本試験で認められた変化は，赤血球分布幅の低値を除きいずれも 3 ヶ月間の回復期間中に回復した．6 ヶ月間反復投与毒性試験（0，20，40 及び 60 mg/kg/日）では，60 mg/kg/日で死亡が認められ，無毒性量は 40 mg/kg/日と結論した．

2.4.4.2.2　イヌを用いた反復投与毒性試験

イヌを用いた反復投与毒性試験では，薬理作用に起因した変化（赤血球系パラメータの高値，骨髄の赤血球系細胞増加など）に加えて嘔吐が見られた．また，イヌ特有の所見として，副腎皮質において，小型のリンパ球及び大型の単核細胞の集簇を特徴とし，まれに壊死細胞を伴う単核細胞及び多核細胞の浸潤，皮質細胞の肥大といった非増殖性の所見が 14 日間以上の反復投与毒性試験で認められた．これらの所見は投与期間の延長に伴って進行せず，回復性が認められた．これらの副腎の所見は所見のグレードが軽微又は変化が限局的で副腎機能に影響を及ぼす可能性が低い，若しくは回復性が認められるなどの理由から毒性学的意義が低いと判断した．薬理作用に関連する所見に加えて，各試験では以下の所見が認められた．

7 日間反復投与毒性試験（0，50，150 及び 400 mg/kg/日）では，400 mg/kg/日で嘔吐が見られ，150 mg/kg/日は忍容性のある用量と結論した．14 日間反復投与毒性試験（0，30，60，120 及び 360 mg/kg/日）では，120 mg/kg 日以上で持続的な嘔吐による体重増加量及び摂餌量の低値が見られた．30 mg/kg/日以上で副腎において単核細胞浸潤が認められたが，60 mg/kg/日以下の所見は軽微であり毒性学的意義が低いと判断し，無毒性量を 60 mg/kg/日と結論した．4 週間反復投与毒性試験［0，30，60，60+Fe65 及び 120 mg/kg/日，60+Fe65 mg/kg/日には 65 mg の元素鉄（Fe）となる硫酸第一鉄錠剤を隔日に給餌 2～4 時間後に投与初日の 4 日前から投与 28 日まで与えた］では，120 mg/kg/日で嘔吐，体重減少及び摂餌量の低値が見られた．30 mg/kg/日以上で副腎皮質において単核細胞浸潤，120 mg/kg/日では壊死細胞を伴う多核細胞浸潤も認められたが，60 mg/kg/日以下で認められた所見はいずれも軽微であり，60+Fe65 mg/kg/日を除いた群のすべての所見に回復性が認められた．30 mg/kg/日の所見は毒性学的意義が低いと判断

し，無毒性量を 30 mg/kg/日と結論した．3 ヶ月間反復投与毒性試験（0，25，45 及び 90 mg/kg/日）では，90 mg/kg/日において薬理作用の過剰発現に基づく赤血球増加を示す個体が認められ，動物が死亡する可能性があると判断して，投与 43 日以降は 65 mg/kg/日に投与量を減じた．副腎では，25 mg/kg/日以上で単核細胞及び多核細胞の浸潤が認められた．所見のグレードと回復性の有無を考慮して，45 mg/kg/日以下の所見は毒性学的意義が低いと判断し，無毒性量を 45 mg/kg/日と結論した．9 ヶ月間反復投与毒性試験（0, 10, 25 及び 50 mg/kg/日）では，50 mg/kg/日投与の雌の 1 例について赤血球増加に関連した状態悪化により瀕死期解剖した．この動物の解剖時の曝露量は最終投与時の雌雄の平均値の 2 倍以上であった．副腎では，10 mg/kg/日以上で単核細胞浸潤及び皮質細胞の肥大が認められたが，回復性が認められ，壊死性の変化は認められていないことから毒性学的意義は低いと判断し，無毒性量を雄で 50 mg/kg/日，雌で 25 mg/kg/日と結論した．

2.4.4.3　遺伝毒性試験

細菌を用いる復帰突然変異試験では陰性であった．チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（以下，CHO 細胞）を用いる染色体異常試験及び GreenScreen Assay において陽性であったが，ラットを用いた末梢血リンパ球染色体異常試験及びラットを用いた肝コメットアッセイでは陰性であり，MT-6548 には遺伝毒性リスクがないと結論した．

2.4.4.4　がん原性試験

ラットを用いた 2 年間反復経口投与がん原性試験（0，2，7 及び 20 mg/kg/日）及び rasH2 Tg マウスを用いた 6 ヶ月間反復経口投与がん原性試験（0，5，15 及び 50 mg/kg/日）では，投薬に関連する腫瘍発現の増加は認められなかった．

2.4.4.5　生殖発生毒性試験

雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験（0，40，80 及び 120 mg/kg/日）では，120 mg/kg/日まで受胎能及び初期胚発生に影響は認められなかった．ラットを用いた胚・胎児発生に関する試験（0，40，80 及び 160 mg/kg/日）では，催奇形性は認められず，母動物の体重増加量及び摂餌量の低値が見られた 160 mg/kg/日において，胎児体重の低値及び骨化不全が見られ，胚・胎児発生における無毒性量は 80 mg/kg/日と結論した．ウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験（0，10，25 及び 50 mg/kg/日）では，50 mg/kg/日まで胚・胎児毒性及び催奇形性を示す所見は見られなかった．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（0，20，40 及び 80 mg/kg/日）では，80 mg/kg/日で F_1 出生児の体重低値が見られたことから，F_1 出生児の生後発育に対する無毒性量は 40 mg/kg/日と結論した．F_1 出生児の機能発達及び生殖機能に対する影響は最高用量まで認められず，無毒性量は 80 mg/kg/日と結論した．

2.4.4.6　その他の試験

ラット 7 日間反復投与毒性試験の 500 mg/kg/日以上で認められた死亡の原因究明として，*in vitro* 溶血性試験及びラットを用いた 6 日間反復投与試験を実施した．ラット，マウス及びイヌの全血を用いた *in vitro* 溶血性試験では，1000 μmol/L まで溶血は認められなかった．ラットを用いた 6 日間反復投与試験（0，500 及び 750 mg/kg/日）では，500 mg/kg/日の毒性評価群で死亡／瀕死例が 3 例認められ，1 例では，肺における重度の出血が死因である可能性が高いと判断したが，他の死亡した 2 例では溶血を示唆する変化が認められず死因を特定できなかった．以上より，ラットの 7 日間反復投与毒性試験で認められた急性期死亡の死因は複合的な要因と推察された．

MT-6548 をヒトに単回経口投与したときの血漿中主要代謝物として MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体が確認された．O-グルクロン酸抱合体は解毒抱合型代謝物であり毒性発現に関与することはないことから，代謝物の毒性試験は不要と判断した．

BALB/c 3T3 細胞を用いた光細胞毒性試験で陽性であったが，ラットを用いた *in vivo* 光毒性試験（0，60，180 及び 400 mg/kg/日）では，400 mg/kg/日まで眼又は皮膚に影響は認められず，無毒性量は 400 mg/kg/日と結論した．

2.4.5　総括及び結論

2.4.5.1　薬理試験

MT-6548 は *in vitro* 試験において，ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 に対して阻害作用を示し，その IC_{50} 値は，それぞれ 15.36 nmol/L，11.83 nmol/L 及び 7.63 nmol/L であった．MT-6548 を Hep3B 細胞に添加すると HIF-1α たん白発現量が増加し，HUVEC に添加すると HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量が増加した．加えて，MT-6548 は Hep3B 細胞の EPO 分泌量を有意に増加させた一方で，VEGF 分泌量に有意な作用を認めなかった．これらの結果から，MT-6548 による PHD の酵素活性阻害は HIF-1α 及び HIF-2α の安定化をもたらし，たん白発現量が増加した結果，EPO 産生が亢進することが示された．

MT-6548 のヒト血漿中主要代謝物である MT-6548 O-グルクロン酸抱合体の PHD2 に対する IC_{50} 値は，2.31 μmol/L であった．MT-6548 と比較して 1/200 程度の阻害活性であり，*in vivo* 薬理作用に及ぼす影響は小さいと推察された．

In vivo 試験において，正常マウスに MT-6548 を単回静脈内投与又は 4 日間反復経口投与すると血中 EPO 濃度が増加し，4 日間反復経口投与では網状赤血球比率も増加した．更に，MT-6548 を 7 日間あるいは 28 日間反復経口投与すると赤血球造血亢進を示唆する血液学的パラメータの上昇が認められた．同様の結果は正常ラットを用いた検討からも得られ，MT-6548 を単回経口投与すると，投与 3～24 時間後の血中 EPO 濃度が増加する一方で，血中 VEGF 濃度には影響が認められなかった．MT-6548 を 8 日間あるいは 14 日間反復経口投与すると赤血球造

血亢進を示唆する血液学的パラメータの上昇が認められた.

これら非臨床での効力を裏付ける試験成績から，MT-6548 の経口投与により PHD 活性を阻害すると，HIF-α たん白が安定化し，赤血球産生亢進用を有する EPO 産生が促進され，赤血球造血が亢進することが確認された．MT-6548 は，これら作用を介して腎性貧血の主な原因と考えられる相対的な EPO 不足を補い，生体内で血液の酸素運搬能増加をもたらす有用な腎性貧血治療薬となることが期待される.

副次的薬理試験として, 各種受容体等に対する選択性を検討した結果, MT-6548 は 10 μmol/L の濃度で, pBZD に対するリガンドの結合と, ACE 及び CAMK2α の酵素活性をそれぞれ 70%, 60%及び −89%阻害した．ACE については MT-6548 自体が測定系に影響を及ぼした可能性も示唆された．エスノブリッジング試験（CI-0020 試験）において日本人健常人に維持投与量の上限量（600 mg）を投与した際の遊離型の C_{max}（254 ng/mL）[2.7.6.9]と評価した濃度（10 μmol/L）の比は 12 倍であった．MT-6548 の中枢移行性が低い（組織分布試験で脳内最高濃度は，血漿中最高濃度に対してラット及びイヌで，それぞれ 1/50 及び 1/100［2.6.4.4.1 及び 2.6.4.4.2］）ことを考えあわせると，CAMK2α に対する作用が発現する可能性は低いと考えられた．pBZD と ACE に対する作用の濃度依存性を検討した結果，pBZD に対しては 300 μmol/L まで阻害作用を示さなかったが，ACE に対する IC_{50} 値は 72 μmol/L であった．これらの濃度は日本人健常人に維持投与量の上限量投与後の遊離型 C_{max} に対してそれぞれ 362 倍及び 87 倍であり，上記受容体等に作用を示す濃度はヒトで想定される血漿中濃度と比較して高い濃度と考えられる. なお, 安全性薬理試験においては, 心血管系や呼吸器系に対して軽微な所見が認められているが, これらの所見が見られた用量での血漿中濃度は上記の受容体等への作用が発現する濃度に達していないことから，上記受容体等への結合活性の寄与は小さいと考えられた.

本剤が HIF 安定化作用に基づき肺高血圧症を引き起こすリスクを評価するために，MT-6548 をラットに 29 日間反復経口投与し，テレメトリー測定により，肺動脈圧に対する影響を検討した．その結果，90 mg/kg/日において有意な肺動脈圧の上昇が認められたものの，右心肥大の指標である Fulton index（右心房と右心室の合計重量/左心房, 左心室及び心室中隔の合計重量）にはいずれの用量でも影響は認められなかった．MT-6548 による肺動脈圧の上昇は，薬理作用の過剰発現に基づき血液の粘性が高まり, 肺動脈の血管抵抗が高まることに起因すると考えられる．これまで実施した MT-6548 の毒性試験において，2 年間までの投与で右心室肥大や血管肥厚などの所見は認められておらず, MT-6548 が右心室や肺動脈のリモデリングを引き起こすリスクは低いと考えられた.

安全性薬理試験として，中枢神経系，心血管系，呼吸器系及び腎／泌尿器系に対する MT-6548 の影響を検討した．以下にその結果の概要と考察，及び日本人健常人に維持投与量の上限量投与後の C_{max}［総薬物濃度（たん白結合型+遊離型）及び遊離型でそれぞれ，84800 ng/mL, 254 ng/mL］［2.7.6.9］に基づいた安全域を記載した．なお，ラットを用いた安全性薬理試験の

安全域は，試験内でトキシコキネティクス評価を未実施のため，ラット 14 日間反復経口投与毒性試験［2.6.7.7.A］における雄の Day 1 の C_{max} から外挿した値を用いて算出した．

中枢神経系については，ラットを用いた FOB により一般症状及び行動への影響を検討した結果，最高用量である 360 mg/kg まで一般症状及び行動，並びに神経系への影響は認められず，総薬物濃度及び遊離型に対する安全域はそれぞれ 6 倍及び 27 倍であった．

心血管系については，hERG 電流への影響，並びに覚醒下ラット及びイヌを用いて血圧，心拍数及び心電図への影響を検討した．hERG チャネル導入 HEK293 細胞における hERG 電流に対して最低濃度の 9.5 μmol/L から有意な阻害作用を示したが，濃度依存性は明確でなく，阻害率は 23%でプラトーに達した．評価した最高濃度の 284.4 μmol/L は日本人健常人に維持投与量の上限量投与後の遊離型 C_{max} に対して 300 倍以上に相当する濃度である．覚醒下イヌを用いたテレメトリー試験において，心電図に対しては最高用量の 360 mg/kg まで影響は認められなかった．360 mg/kg 投与 4 時間後の血漿中 MT-6548 濃度（総薬物濃度及び遊離型はそれぞれ 264800，11651 ng/mL）から求めた QT 延長に対する総薬物濃度及び遊離型に対する安全域はそれぞれ 3 倍及び 46 倍であり，hERG 試験の結果と合わせて，MT-6548 の QT 延長リスクは低いと考えられた．覚醒下ラットを用いたテレメトリー試験では，最低用量の 120 mg/kg 以上で心拍数の増加が，180 mg/kg 以上で血圧の低下が認められた．覚醒下イヌを用いたテレメトリー試験においては最低用量の 60 mg/kg から血圧の低下と心拍数の増加が認められた．血圧の低下と心拍数の増加が認められた総薬物濃度及び遊離型の C_{max} はラットでそれぞれ 162000 及び 2268 ng/mL であり，イヌではそれぞれ 14100 及び 254 ng/mL であった．日本人健常人に維持投与量の上限量投与後の C_{max} に対してラットでは 2 倍（総薬物濃度）及び 9 倍（遊離型），イヌでは 0.2 倍（総薬物濃度）及び 1 倍（遊離型）に相当する濃度であった．副次的薬理試験において MT-6548 は ACE に対して阻害作用を示したが，ラット及びイヌにおいて血圧低下を示した遊離型の曝露量は ACE に対する IC_{50} 値（72 μmol/L）の約 1/100～約 1/2 であった．このことから MT-6548 による血圧低下に対して ACE 阻害作用の寄与は小さいと考えられた．

呼吸器系については，覚醒下ラットを用いて一回換気量，分時換気量及び呼吸数を評価した．その結果，最高用量の 360 mg/kg では投与 8～9 時間後に呼吸数の変化を伴わず，一回換気量及び分時換気量の軽度な増加が認められ，総薬物濃度及び遊離型に対する安全域はそれぞれ 3 倍，13 倍であった．一回換気量及び分時換気量に対する効果，並びに t_{max} 後の遅延効果（約 6 時間）は，HIF-PH 阻害薬の期待される薬理作用による疑似低酸素状態に対する換気適応反応と考えられた [20)]．

腎／泌尿器系については，ラットを用いて腎排泄パラメータ及び水分摂取量への影響を評価した結果，最高用量の 360 mg/kg まで腎機能に対して影響は認められず，総薬物濃度及び遊離型に対する安全域はそれぞれ 6 倍，27 倍であった．

以上のように，安全性薬理試験ではラット及びイヌでの血圧低下と心拍数増加，並びにラットにおける換気量の軽度な増加が認められたが，これらの作用は薬理作用に基づく低酸素への適応反応と考えられた．他には明らかな影響は認められず，臨床使用時に中枢神経系，心管系，呼吸器系及び腎／泌尿器系に有害な影響を及ぼす可能性は低いと判断された．

2.4.5.2　薬物動態

ラット及びイヌに MT-6548 を単回経口投与したときの MT-6548 濃度はそれぞれ 0.5 時間～2.0 時間，0.4 時間～0.5 時間で C_{max} に到達し，その半減期は，1.1 時間～2.3 時間及び 3.2 時間～4.2 時間であった．このことから，MT-6548 は経口投与後速やかに吸収され，速やかに消失することが示された．また，静脈内投与後の CL は肝血流量より低く，初回通過効果を受けにくいことが推察された．ラット及びイヌにおける経口投与時の BA は，それぞれ 75%～117%及び 93%～154%であり，どちらの動物種においても良好であった．胆管カニュレーションを施したラットに[^{14}C]標識 MT-6548 を経口投与したときの胆汁と尿中に排泄された放射能の合計から，投与量の 91.4%～94.2%は消化管から吸収されると推定された．また，Caco-2 細胞を用いて膜透過性を検討した結果, MT-6548 は高い膜透過性を示した. 以上のことから, MT-6548 の消化管における吸収は良好であると推察された．ラット及びイヌに MT-6548 をそれぞれ 6 ヶ月間及び 9 ヶ月間反復経口投与したとき，C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}last}$ はラットでは雌雄共に投与量に応じて増加するか又は用量比よりもやや低く増加し, イヌでは雌雄共にほぼ投与量に応じて増加するか又は用量比よりも高く増加した．曝露量に明らかな性差はなく，反復投与による明らかな曝露量の変動はなかった．

ラット及びイヌに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したとき，イヌの眼球中で放射能濃度が投与 4 時間後で最も高かったが，ラット及びイヌのそのほかの臓器では投与 2 時間後に最も高かった. また, イヌの精巣及び副腎における組織中放射能濃度は半減期 19.5 時間又は 14.9 時間でやや緩やかに消失したが, ラット及びイヌのそのほかの臓器では血漿中放射能濃度の消失と共に速やかに減少し，半減期は 2.3 時間～8.3 時間であった．以上の結果より，MT-6548 又はその代謝物の組織中の顕著な残留性は無いものと考えられた. 妊娠ラットを用いた検討において MT-6548 又はその代謝物の胎児への移行が示唆された．MT-6548 のマウス，ラット，ウサギ，イヌ及びヒトの *in vitro* 血漿たん白結合率は，マウスで 93.2%～96.6%，ラットで 96.4%～99.2%，ウサギで 98.1%～99.3%，イヌで 95.6%～98.2%，ヒトで 99.5%～99.8%であった．MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体のヒトの *in vitro* 血漿たん白結合率は, 86.5%～87.8%であった．ラット及びイヌに[^{14}C]標識 MT-6548 を単回経口投与したときの放射能の血液／血漿濃度比は，いずれも 1 以下であり血球への移行性は低いことが示された．

MT-6548 の動物又はヒトの主な代謝物として，O-グルクロン酸抱合体，グルコース抱合体，B504，アシルグルクロン酸抱合体，グルタチオン抱合関連代謝物が認められた．そのうちヒトにおける主要な代謝物は O-グルクロン酸抱合体及び B504 であり, ヒト特異的な代謝物は認められなかった．[^{14}C]標識 MT-6548 をラット及びイヌに経口投与したとき，いずれの動物種においても血漿中の主成分は MT-6548 であった．ヒト UGT 発現系ミクロソームを用いた検討により，MT-6548 の O-グルクロン酸抱合代謝には UGT1A1，UGT1A7，UGT1A8 及び UGT1A9 が，アシルグルクロン酸抱合代謝には UGT1A1 及び UGT2B7 が関与することが示唆された．

ラット及びイヌのいずれの動物種においても MT-6548 及びその代謝物は主に糞中に排泄さ

れ，尿中への排泄は 20%未満であった．ラットを用いた評価で胆汁への排泄が認められたことから，MT-6548 及びその代謝物の主要な排泄経路は胆汁を介した糞中への排泄であると考えられた．また，ラット胆汁へ排泄された MT-6548 又はその代謝物の約 23%は再吸収され，腸肝循環が認められた．分娩後の授乳ラットを用いた評価で MT-6548 又はその代謝物の乳汁への移行が認められた．

P450 分子種の代謝活性に及ぼす影響について検討した結果，MT-6548 は CYP2B6，CYP2C8 及び CYP2C9 に対し阻害作用を示し，K_i 値はそれぞれ 110，25.1 及び 48.6 μmol/L であった．P450 誘導能について検討した結果，MT-6548 は CYP2B6 に対して mRNA 発現量の増加作用を示した．また，各種トランスポーター輸送能及び阻害作用について検討した．MT-6548 は BCRP，OATP1B1，OAT1 及び OAT3 の基質であることが示された．また，MT-6548 は BCRP，OATP1B1，OAT1 及び OAT3 に対して阻害作用を示し，IC_{50} 値はそれぞれ 10.4，4.02，3.76 及び 0.336 μg/mL であった．O-グルクロン酸抱合体は，MRP2，OATP1B3 及び OAT3 の基質であり，また OAT1 及び OAT3 に対して阻害作用を示し，IC_{50} 値はそれぞれ 5.93 及び 9.10 μg/mL であった．

2.4.5.3　毒性試験

MT-6548 の単回経口投与時の概略の致死量は，ラットでは 2000 mg/kg 超，イヌでは 700 mg/kg 超であった．

反復経口投与毒性試験では，ラットを用いた試験において最小致死量は 6 ヶ月間反復投与毒性試験における 60 mg/kg/日であった．7 日間反復投与毒性試験における急性期死亡の死因に関しては，溶血の影響などを検討した結果，特異的な要因は見出されず，複合的な要因と考えられた．一方，14 日間以上の期間の亜急性から慢性期おける反復投与毒性試験における死因は薬理作用の過剰発現による赤血球増加と考えられた．

反復投与毒性試験の無毒性量は，ラットを用いた 6 ヶ月間反復投与毒性試験では 40 mg/kg/日，イヌを用いた 9 ヶ月間反復投与毒性試験では雄で 50 mg/kg/日，雌で 25 mg/kg/日と結論した．エスノブリッジング試験（CI-0020 試験）で日本人健常人に 600 mg を投与した際の血漿中薬物濃度［2.7.6.9］との安全域は，ラットは雄で 1.2 倍（遊離型），0.4 倍（総薬物濃度），雌で 1.4 倍（遊離型），0.5 倍（総薬物濃度），イヌは雄で 0.8 倍（遊離型），0.1 倍（総薬物濃度），雌で 0.5 倍（遊離型），0.1 倍（総薬物濃度）であった［表 2.6.6.9－1］．ラットにおける主な毒性所見は，薬理作用に基づく変化であった．イヌでは薬理作用に基づく変化に加えて，嘔吐が見られた．更に副腎皮質に小型のリンパ球及びより大型の単核細胞を主体とし，まれに好中球，形質細胞及び壊死細胞を含む単核細胞浸潤，肥大した多核細胞などの病理組織所見が認められた．副腎に認められたこれらの変化は 14 日間以上の反復投与毒性試験で認められたが，以下の理由から毒性学的意義は低いと考える．1）副腎の病理組織所見は，変化を示す細胞が少数であり，副腎機能に影響する可能性が低いことから，無症候性のものであると考えられる．9 ヶ月間反復投与毒性試験では，副腎機能不全の評価項目である副腎重量の変化，血清 Na 又は血清 Cl の減少，血清 K の増加は認められず，関連症状も見られていない．2）すべての変化が

回復期間を通じて完全に消失しないものの，可逆性変化である．3）この変化はマウス及びラットでは認められておらず，イヌの副腎に特有の変化である．また，国内第三相臨床試験においてデヒドロエピアンドロステロン硫酸を用いて副腎機能を評価したところ, MT-6548 投与後に顕著な変化は認められなかった．以上より，イヌで見られた副腎の変化は，患者における臨床安全性の懸念に結びつく可能性は低いと考えられる．

遺伝毒性試験について，細菌を用いる復帰突然変異試験，CHO 細胞を用いる染色体異常試験，GreenScreen Assay，ラットを用いた末梢血リンパ球染色体異常試験及びラットを用いた肝コメットアッセイで評価し，MT-6548 には遺伝毒性リスクがないと結論した．

ラットを用いた 2 年間反復経口投与がん原性試験及び rasH2 Tg マウスを用いた 6 ヶ月間反復経口投与がん原性試験では，投薬に関連する腫瘍発現発現率の増加は認められなかった．

生殖発生毒性試験について, 雌雄ラットを用いた受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験では，最高用量の 120 mg/kg/日まで受胎能及び初期胚発生に影響は認められなかった．ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生に関する試験では，いずれの動物種においても催奇形性は認められず，ラットでは 160 mg/kg/日において，胎児体重の低値及び骨化不全が見られ，胚・胎児発生における無毒性量は 80 mg/kg/日と結論した．一方，ウサギでは，最高用量の 50 mg/kg/日まで胚・胎児毒性を示す所見は見られなかった．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では，80 mg/kg/日で F_1 出生児の体重低値が見られ，F_1 出生児の生後発育に対する無毒性量は 40 mg/kg/日と結論した．F_1 出生児の機能発達及び生殖機能に対する影響は最高用量まで認められず，無毒性量は 80 mg/kg/日と結論した．

ラット 7 日間反復投与毒性試験の 500 mg/kg/日以上で認められた急性期死亡の原因究明として，*in vitro* 溶血性試験及びラットを用いた 6 日間反復投与試験を実施した．ラット，マウス及びイヌの全血を用いた *in vitro* 溶血性試験では，1000 μmol/L まで溶血は認められなかった．ラットを用いた 6 日間反復投与試験では，500 mg/kg/日の毒性評価群で死亡／瀕死例が 3 例認められ，1 例では肺における重度の出血が死因である可能性が高いと判断したが，他の 2 例では溶血を示唆する変化はいずれの個体でも認められず死因を特定できなかった．以上より，ラットの 7 日間反復投与毒性試験で認められた急性期死亡の死因は複合的な要因と推察された．

光安全性評価として，BALB/c 3T3 細胞を用いた光細胞毒性試験で陽性であったが，ラットを用いた *in vivo* 光毒性試験では，400 mg/kg/日まで眼又は皮膚に影響は認められず，光毒性リスクは低いと判断した．

以上のように, 非臨床薬理試験において, MT-6548 は経口投与可能な HIF-PH 阻害薬として，持続的に Hb 値を上昇させた．毒性試験において重篤な毒性は認められず，また良好な薬物動態特性を示すことが明らかになった．したがって，MT-6548 は腎性貧血に対して，安全かつ有効な治療薬となることが期待される．

2.4.6　参考文献一覧

1) Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. Expression and characterization of hypoxia-inducible factor (HIF)-3alpha in human kidney: suppression of HIF-mediated gene expression by HIF-3alpha. Biochem Biophys Res Commun. 2001;287(4):808-13.［資料番号：4.3-1］
2) Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. J Biol Chem. 2004;279(37):38458-65.［資料番号：4.3-2］
3) Siddiq A, Aminova LR, Ratan RR. Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. Neurochem Res. 2007;32(4-5):931-46.［資料番号：4.3-3］
4) Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, master regulators of the hypoxia response. Acta Physiol. 2013;208(2):148-65.［資料番号：4.3-4］
5) Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol. 2000;88(4):1474-80.［資料番号：4.3-5］
6) Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2α in development and disease. Cell Death Differ. 2008;15(4):628-34.［資料番号：4.3-6］
7) Yeo EJ, Cho YS, Kim MS, Park JW. Contribution of HIF-1α or HIF-2α to erythropoietin expression: in vivo evidence based on chromatin immunoprecipitation. Ann Hematol. 2008;87(1):11-7.［資料番号：4.3-7］
8) Peyssonnaux C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). J Clin Invest. 2007;117(7):1926-32.［資料番号：4.3-8］
9) Peyssonnaux C, Nizet V, Johnson RS. Role of the hypoxia inducible factors in iron metabolism. Cell Cycle. 2008;7(1):28-32.［資料番号：4.3-9］
10) Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. J Clin Invest. 2007;117(4):1068-77.［資料番号：4.3-10］
11) Adamson JW, Eschbach JW. Erythropoietin for end-stage renal disease. N Eng J Med. 1998;339(9):625-7.［資料番号：4.3-11］
12) McCullough PA, Lepor NE. The deadly triangle of anemia, renal insufficiency, and cardiovascular disease: implications for prognosis and treatment. Rev Cardiovasc Med. 2005;6(1):1-10.［資料番号：4.3-12］
13) Artunc F, Risler T. Serum erythropoietin concentrations and responses to anaemia in patients with or without chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2007;22(10):2900-8.［資料番号：4.3-13］
14) Ifudu O. Care of patients undergoing hemodialysis. N Eng J Med. 1998;339(15):1054-62.［資料番号：4.3-14］
15) Locatelli F, Del Vecchio L, Manzoni C. Morbidity and mortality on maintenance haemodialysis. Nephron. 1998;80(4):380-400.［資料番号：4.3-15］
16) Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. N Engl J Med. 2006;355(20):2085-98.［資料番号：4.3-16］
17) Pfeffer MA, Burdmann EA, Chen CY, 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):2019–32.［資料番号：4.3-17］

18) 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);791–8.［資料番号：4.3-18］
19) McCullough PA, Barnhart HX, Inrig JK, Reddan D, Sapp S, Patel UD, et al. Cardiovascular toxicity of epoetin-alfa in patients with chronic kidney disease. Am J Nephrol. 2013;37(6):549-58.［資料番号：4.3-19］
20) Powell FL, Fu Z. HIF-1 and ventilatory acclimation to chronic hypoxia. Respir Physiol Neurobiol. 2008;164(1-2):282-7.［資料番号：4.3-20］