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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1　緒言

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6　非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1　緒言 4
2.6.1.1　名称及び化学構造式 4
2.6.1.2　MT-6548 の薬理作用 4
2.6.1.3　予定する効能・効果 4
2.6.1.4　予定する用法・用量 4

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）
EPO	erythropoietin	エリスロポエチン
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
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
PHD	prolyl hydroxylase domain	プロリン水酸化酵素

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1　緒言

2.6.1.1　名称及び化学構造式

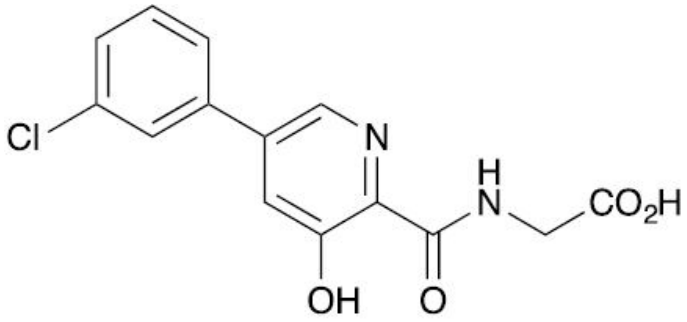
MT-6548 の名称及び化学構造式は以下の通りである.

一般名：バダデュスタット（Vadadustat）

化学名：[5-(3-Chlorophenyl)-3-hydroxypyridine-2-carboxamido]acetic acid

[5-(3-クロロフェニル)-3-ヒドロキシピリジン-2-カルボキシアミド]酢酸

構造式：



分子式：$C_{14}H_{11}ClN_2O_4$

分子量：306.70

2.6.1.2　MT-6548 の薬理作用

MT-6548 は Akebia Therapeutics 社（米国マサチューセッツ州）にて創製された，低酸素誘導因子プロリン水酸化酵素（HIF-PH）阻害薬である．MT-6548 はプロリン水酸化酵素（PHD）活性を阻害することで低酸素誘導因子（HIF）-α の安定化，それに続く HIF-α たん白発現量の増加をもたらし, 赤血球産生に必須のホルモンであるエリスロポエチン（EPO）分泌を促進する．その結果，Hb 及び赤血球産生を亢進することで，腎性貧血を改善することが期待される．

2.6.1.3　予定する効能・効果

腎性貧血

2.6.1.4　予定する用法・用量

通常，成人には，バダデュスタットとして 300 mg を開始用量とし，1 日 1 回経口投与する．以降，貧血の経過や程度により適宜増減する．なお，最高用量は 1 日 1 回 600 mg とする．

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2　薬理試験の概要文

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 4
2.6.2　薬理試験の概要文 6
2.6.2.1　まとめ 6
2.6.2.2　効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験 8
2.6.2.2.2　*In vivo* 薬理試験 12
2.6.2.3　副次的薬理試験 22
2.6.2.3.1　各種受容体等に対する選択性 22
2.6.2.3.2　ACE 及び pBZD に対する作用 23
2.6.2.3.3　ラット肺動脈圧に対する作用 23
2.6.2.4　安全性薬理試験 24
2.6.2.4.1　中枢神経系に対する作用 24
2.6.2.4.2　心血管系に対する作用 24
2.6.2.4.3　呼吸器系への影響 25
2.6.2.4.4　腎／泌尿器系への影響 26
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験 26
2.6.2.6　考察及び結論 26
2.6.2.7　図表 29
2.6.2.8　参考文献 29

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
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
C_{max}	maximum plasma concentration after administrationmaximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CI	confidence interval	信頼区間
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
EPO	Erythropoietin	エリスロポエチン
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
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
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
MC	methylcellulose	メチルセルロース
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
MPV	mean platelet volume	平均血小板容積
pBZD	peripheral benzodiazepine	末梢性ベンゾジアゼピン
PHD	prolyl hydroxylase domain	プロリン水酸化酵素
PLT	platelet	血小板
RBC	red blood cell	赤血球
RDW	red blood cell distribution width	赤血球容積粒度分布幅
Ret	reticulocyte	網状赤血球
SD	standard deviation	標準偏差
SW	Swiss Webster	－

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）
t_{max}	time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
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
WBC	white blood cell	白血球

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

MT-6548 の効力を裏付ける試験として，各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した．*In vitro* 試験では，プロリン水酸化酵素（以下，PHD）1，2 及び 3 に対する阻害作用を評価した．併せて，ヒトにおける主要な代謝物である 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．また培養細胞を用いて，MT-6548 が低酸素誘導因子（以下，HIF）-α たん白発現量，エリスロポエチン（以下，EPO）及び血管内皮増殖因子（以下，VEGF）分泌に及ぼす影響を評価した．*In vivo* 試験では，正常マウス及びラットを用いて，MT-6548 の血中 EPO 濃度増加及び赤血球造血亢進作用を評価した．副次的薬理試験として，各種受容体のリガンド結合阻害作用，酵素阻害作用，及びラットの肺動脈圧に対する作用を評価した．更に，安全性薬理試験として中枢神経系，心血管系，呼吸器系，腎／泌尿器系に及ぼす影響について評価した．薬理試験の一覧表を表 2.6.2.1-1 に示す．

表 2.6.2.1-1　MT-6548 の薬理試験一覧

試験内容	試験系	投与経路	添付資料番号
効力を裏付ける試験			
In vitro 薬理試験			
ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 阻害作用	ヒト組換え PHD1，PHD2 及び PHD3 たん白	*in vitro*	［4.2.1.1-1］
MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 阻害作用	ヒト組換え PHD2 たん白	*in vitro*	［4.2.1.1-2］
HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量増加作用 EPO 及び VEGF 分泌増加作用	Hep3B 細胞及び HUVEC	*in vitro*	［4.2.1.1-3］
In vivo 薬理試験			
正常マウスにおける血中 EPO 濃度及び網状赤血球比率増加作用	マウス/Swiss Webster	静脈内及び経口	［4.2.1.1-4］
正常マウスにおける網状赤血球比率増加作用	マウス/Swiss Webster	経口	［4.2.1.1-5］
正常マウスにおける赤血球造血亢進作用	マウス/Swiss Webster	経口	［4.2.1.1-6］
正常マウスにおける赤血球造血亢進作用	マウス/CByB6F1 ヘミ接合野生型	経口	［4.2.1.1-7］
正常ラットにおける血中 EPO 及び VEGF 濃度増加作用	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.1-8］
正常ラットにおける赤血球造血亢進作用	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.1-9］
正常ラットにおける血中 EPO，VEGF 濃度及び赤血球造血亢進作用	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.1-10］
副次的薬理試験			
各種受容体等に対する選択性	112 種類の受容体，42 種類の酵素	*in vitro*	［4.2.1.2-1］
ACE 及び pBZD に対する作用	ヒト pBZD，ウサギ大動脈	*in vitro* *ex vivo*	［4.2.1.2-2］
ラット肺動脈圧に対する作用	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.2-3］
安全性薬理試験			
中枢神経系に対する作用			
ラットにおける機能観察総合評価	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.3-1］
心血管系に対する作用			

hERG 電流への影響	hERG 導入 HEK293 細胞	*in vitro*	［4.2.1.3-2］
覚醒下ラットにおける血圧，心拍数及び体温への影響	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.3-3］
覚醒下イヌにおける血圧，心拍数，体温，活動量及び心電図への影響	イヌ/Beagle	経口	［4.2.1.3-4］
呼吸器系への影響			
覚醒下ラットにおける一回換気量，分時換気量及び呼吸数への影響	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.3-5］
腎／泌尿器系への影響			
ラットの腎機能への影響	ラット/Sprague Dawley	経口	［4.2.1.3-6］

MT-6548 は各ヒト組換え PHD 活性を濃度依存的に阻害し，ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 に対する 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．

ヒト血漿中の主要代謝物である 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 であり，MT-6548 と比較して 1/200 程度の阻害活性であった．

MT-6548 は，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）において，10～30 μmol/L の濃度範囲で HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量を増加させた．MT-6548 は 3～100 μmol/L の濃度範囲で EPO 分泌を有意に亢進させる一方で，VEGF に対して 3～30 μmol/L の濃度範囲では明確な作用を認めなかった．

正常マウスにおいて，MT-6548 の単回静脈内投与及び 4 日間反復経口投与は血中 EPO 濃度を上昇させ，網状赤血球比率を増加させた．また 1 日投与量を一定にして，1 日 1 回，1 日 2 回及び 1 日 3 回と分割投与した際に，網状赤血球比率増加幅に明確な差は認められなかった．MT-6548 の 7 日間反復経口投与は，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）を増加させ，脾臓重量の増加及び髄外造血の亢進をもたらした．MT-6548 の 28 日間反復経口投与は，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）をそれぞれ増加させた．

正常ラットにおいて，MT-6548 の単回経口投与は，投与前と比較して投与 3～24 時間後の血中 EPO 濃度上昇をもたらす一方で，血中 VEGF 濃度には影響を及ぼさなかった．MT-6548 の 8 日間反復経口投与は，投与前と比較して赤血球数，Hb 値，Hct 値，RDW 及び網状赤血球比率を増加させ，病理組織学的検査では赤血球造血亢進作用に付随して認められる肝臓における髄外造血の亢進が観察された．MT-6548 の 14 日間反復経口投与は，投与 1，7 及び 14 日後に血中 EPO 濃度を上昇させ，投与 14 日又は 15 日後に網状赤血球数，赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH 及び RDW を有意に増加させた．

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．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．また，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．その他の受容体等に対しては，10 μmol/L の濃度で 50%以上

又は −50%以下の阻害作用を示さなかった．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）による一般状態及び行動観察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が，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．

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，9.5～284.4 μmol/L の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．

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.1.1　MT-6548 のヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 阻害作用

［資料番号：4.2.1.1-1，試験番号：AKB-6548-NC-[redacted]］

ヒト組換え PHD のアイソフォーム PHD1，PHD2 及び PHD3 に対する MT-6548 の阻害作用を評価した．

PHD は低酸素誘導因子-1α（以下，HIF-1α）上の 2 つのプロリン残基（P402 及び P564）を水酸化する．HIF-1α は水酸化されることによって Von-Hippel-Lindau（以下，VHL）に結合する．時間分解蛍光-蛍光共鳴エネルギー転移（TR-FRET）法を用いて水酸化 HIF-1α と VHL の結合量を指標として，MT-6548 の PHD 阻害作用を評価した．

MT-6548 は各ヒト組換え PHD 活性を濃度依存的に阻害した．ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 に対する 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（表 2.6.2.2-1）．

MT-6548 はいずれの PHD アイソフォームに対しても，同程度の阻害能を有していた．また，本試験で得られた MT-6548 の PHD2 に対する IC_{50} 値は類似の方法で実施された既報 [1] と同程度であった．

表 2.6.2.2-1　MT-6548 のヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 阻害作用

アイソフォーム	IC_{50}（nmol/L）の幾何平均値 a)	95%CI
PHD1	15.36	11.96 ~ 19.73
PHD2	11.83	8.20 ~ 17.07
PHD3	7.63	7.21 ~ 8.07

試験番号：AKB-6548-NC-[redacted]，Table 4 より一部改変して作成

a)　IC_{50} 値は非線形回帰により算出（n＝3）

2.6.2.2.1.2　ヒトにおける主な代謝物 MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 阻害作用

［資料番号：4.2.1.1-2，試験番号：AKB-6548-NC-[redacted]］

ヒト血漿中の主要代謝物である MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 阻害作用を 2.6.2.2.1.1 と同様に評価した．

MT-6548 O-グルクロン酸抱合体はヒト組換え PHD2 活性を濃度依存的に阻害し，その IC_{50} 値は 2.31 μmol/L であった（表 2.6.2.2-2）．

MT-6548 O-グルクロン酸抱合体の PHD2 阻害に対する IC_{50} 値は MT-6548 に比べおよそ 195 倍であった．

表 2.6.2.2-2　MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 阻害作用

	IC_{50}（μmol/L）の幾何平均値 a)	95%CI
PHD2	2.31	1.74 ~ 3.08

試験番号：AKB-6548-NC-[redacted]，Table 1 より一部改変して作成

a)　IC_{50} 値は非線形回帰により算出（n＝3）

2.6.2.2.1.3　Hep3B 細胞及び HUVEC における MT-6548 の HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現に対する作用

［資料番号：4.2.1.1-3，試験番号：[redacted]04989］

正常酸素濃度下では，細胞内 PHD 活性により HIF-1α 及び HIF-2α 上のプロリン残基は高度に水酸化される．その結果，HIF-1α 及び HIF-2α は 26S プロテアソーム依存的に速やかに分解される．すなわち PHD 活性を阻害することで，HIF-1α 及び HIF-2α たん白は分解を免れて安定化し，結果としてたん白発現量の増加が認められる．

本試験では，ヒト肝臓由来細胞株である Hep3B 細胞及び HUVEC を用いて，MT-6548 によ

る HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量に及ぼす影響を評価した.

Hep3B 細胞及び HUVEC に MT-6548 を 3, 10 及び 30 μmol/L で 6 時間, 又は 10 及び 30 μmol/L で 24 時間，それぞれ処理し，MT-6548 による内在性 PHD 活性阻害の結果生じる HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量をウエスタンブロットにて評価した. HIF-1α 及び HIF-2α たん白のシグナル強度を glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）又は actin たん白のシグナル強度で補正して平準化し，溶媒対照を 1.0 とした相対シグナル強度比を算出した（表 2.6.2.2-3 及び表 2.6.2.2-4）.

いずれの細胞においても，MT-6548 処置群では対照群に比較して HIF-1α たん白のシグナル強度が高値を示し, 発現量が増加した. MT-6548 による HIF-1α たん白のシグナル強度増加は，処理 6 時間では 3，10 及び 30 μmol/L の濃度において，それぞれ 4.7，10.2 及び 18.9 倍（Hep3B 細胞），1.3，178.3 及び 1706.9 倍（HUVEC）であり，処理 24 時間では 10 及び 30 μmol/L の濃度において，それぞれ 3.1 及び 3.0 倍（Hep3B 細胞），4.2 及び 16.5 倍（HUVEC）であった.

HIF-2α たん白のシグナル強度増加は細胞種間で反応性に差が見られた．Hep3B 細胞においては MT-6548 による反応性が乏しく，HIF-2α たん白のシグナル強度増加は 1.0～1.4 倍であった．一方で，HUVEC において MT-6548 によるたん白発現量の増加が認められ，シグナル強度増加は，処理 6 時間では 3，10 及び 30 μmol/L の濃度において，それぞれ 2.0，1.7 及び 8.6 倍であり，処理 24 時間では 10 及び 30 μmol/L の濃度において，それぞれ 82.6 及び 27.6 倍であった（表 2.6.2.2-3 及び表 2.6.2.2-4）.

表 2.6.2.2-3　Hep3B 細胞における HIF-1α 及び HIF-2α たん白のシグナル強度比

	処置時間 (hour)	MT-6548 (μmol/L)		
		3	10	30
HIF-1α	6	4.7	10.2	18.9
	24	NT	3.1	3.0
HIF-2α	6	1.3	1.4	1.4
	24	NT	1.0	1.2

試験番号：[redacted]04989，4 Raw data を基に作成した
NT：Not tested，それぞれの溶媒対照を 1.0 とした相対シグナル強度比を表に示した（n＝1 又は 2）

表 2.6.2.2-4　HUVEC における HIF-1α 及び HIF-2α たん白のシグナル強度比

	処置時間 (hour)	MT-6548 (μmol/L)		
		3	10	30
HIF-1α	6	1.3	178.3	1706.9
	24	NT	4.2	16.5
HIF-2α	6	2.0	1.7	8.6
	24	NT	82.6	27.6

試験番号：[redacted]04989，4 Raw data を基に作成した
NT：Not tested，それぞれの溶媒対照を 1.0 とした相対シグナル強度比を表に示した（n＝1 又は 2）

2.6.2.2.1.4　Hep3B 細胞における EPO 及び VEGF 分泌に及ぼす MT-6548 の作用

［資料番号：4.2.1.1-3，試験番号：[redacted]04989］

MT-6548 のヒト肝臓由来細胞株における EPO 分泌亢進作用及び VEGF 分泌亢進作用を評価した．

Hep3B 細胞に MT-6548 を 0.1～100 µmol/L（EPO），又は 3～30 µmol/L（VEGF）の濃度範囲で 24 時間処理し，培養上清中の EPO 及び VEGF 濃度を ELISA にて測定した．

EPO 分泌について，MT-6548 は 10～100 µmol/L の濃度範囲で有意に亢進させた（図 2.6.2.2－1）．

VEGF 分泌について，陽性対照である低酸素（1% O_2）処理群では有意に増加した一方で，MT-6548 で 3～30 µmol/L の濃度範囲で有意な作用を認めなかった（図 2.6.2.2－2）．

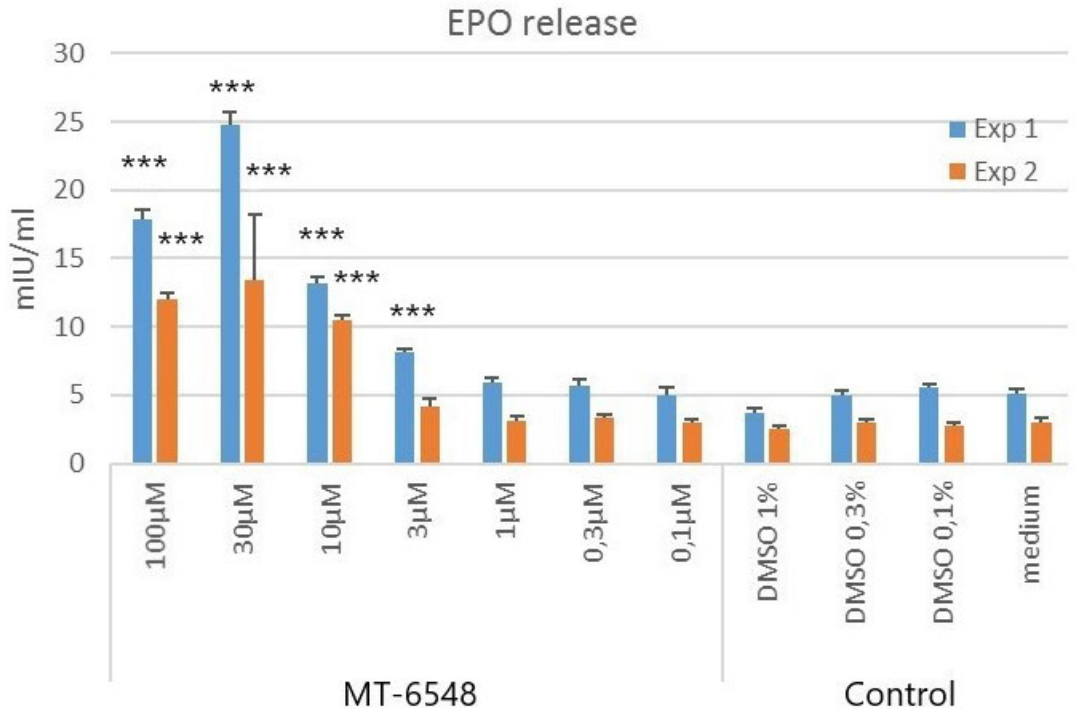


図 2.6.2.2－1　Hep3B 細胞における MT-6548 の EPO 分泌亢進作用

試験番号：[redacted]04989，Figure 13 を一部改変
N=2 又は 3，平均値±SD，µM=µmol/L
対照群として DMSO 濃度を 3 濃度（0.1，0.3 及び 1%）実施し，それぞれ MT-6548 0.1~10，30 及び 100 µmol/L に対応する．
*** p<0.001（対応する DMSO 濃度との比較，Tukey's multiple comparison test）
Exp1 と Exp2 はそれぞれ独立した実験結果

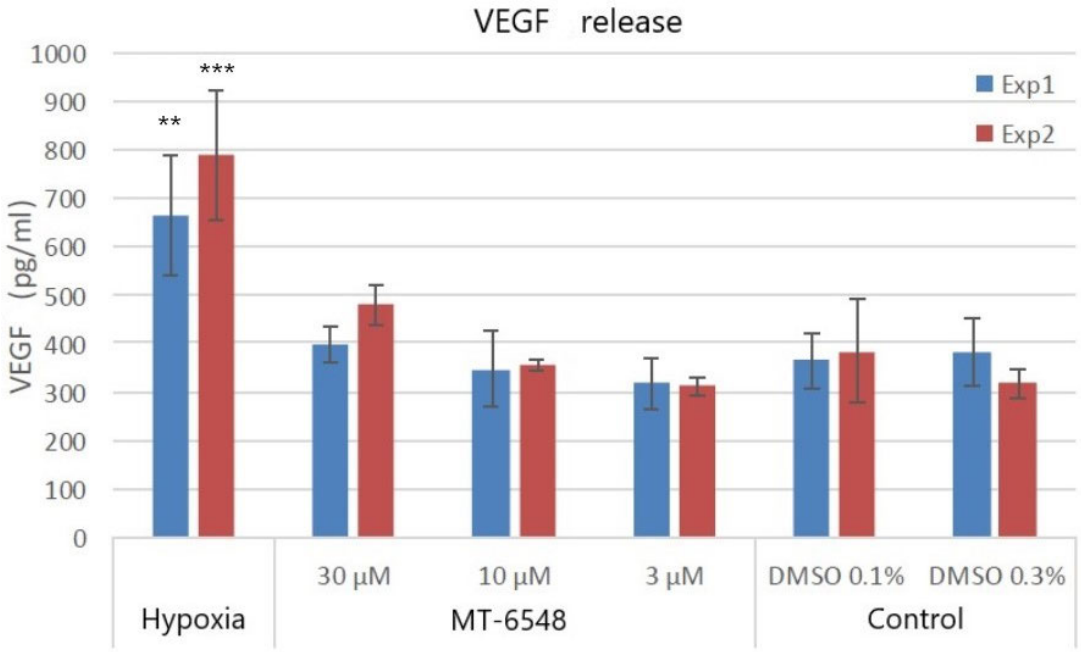


図 2.6.2.2－2　Hep3B 細胞における MT-6548 の VEGF 分泌亢進作用

試験番号：[redacted]04989，Figure 14 を一部改変
N=3 又は 4，平均値±SD，μM=μmol/L
対照群として DMSO 濃度を 2 濃度（0.1 及び 0.3%）実施し，それぞれ MT-6548 3~10 及び 30 μmol/L に対応する．
*** p<0.001，** p<0.01（対応する DMSO 濃度との比較，Tukey's multiple comparison test）
Exp1 と Exp2 はそれぞれ独立した実験結果

2.6.2.2.2　*In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1　正常マウスに対する作用

2.6.2.2.2.1.1　正常マウスにおける単回静脈内投与及び 4 日間反復経口投与による血中 EPO 濃度及び網状赤血球比率増加作用

［資料番号：4.2.1.1-4，試験番号：[redacted]-0302］

正常マウスにおける MT-6548 単回静脈内投与及び 4 日間反復経口投与時の血中 EPO 及び網状赤血球比率に及ぼす影響を評価した．

7～9 週齢の雄性 Swiss Webster（以下，SW）マウスに MT-6548 を単回静脈内投与（60 mg/kg）及び 4 日間反復経口投与（1 日 3 回投与，30，90 及び 270 mg/kg/日）した．静脈内投与群では投与 4 及び 8 時間後に血中 EPO 濃度を測定し，経口投与群では最終投与 2，8 及び 24 時間後に血中 EPO 濃度及び網状赤血球比率を測定した．

静脈内投与では 4 時間後の血中 EPO 濃度の平均値±SD が 1936±1691 pg/mL と最も高く，対照群と比較して約 7 倍上昇した（対照群の平均値±SD：269±127 pg/mL）．

4 日間反復経口投与では，270 mg/kg/日投与群の最終投与 2 時間後の血中 EPO 濃度の平均値±SD は 1461±968 pg/mL で最も高かった（対照群：<94 pg/mL）．270 mg/kg/日投与群の網状赤血球比率は最終投与 8 時間後をピークとして，いずれの時点でも対照群より高値を示した（表

2.6.2.2-5)．30 及び 90 mg/kg/日投与群ではいずれのパラメータに対しても明確な作用は認められなかった．

表 2.6.2.2-5　正常マウスにおける MT-6548 4 日間反復経口投与による網状赤血球比率

採材時間 a) (hour)	対照群	MT-6548 投与群 (mg/kg/日)		
		30	90	270
2	1.13±0.57	1.82±0.66	1.86±0.31	3.45±1.34
8	1.30±0.26	1.15±0.49	1.80±0.12	5.55±0.49
24	1.85±0.21	2.38±0.75	1.72±0.37	4.67±0.81

試験番号：[redacted]-0302，Table 3~5 を基に作成した
N=2~6，平均値±SD
a)　最終投与後の採材時間

2.6.2.2.2.1.2　正常マウスにおける単日及び 4 日間反復経口投与による網状赤血球比率増加作用

［資料番号：4.2.1.1-5，試験番号：[redacted]-0446］

正常マウスに MT-6548 270 mg/kg/日を 1 日 1 回，1 日 2 回及び 1 日 3 回に分割し，単日及び 4 日間反復経口投与し，初回投与から 5 日後の網状赤血球比率及び脾臓重量比（体重にて補正）に及ぼす影響を比較評価した．合わせて，1000 mg/kg/日を 1 日 1 回単日投与し，同様に評価した．

12～14 週齢の雄性 SW マウスへの MT-6548 270 mg/kg/日の単日投与により，単日投与の対照群（1 日 1 回）と比較して，網状赤血球比率は各々100.0%（1 日 1 回），47.6%（1 日 2 回）及び 111.9%（1 日 3 回），脾臓重量比は各々22.9%（1 日 1 回），46.8%（1 日 2 回）及び 76.5%（1 日 3 回）増加した．4 日間反復経口投与により，網状赤血球比率は各々276.2%（1 日 1 回），185.7%（1 日 2 回）及び 197.6%（1 日 3 回），脾臓重量比は各々82.5%（1 日 1 回），114.8%（1 日 2 回）及び 84.5%（1 日 3 回）増加した．

網状赤血球比率増加幅及び脾臓重量増加幅は，いずれの分割投与回数でも単日投与群と比較して，4 日間反復投与群で大きかった．また 1 日 1 回，1 日 2 回及び 1 日 3 回投与で明確な差は認められなかった（表 2.6.2.2-6 及び表 2.6.2.2-7）．

1000 mg/kg/日を 1 日 1 回単日投与により，網状赤血球比率は単日投与の対照群（1 日 1 回）と比較して 126.2%増加し（MT-6548 投与群：3.2±0.8%），脾臓重量比は 29.4%増加した（MT-6548 投与群：0.00283±0.00050%）．

表 2.6.2.2-6　正常マウスにおける MT-6548 単日及び 4 日間反復経口投与による網状赤血球比率

投与日数	対照群（1 日 1 回）	MT-6548 投与群（270 mg/kg/日）		
		1 日 1 回	1 日 2 回	1 日 3 回
1	1.4	2.8±0.8（100.0%）a)	2.1±0.3（47.6%）	3.0±1.7（111.9%）
4	NT	5.3±1.1（276.2%）	4.0±1.1（185.7%）	4.2±0.4（197.6%）

試験番号：[redacted]-0446，Table 2 より作成
N=1~3，平均値±SD
NT：Not tested
a)　下段括弧内は単日投与の対照群（1 日 1 回）と比較した際の変化率（% change）

表 2.6.2.2-7　正常マウスにおける MT-6548 単日及び 4 日間反復経口投与による脾臓重量比

投与日数	対照群（1 日 1 回）	MT-6548 投与群（270 mg/kg/日）		
		1 日 1 回	1 日 2 回	1 日 3 回
1	0.00219±0.00007	0.00269±0.00011（22.9%）a)	0.00321±0.00042（46.8%）	0.00386±0.00235（76.5%）
4	NT	0.00399±0.00111（82.5%）	0.00470±0.00065（114.8%）	0.00404±0.00126（84.5%）

試験番号：[redacted]-0446，Table 3 より作成
N=2~3，平均値±SD
NT：Not tested
a)　下段括弧内は単日投与の対照群（1 日 1 回）と比較した際の変化率（% change）

2.6.2.2.2.1.3　正常マウスにおける 7 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用

［資料番号：4.2.1.1-6，試験番号：[redacted]-0102］

正常マウスにおける MT-6548 7 日間反復経口投与時の赤血球造血亢進作用を評価した．

6～8 週齢の雄性 SW マウスに MT-6548 を 7 日間反復経口投与（1 日 1 回投与，200 mg/kg/日）し，最終投与 24 時間後に血液学的パラメータ及び器官重量を測定し，病理組織学的検査を実施した．

MT-6548 投与により，対照群と比較して Hb 値，Hct 値，MCV 及び MCH が有意に増加した（Wilcoxon 検定）（表 2.6.2.2-8）．加えて，病理組織学的検査により赤血球造血亢進作用に付随して認められる脾臓における髄外造血の亢進及び脾臓重量の増加が認められた．

表 2.6.2.2-8　正常マウスにおける MT-6548 7 日間反復経口投与による血液学的パラメータ

	Group	Mean	SD	%Change vs Control
WBC	Vehicle	9.48	1.85	-
(10^3/μL)	MT-6548	10.62	1.27	12.0
RBC	Vehicle	10.70	0.74	-
(10^6/μL)	MT-6548	11.21	0.45	4.7
Hb	Vehicle	15.38	0.95	-
(g/dL)	MT-6548	17.55	0.93	14.1 [a]
Hct	Vehicle	53.06	3.78	-
(%)	MT-6548	59.85	2.71	12.8 [a]
MCV	Vehicle	49.50	1.0	-
(fL)	MT-6548	53.50	1.4	8.1 [a]
MCH	Vehicle	14.39	0.34	-
(pg)	MT-6548	15.61	0.48	8.5 [a]
MCHC	Vehicle	29.02	0.48	-
(g/dL)	MT-6548	29.40	0.52	1.3
PLT	Vehicle	1350.60	214.25	-
(10^3/μL)	MT-6548	1401.30	174.99	3.8
Ret	Vehicle	7.97	2.78	-
(%)	MT-6548	9.79	2.25	22.8

試験番号：[redacted]-0102，Table3 より作成
N=10，a：p<0.05（Wilcoxon test）

2.6.2.2.2.1.4　正常マウスにおける 28 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用

［資料番号：4.2.1.1-7，試験番号：20065328］

本試験は，トランスジェニック（CByB6F1 ヘミ接合 rasH2 Tg）マウスを用いた 6 ヵ月間のがん原性試験［2.6.6.5.2.3］の用量設定を目的として，その野生型（以下，CByB6F1 ヘミ接合野生型）マウスを用いて実施した．

8 週齢の雌雄 CByB6F1 ヘミ接合野生型マウスに，MT-6548 を 28 日間反復経口投与（1 日 1 回投与，25 及び 100 mg/kg/日）し，血液学的パラメータを測定した．

MT-6548 の 100 mg/kg/日投与により，雌雄いずれにおいても対照群と比較して赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH 及び RDW が有意に増加した（表 2.6.2.2-9（雄性データ）及び表 2.6.2.2-10（雌性データ））．25 mg/kg/日投与では，血液学的パラメータに対する明確な影響は認められなかった．

表 2.6.2.2-9　正常雄性マウスにおける 28 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用

Group / Sex		RBC 10^6/μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL(μm³)	MCH pg	MCHC g/dL	RDW %
1M	Mean	9.24	14.2	43.5	47.1	15.4	32.7	12.8
	SD	0.53	0.6	2.5	0.5	0.5	1.0	0.2
	N	4	4	4	4	4	4	4
2M	Mean	9.62	14.6	45.3	47.1	15.2	32.3	12.7
	SD	0.34	0.4	1.3	0.8	0.2	0.4	0.2
	N	4	4	4	4	4	4	4
	%Diff G1	4.17	2.8	4.1	0.0	-1.1	-1.2	-0.6
3M	Mean	12.87c	21.4c	67.4c	52.4c	16.7c	31.8	16.9c
	SD	0.67	0.8	2.8	0.8	0.3	0.1	0.2
	N	4	4	4	4	4	4	4
	%Diff G1	39.35	50.4	54.8	11.1	8.3	-2.6	32.1

試験番号：20065328，Table 4 を一部改変
N=4，c：p<0.001（Dunnett's multiple comparison test）
1M：対照群 雄性マウス，2M：MT-6548 25 mg/kg/日投与 雄性マウス
3M：MT-6548 100 mg/kg/日投与 雄性マウス
%Diff G1：対照群と比較した際の変化率を%で示す

表 2.6.2.2-10　正常雌性マウスにおける 28 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用

Group / Sex		RBC 10^6/μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL(μm³)	MCH pg	MCHC g/dL	RDW %
1F	Mean	9.32	14.4	44.5	47.8	15.4	32.3	13.7
	SD	0.20	0.4	0.6	0.4	0.2	0.5	0.1
	N	4	4	4	4	4	4	4
2F	Mean	9.11	14.5	44.3	48.7	15.9d	32.7	13.8
	SD	0.20	0.2	0.4	0.8	0.3	0.2	0.6
	N	4	4	4	4	4	4	4
	%Diff G1	-2.25	1.0	-0.4	1.9	3.4	1.3	1.1
3F	Mean	11.83f	20.8f	64.4f	54.5f	17.5f	32.2	17.3a
	SD	0.34	0.4	1.2	0.9	0.3	0.3	0.6
	N	4	4	4	4	4	4	4
	%Diff G1	26.88	44.6	44.8	14.2	13.8	-0.2	26.3

試験番号：20065328，Table 4 を一部改変
N=4，a：p<0.05（Dunn's test），d：p<0.05，f：p<0.001（Dunnett's multiple comparison test）
1F：対照群 雌性マウス，2F：MT-6548 25 mg/kg/日投与 雌性マウス
3F：MT-6548 100 mg/kg/日投与 雌性マウス
%Diff G1：対照群と比較した際の変化率を%で示す

2.6.2.2.2.2　正常ラットに対する作用

2.6.2.2.2.2.1　正常ラットにおける MT-6548 単回経口投与による血中 EPO 及び VEGF 濃度増加作用

［資料番号：4.2.1.1-8，試験番号：6901490］

正常ラットにおける MT-6548 単回経口投与時の血中 EPO 及び VEGF 濃度に及ぼす影響を評価した．

7 週齢の雄性 Sprague Dawley ラットに MT-6548 を単回経口投与（1 日 1 回投与，50 及び 150 mg/kg/日）した．投与前，投与 1，3，6，24，及び 72 時間後に，血中 EPO 及び VEGF 濃度を ELISA にて測定した．

MT-6548 はいずれの投与量においても，投与 6 時間後をピークとして投与 3～24 時間後の血中 EPO 濃度を上昇させ，その上昇は投与 72 時間後では消失した（図 2.6.2.2－3）．一方で，MT-6548 による血中 VEGF 濃度変化は検出されなかった．

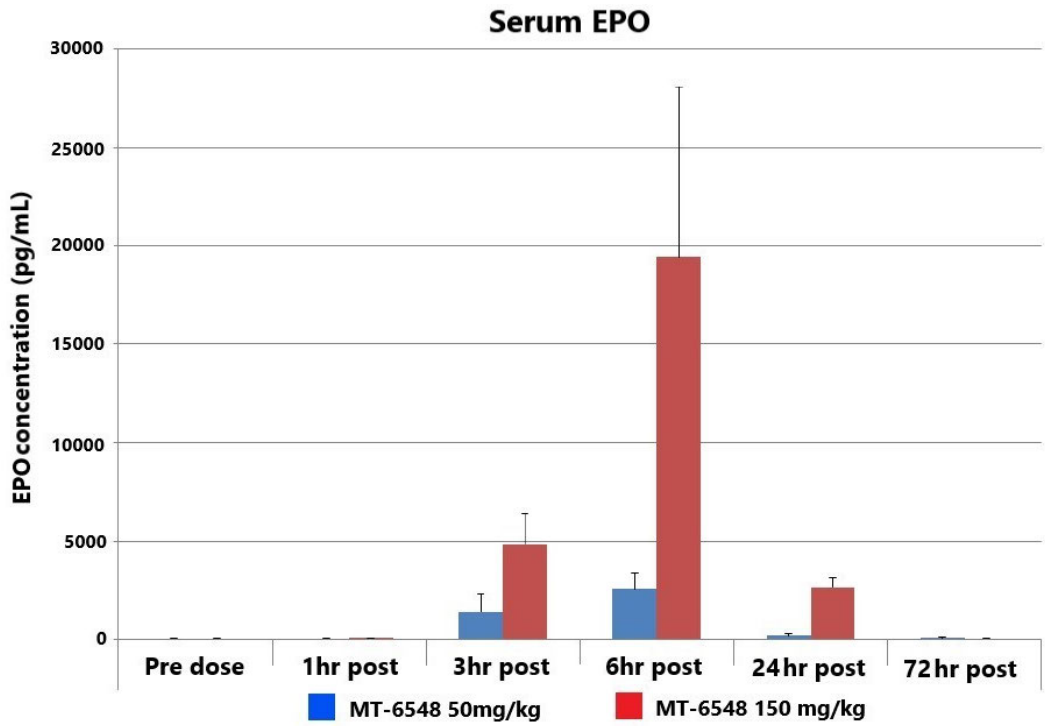


図 2.6.2.2－3　正常ラットにおける MT-6548 単回投与による血中 EPO 濃度

試験番号：6901490，Appendix 9 を一部改変
n＝3，平均値±SD

2.6.2.2.2.2.2　正常ラットにおける MT-6548 8 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用

［資料番号：4.2.1.1-9，試験番号：[redacted]-0146］

正常ラットにおける MT-6548 8 日間反復経口投与時の赤血球造血亢進作用を評価した．

7～9 週齢の雄性 Sprague Dawley ラットに MT-6548 を 8 日間反復経口投与（1 日 1 回投与，150 mg/kg/日）し，投与前，投与 4 日後及び投与 8 日後の血液学的パラメータを測定した．加えて，最終投与 8 時間後に病理組織学的検査を実施した．

投与前と比較して投与 8 日後では，MT-6548 投与により，赤血球数（投与前値の平均値と比較した際の変化率：31.6%），Hb 値（32.8%），Hct 値（43.6%），RDW（31.2%）及び網状赤血球比率（42.1%）が増加した（表 2.6.2.2-11）．加えて，病理組織学的検査により赤血球造血亢進作用に付随して認められる肝臓における髄外造血の亢進が認められた．

表 2.6.2.2-11　正常ラットにおける MT-6548 8 日間反復経口投与による血液学的パラメータ

	Sampling[a)]	Mean	SD	%Diff D1
WBC (10^3/μL)	Day1	15.4	2.9	-
	Day4	21.3	2.9	38.3
	Day8	14.9	2.4	-3.2
RBC (10^6/μL)	Day1	6.24	0.29	-
	Day4	6.83	0.28	9.5
	Day8	8.21	0.16	31.6
Hb (g/dL)	Day1	13.7	0.7	-
	Day4	14.5	1.3	5.8
	Day8	18.2	0.5	32.8
Hct (%)	Day1	38.1	2.4	-
	Day4	44.1	2.1	15.7
	Day8	54.7	1.2	43.6
MCV (fL)	Day1	60.8	1.8	-
	Day4	64.5	1.0	6.1
	Day8	66.5	1.2	9.4
MCH (pg)	Day1	22.0	0.7	-
	Day4	21.2	1.6	-3.6
	Day8	22.2	0.4	0.9
MCHC (g/dL)	Day1	36.0	0.6	-
	Day4	32.8	2.0	-8.9
	Day8	33.3	0.6	-7.5
RDW (%)	Day1	14.85	0.65	-
	Day4	15.03	0.92	1.2
	Day8	19.48	1.71	31.2
MPV (fL)	Day1	5.7	0.1	-
	Day4	5.4	0.1	-5.3
	Day8	5.5	0.2	-3.5
Ret (%)	Day1	12.6	2.6	-
	Day4	16.8	1.4	33.3
	Day8	17.9	2.7	42.1

試験番号：[redacted]-0146，Appendix 2 Table 1 より作成

a)　いずれも当日の投与前に採血を行い，血液学的パラメータを測定した
n＝6，%Diff D1：Day1（投与前値）の平均値と比較した際の変化率を%で示す

2.6.2.2.2.2.3　正常ラットにおける MT-6548 14 日間反復経口投与による血中 EPO，VEGF 濃度及び赤血球造血亢進作用

［資料番号：4.2.1.1-10，試験番号：6901491］

正常ラットにおける MT-6548 14 日間反復経口投与時の血中 EPO，VEGF 濃度及び赤血球造血亢進作用に及ぼす影響を評価した．

7 週齢の雄性 Sprague Dawley ラットに MT-6548 を 14 日間反復経口投与（1 日 1 回投与，30 及び 90 mg/kg/日）した．血中 EPO 及び VEGF 濃度は，投与 1 日目及び 14 日目の投与後 3，6，12 及び 24 時間後と投与 7 日目の投与 6 及び 12 時間後に ELISA にて測定した．血液学的パラメータは投与 7 又は 8 日目及び投与 14 又は 15 日目に測定した．

MT-6548 はいずれの投与量においても，血中 EPO 濃度を上昇させた．30 mg/kg/日投与群では，投与 1 日目の投与 6 時間後で最も血中 EPO 濃度が高く，対照群よりも約 5 倍程度高値であった．90 mg/kg/日投与群では，投与 1 日目の投与 12 時間後で最も血中 EPO 濃度が高く，対照群よりも約 146 倍程度高値であった．いずれの用量においても，血中 EPO 濃度は MT-6548 投与 1 日目に高く，投与 7 日目及び 14 日目に低下する傾向が認められた（表 2.6.2.2-12）．一方，いずれの投与量においても，MT-6548 による血中 VEGF 濃度変化は検出されなかった．

90 mg/kg/日投与群ではいずれも対照群と比較して，投与 14 又は 15 日目に赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH，RDW 及び網状赤血球数が有意に増加した．同様の変化は，投与 7 又は 8 日目にも認められた．30 mg/kg/日投与群では投与 14 又は 15 日目に Hb 値のみ有意に増加した（表 2.6.2.2-13）．

表 2.6.2.2-12　正常ラットにおける MT-6548 14 日間反復経口投与による血中 EPO 濃度

Day	Post Dose (hour)	Dose (mg/kg)	Mean (pg/mL)	SD (pg/mL)	%Diff Control [a)]
1	3	0	56.483	11.428	-
		30	140.013	11.217	148
		90	2447.267	738.634	4233
	6	0	50.430	8.380	-
		30	265.307	36.952	426
		90	9265.003	2086.041	18272
	12	0	65.963	9.635	-
		30	119.977	22.368	82
		90	9633.127	5119.270	14504
	24	0	91.270	27.469	-
		30	54.330	12.511	-40
		90	1520.093	319.638	1565
7	6	0	43.353	4.083	-
		30	85.050	20.248	96
		90	4590.983	3487.940	10490
	12	0	28.827	2.802	-
		30	56.850	20.331	97
		90	266.177	86.797	823
14	3	0	34.810	5.593	-
		30	144.163	109.775	314
		90	1375.163	955.837	3850
	6	0	40.197	4.637	-
		30	145.410	48.932	262
		90	1671.973	906.702	4059
	12	0	24.510	5.691	-
		30	37.590	4.186	53
		90	225.007	67.348	818
	24	0	48.107	16.948	-
		30	15.033	8.718	-69
		90	36.270	12.296	-25

試験番号：6901491，Table 5 より作成

N=3

a)　対照群と比較した際の変化率を%で示す

表 2.6.2.2-13　正常ラットにおける MT-6548 14 日間反復経口投与による血液学的パラメータ

	Dose（mg/kg）	Mean	SD	%Diff Control [a)]
RBC (10^6/μL)	0	7.453	0.233	-
	30	7.718	0.497	3.563
	90	8.793 [c)]	0.638	17.984
Hb (g/dL)	0	14.87	0.66	-
	30	15.75 [b)]	0.70	5.94
	90	19.85 [c)]	1.09	33.55
Hct (%)	0	43.58	1.37	-
	30	45.63	2.04	4.70
	90	59.18 [e)]	3.92	35.79
MCV (fL)	0	58.48	0.96	-
	30	59.21	1.67	1.26
	90	67.42 [e)]	3.52	15.29
MCH (pg)	0	19.95	0.49	-
	30	20.44	0.72	2.46
	90	22.65 [e)]	0.99	13.56
MCHC (g/dL)	0	34.11	0.72	-
	30	34.51	0.54	1.18
	90	33.60	0.77	-1.49
RDW (%)	0	14.10	0.88	-
	30	14.30	0.51	1.42
	90	19.21 [c)]	1.43	36.23
PLT (10^3/μL)	0	1170.4	147.7	-
	30	1049.8	126.3	-10.3
	90	846.3 [c)]	117.6	-27.7
Ret (10^9/μL)	0	313.61	36.78	-
	30	308.40	84.37	-1.66
	90	706.17 [d)]	117.66	125.18

試験番号：6901491，Table 3 より作成
血液学的パラメータは投与 14 又は 15 日目に測定した
N=10~12
a) 対照群と比較した際の変化率を%で示す
b) $p<0.05$，c) $p<0.001$（Dunnett's multiple comparison test）
d) $p<0.01$，e) $p<0.001$（Dunn's multiple comparison test）

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　各種受容体等に対する選択性

［資料番号：4.2.1.2-1，概要表：2.6.3.3，試験番号：14651］

各種受容体等に対する MT-6548 の選択性を評価した．

112 種類の受容体，42 種類の酵素に対する MT-6548（10 μmol/L）のリガンド結合阻害作用及び酵素阻害作用を *in vitro* アッセイにて検討した（n=2）．

MT-6548 は，pBZD に対するリガンドの結合を 10 μmol/L の濃度で 70%阻害した．また，ACE 及び CAMK2α に対してそれぞれ 60%及び −89%の阻害作用を示した．なお，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．

その他の受容体等に対しては，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．

2.6.2.3.2　ACE 及び pBZD に対する作用

［資料番号：4.2.1.2-2，概要表：2.6.3.3，試験番号：100043777］

各種受容体等に対する MT-6548 の選択性評価の結果に基づき，ACE 及び pBZD に対する作用の濃度依存性を検討した．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］），FOB による一般状態及び行動観察及び毒性試験で行動所見が認められなかったことから評価を実施しなかった．

MT-6548（0.3，1，3，10，30，100 及び 300 µmol/L）の pBZD に対するリガンド結合阻害作用を *in vitro* アッセイにて，ACE に対する酵素活性阻害作用を摘出したウサギの大動脈を用いた *ex vivo* アッセイにてそれぞれ検討した（n=2）．

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．

2.6.2.3.3　ラット肺動脈圧に対する作用

［資料番号：4.2.1.2-3，概要表：2.6.3.3，試験番号：021-1802］

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 29 日間反復投与し，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．

テレメトリー送信機を埋め込んだ雄 6 例の Sprague Dawley ラットに，0［0.25% ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC） - 0.1% Tween® 80 水溶液（以下，0.25% HPMC - 0.1% Tween 80）］，30 及び 90 mg/kg/日の MT-6548 を 29 日間経口投与し，無麻酔無拘束下における肺動脈圧（収縮期，拡張期，平均），及び心拍数を投与前及び投与 1，15 並びに 27 日目に投与 24 時間後まで測定した．投与 29 日目の投与直前に採血し，血液学的検査を実施した．更に，最終投与日の翌日に心臓を摘出し，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）を算出した．

MT-6548 の 30 mg/kg/日は肺動脈圧及び心拍数に影響を及ぼさなかった．90 mg/kg/日では，対照群と比較して，投与 15 日目に収縮期及び平均肺動脈圧の有意な増加（対照群に対して最大でそれぞれ 63%及び 53%の増加）が，投与 27 日目に収縮期，拡張期及び平均肺動脈圧の有意な増加（対照群に対して最大でそれぞれ 82%，167%及び 79%の増加）がそれぞれ認められた．また，投与 1，15，及び 27 日目に心拍数の有意な増加（対照群に対して最大でそれぞれ 11%，9.3%及び 14%の増加）が認められた．いずれの投与量においても Fulton index には影響は認められなかった．血液学的検査では薬理作用に基づく赤血球系パラメータの増加が 30 及び 90 mg/kg/日で確認された．

2.6.2.4　安全性薬理試験

MT-6548 の中枢神経系，心血管系，呼吸器系及び腎／泌尿器系に及ぼす有害な薬理作用を動物及び細胞を用いて検討した．いずれの試験も医薬品規制調和国際会議（以下，ICH）S7A 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．

2.6.2.4.1　中枢神経系に対する作用

2.6.2.4.1.1　ラットにおける機能観察総合評価（Functional Observational Battery; FOB）

［資料番号：4.2.1.3-1，概要表：2.6.3.4，試験番号：1008-2361］

雄 10 例の Sprague Dawley ラットに，0［1% メチルセルロース水溶液（以下 1% MC）］，120，180 及び 360 mg/kg の MT-6548 を単回経口投与し，投与前及び投与 2，8，24 時間後に FOB による一般症状及び行動を観察した．

その結果，MT-6548 はいずれの投薬群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を及ぼさなかった．一方，すべての投薬群で投与 8 時間後にのみ排便量を減少させた（対照群に対してそれぞれ 45%，59%及び 68%）．

2.6.2.4.2　心血管系に対する作用

2.6.2.4.2.1　hERG 電流への影響

［資料番号：4.2.1.3-2，概要表：2.6.3.4，試験番号：701205-2］

hERG 導入ヒト胎児腎由来細胞 293（以下，HEK293 細胞）を 9.5，28.4，94.8 及び 284.4 μmol/L の MT-6548 で，低濃度から順にそれぞれ 5 分間隔で漸増適用し（n=7），ホールセルパッチクランプ法にて hERG 電流を測定した．全濃度を評価後に MT-6548 を洗浄除去し，陽性対照として E-4031 の 500 nmol/L を評価した．

その結果，MT-6548 はすべての濃度で hERG 電流を阻害したが，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．陽性対照である E-4031 の阻害率は 78.4%であった．

2.6.2.4.2.2　覚醒下ラットにおける血圧，心拍数及び体温への影響

［資料番号：4.2.1.3-3，概要表：2.6.3.4，試験番号：1008-2391］

テレメトリー送信機を埋め込んだ雄 6 例の Sprague Dawley ラットに，0（1% MC），120，180 及び 360 mg/kg の MT-6548 を単回経口投与し，無麻酔無拘束下における血圧（収縮期，拡張期，平均），心拍数，及び体温を投与 24 時間後まで測定した．

その結果，180 及び 360 mg/kg では，投与 3～6 時間後に対照群に対して 8%～15%の血圧低

下が認められた．心拍数については，全投与量で投与 1.5～8 時間後に対照群に対して 9%～23%の増加が認められ，持続時間及び変化の程度に用量間での差はなかった．体温については 180 mg/kg では投与 2.25～3.25 時間後に，360 mg/kg では投与 2.25～6 時間後にそれぞれ有意な低下が認められた．

2.6.2.4.2.3　覚醒下イヌにおける血圧，心拍数，体温，活動量及び心電図への影響

［資料番号：4.2.1.3-4，概要表：2.6.3.4，試験番号：1008-2382］

テレメトリー送信機を埋め込んだ雄 4 例のビーグル犬に，0（1% MC），60，120，及び 360 mg/kg の MT-6548 を単回経口投与し，無麻酔無拘束下における血圧，心拍数，体温，活動量及び心電図（RR 間隔，PQ 間隔，PR 間隔，QRS 間隔，QT／QTc 間隔）を投与 24 時間後まで測定した．各投与量の投与 4 時間後に採血を実施し，血漿中薬物濃度を測定した．試験はラテン方格デザインで実施し，同一動物に 5 日以上の休薬期間を設け，全投与量を投与した．Fridericia の補正式及び Van de Water の補正式を用いて QTc を算出した．

その結果，低用量から心拍数の増加と血圧の低下が認められた．心拍数の増加は，増加の程度に明確な用量依存性が認められなかったが，作用持続時間が投与量の増加に伴って延長した．360 mg/kg で投与 17 時間後には媒体投与時と同程度まで回復した．血圧は，60 mg/kg では投与 2.5～5 時間後に投与前値に対して 13.4%～23.3%低下し，120 mg/kg では投与 2.5～3.5 時間後に投与前値に対して 11.8%～18.3%低下した．その後は媒体投与時と同程度まで回復した．360 mg/kg では投与 2.5～3.5 時間後に投与前値に対して 22.4%～23.9%低下し，投与 8 時間後においても約 20%低下した．脈圧は 360 mg/kg で投与 3～23 時間後に最大 28%の低下が認められた．いずれの投与量においても心電図パラメータ，体温及び活動量には影響は認められなかった．60，120，及び 360 mg/kg 投与 4 時間後の血漿中 MT-6548 濃度はそれぞれ 14.1，49.6，264.8 μg/mL であった．

2.6.2.4.3　呼吸器系への影響

2.6.2.4.3.1　覚醒下ラットにおける一回換気量，分時換気量及び呼吸数への影響

［資料番号：4.2.1.3-5，概要表：2.6.3.4，試験番号：1008-2371］

雄 6 例の Sprague Dawley ラットに，0（1% MC），120，180 及び 360 mg/kg の MT-6548 を単回経口投与し，投与前及び投与 1～3，8～9，24～25 時間後にヘッドアウトプレチスモグラフチャンバーを用いて覚醒下で呼吸数，分時換気量，一回換気量を測定した．

その結果，180 mg/kg まで呼吸数，分時換気量，一回換気量に影響は認められなかった．360 mg/kg では投与 8～9 時間後に一回換気量及び分時換気量の有意な増加（対照群に対してそれぞれ 52%，19%の増加）が認められたが，呼吸数には変化が認められなかった．

2.6.2.4.4　腎／泌尿器系への影響

2.6.2.4.4.1　ラットの腎機能への影響

［資料番号：4.2.1.3-6，概要表：2.6.3.4，試験番号：0209[redacted]］

雄 10 例の Sprague Dawley ラットに，0（0.25% HPMC - 0.1% Tween 80），120，180 及び 360 mg/kg の MT-6548 を単回経口投与し，代謝ケージで 24 時間採尿した．餌及び水は自由摂取とした．投与 0～4，4～8 及び 8～24 時間後の間隔で，腎排泄パラメータ及び水分摂取量を評価した．更に，投与前及び投与 24 時間後に採血し，クレアチニンを測定しクレアチニンクリアランスを算出した．陽性対照としてフロセミド 20 mg/kg を用いた．

その結果，360 mg/kg までいずれの項目においても変化は認められなかった．陽性対照のフロセミドでは有意な尿量及び水分摂取量の増加，並びに Na 及び Cl 排泄の増加等の変化が認められた．

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし

2.6.2.6　考察及び結論

MT-6548 は，経口投与可能な PHD の低分子阻害剤であり，*in vitro* で実施したヒト組換え PHD1，PHD2 及び PHD3 阻害作用の結果から，各種アイソフォーム間の選択性がないことが確認された．MT-6548 による PHD 活性阻害は，Hep3B 細胞及び HUVEC における HIF-1α 及び HIF-2α の安定化をもたらし，たん白レベルでの蓄積が認められた結果，EPO 濃度を上昇させた．生体内酸素濃度の低下は，PHD 活性の低下をもたらし，HIF-α たん白の安定化による蓄積，核内移行，それに続く転写活性化により，EPO 産生を促進することが明らかになっているが，MT-6548 による PHD 阻害でも同様の変化が認められ，EPO 産生を促進することが確認された．一方で，HIF 経路の別の転写標的である VEGF 産生の亢進は観察されなかった．

海外マスバランス試験（CI-0008 試験）［2.7.2.2.2.1.4］結果より，ヒト血漿中主要代謝物として検出された MT-6548 の O-グルクロン酸抱合体は，PHD2 酵素活性に対して阻害能を示すものの，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．

正常マウスにおいて，MT-6548 は 4 日間反復経口投与又は単回静脈内投与のいずれにおいても血中 EPO 濃度を上昇させ，4 日間反復経口投与により，成熟赤血球の前駆体である網状赤血球比率を増加させることが示された．また 1 日投与量を一定にした際には，1 日 1 回，1 日 2 回及び 1 日 3 回と分割投与しても，網状赤血球比率増加幅に明確な差は認められなかった．MT-6548 の 7 日間反復経口投与により，Hb 値，Hct 値，MCV 及び MCH が増加し，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 の 28 日間反復経口投与により赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH 及び RDW の増加が認められた．

同様に正常ラットにおいて，MT-6548 は単回経口投与により，投与 3～24 時間後の血中 EPO 濃度上昇をもたらす一方で，血中 VEGF 濃度には影響を及ぼさなかった．MT-6548 は 8 日間反復経口投与により，投与前と比較して赤血球数，Hb 値，Hct 値，RDW 及び網状赤血球比率の増加を示し，肝臓での髄外造血の亢進が認められた．MT-6548 は 14 日間反復経口投与により，投与 1，7 及び 14 日後に血中 EPO 濃度を上昇し，投与 14 日又は 15 日後に網状赤血球比率，赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH 及び RDW が有意に増加した．

以上，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，赤血球産生亢進作用を有する 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．この造血亢進反応は，網状赤血球比率，赤血球数，Hb 値及び Hct 値の増加によって実証され，血液の酸素運搬能増加がもたらされたことを意味する．EPO 産生促進を介した網状赤血球比率の増加は，イヌを用いた 7 日間反復経口投与用量設定試験［2.6.6.3.2.1］でも認められた．MT-6548 の PHD 阻害による EPO 産生の促進，それに続く赤血球造血亢進作用は種を超えて保存された生理反応を介しており，ヒトでも同様の効果が発揮され，腎性貧血に有用な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．90 mg/kg/日の投与 27 日目の平均肺動脈圧は対照群が 17.1 mmHg であるのに対して 29.2 mmHg であった．モノクロタリン誘発の肺高血圧症ラットモデルや慢性的低酸素誘発の肺高血圧症ラットでは，平均肺動脈圧がそれぞれ 40～

60，30～40 mmHg と報告されており [2]，これらと比較して，MT-6548 の 90 mg/kg 日の平均肺動脈圧は低い．また，肺高血圧症の動物モデルでは右心室肥大や血管内層の肥大が認められているが，これまで実施した MT-6548 の毒性試験において，2 年間までの投与でこれらの所見は認められていない．

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．ヒトの EPO 遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスにおいて，対照動物に対して 52.3%の Hct 値の増加と 56%の肺動脈圧上昇が認められたが，右心室肥大や肺動脈のリモデリングは認められなかったとの報告がある [3]．この報告は MT-6548 の肺動脈圧の上昇が薬理作用の過剰発現に基づくとする仮説を支持すると考えられる．以上を考え合わせると，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 [4]．

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，並びに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］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．なお，FOB による一般症状及び行動観察において，すべての投薬群で投与 8 時間後にのみ排便量の減少が認められた．一般毒性試験において，便秘等の関連する所見は認められていないことから，毒性学的意義は低いと考えられた．

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，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 [5)]．

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，安全域（総薬物濃度及び遊離型）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代償的な心拍数増加，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，これらの作用は主薬効に基づく低酸素状態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，心血管系，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．

2.6.2.7　図表

本文中に記載した．

2.6.2.8　参考文献

1) Yeh TL, Leissing TM, Abboud MI, Thinnes CC, Atasoylu O, Holt-Martyn JP, et al. Molecular and cellular mechanisms of HIF prolyl hydroxylase inhibitors in clinical trials. Chem Sci. 2017;8(11):7651-68.［資料番号：4.3-21］
2) Ryan JJ, Marsboom G, Archer SL. Rodent models of group 1 pulmonary hypertension. Handb Exp Pharmacol. 2013;218:105-49.［資料番号：4.3-22］
3) Hasegawa J, Wagner K, Karp D, Li D, Shibata J, Heringlake M, et al. Altered pulmonary vascular reactivity in mice with excessive erythrocytosis. Am J Respir Crit Care Med. 2004;169(7):829-35.［資料番号：4.3-23］
4) [redacted]; Final report; Expert assessment of effect of AKB-6548 on pulmonary artery pressure in telemeterized male rats. [redacted] project number [redacted]005.［資料番号：4.3-24］
5) 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］

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）

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3　薬理試験概要表

田辺三菱製薬株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.6.3　薬理試験概要表 4
2.6.3.1　薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2　効力を裏付ける試験 8
2.6.3.3　副次的薬理試験 12
2.6.3.4　安全性薬理試験 14
2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験 18

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	アンジオテンシン変換酵素
CAMK2α	calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2α	Ca^{2}+/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ IIα
CI	confidence interval	信頼区間
EPO	erythropoietin	エリスロポエチン
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
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
Hct	hematocrit	ヘマトクリット
HEK293 細胞	human embryonic kidney cell 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
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
MCH	mean corpuscular hemoglobin	平均赤血球ヘモグロビン量
MCV	mean corpuscular volume	平均赤血球容積
NA	not applicable	該当せず
pBZD	peripheral benzodiazepine	末梢性ベンゾジアゼピン
PHD	prolyl hydroxylase domain	プロリン水酸化酵素
RBC	red blood cell	赤血球
RDW	red blood cell distribution width	赤血球容積粒度分布幅
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮増殖因子

2.6.3　薬理試験概要表

2.6.3.1　薬理試験：一覧表

一覧表

被験物質：MT-6548

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
効力を裏付ける試験						
ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 阻害作用	ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3	*In vitro*	Akebia 米国マサチューセッツ州ケンブリッジ	非適	AKB-6548-NC-[redacted]	［4.2.1.1-1］
MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 阻害作用	ヒト PHD2	*In vitro*	Akebia 米国マサチューセッツ州ケンブリッジ	非適	AKB-6548-NC-[redacted]	［4.2.1.1-2］
Hep3B 細胞及び HUVEC における HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現に対する作用 EPO 及び VEGF 分泌に対する作用	Hep3B 細胞 HUVEC	*In vitro*	[redacted] フランス[redacted]	非適	[redacted]04989	［4.2.1.1-3］
単回静脈内投与及び 4 日間反復経口投与による血中 EPO 濃度及び網状赤血球比率増加作用	Swiss Webster マウス	静脈内/単回及び経口/4 日間	[redacted] 米国[redacted]	非適	[redacted]-0302	［4.2.1.1-4］

2.6.3.1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
単日及び 4 日間反復経口投与による網状赤血球比率増加作用	Swiss Webster マウス	経口/単日及び 4 日間	[redacted] 米国[redacted]	非適	[redacted]-0446	［4.2.1.1-5］
7 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用	Swiss Webster マウス	経口/7 日間	[redacted] 米国[redacted]	非適	[redacted]-0102	［4.2.1.1-6］
28 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用	CByB6F1 ヘミ接合野生型マウス	経口/28 日間	[redacted] 米国[redacted]	非適	20065328	［4.2.1.1-7］
単回経口投与による血中 EPO 及び VEGF 濃度増加作用	Sprague Dawley ラット	経口/単回	[redacted] カナダ[redacted]	非適	6901490	［4.2.1.1-8］
8 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用	Sprague Dawley ラット	経口/8 日間	[redacted] 米国[redacted]	非適	[redacted]-0146	［4.2.1.1-9］
14 日間反復経口投与による血中 EPO，VEGF 濃度及び赤血球造血亢進作用	Sprague Dawley ラット	経口/14 日間	[redacted] カナダ[redacted]	非適	6901491	［4.2.1.1-10］

2.6.3.1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
副次的薬理試験						
各種受容体等に対する選択性	受容体結合及び酵素アッセイ	*In vitro*	[redacted] フランス[redacted]	非適	14651	［4.2.1.2-1］
ACE 及び pBZD に対する作用	ヒト pBZD， ウサギ大動脈	*In vitro* *Ex vivo*	[redacted] フランス[redacted]	非適	100043777	［4.2.1.2-2］
ラット肺動脈圧に対する作用	Sprague Dawley ラット	経口/29 日間	[redacted] 米国[redacted]	非適	021-1802	［4.2.1.2-3］
安全性薬理試験						
ラットにおける FOB	Sprague Dawley ラット	経口/単回	[redacted] カナダ[redacted]	適	1008-2361	［4.2.1.3-1］
hERG 電流への影響	HEK293 細胞	*In vitro*	[redacted] カナダ[redacted]	適	701205-2	［4.2.1.3-2］
覚醒下ラットにおける血圧，心拍数及び体温への影響	Sprague Dawley ラット	経口/単回	[redacted] カナダ[redacted]	適	1008-2391	［4.2.1.3-3］

2.6.3.1　薬理試験：一覧表（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	GLP 適用	試験番号	記載箇所
覚醒下イヌにおける血圧，心拍数，体温，活動量及び心電図への影響	Beagle イヌ	経口/単回	[redacted] カナダ[redacted]	適	1008-2382	［4.2.1.3-4］
覚醒下ラットにおける一回換気量，分時換気量及び呼吸数への影響	Sprague Dawley ラット	経口/単回	[redacted] カナダ[redacted]	適	1008-2371	［4.2.1.3-5］
ラットの腎機能への影響	Sprague Dawley ラット	経口/単回	[redacted] 米国[redacted]	適	0209[redacted]	［4.2.1.3-6］

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1　*In vitro* 薬理試験

被験物質：MT-6548

試験の種類	試験系	適用濃度	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3 阻害作用	ヒト PHD1，PHD2 及び PHD3	0.1 nmol/L~10 μmol/L	IC_{50} 値 • PHD1：15.36 nmol/L • PHD2：11.83 nmol/L • PHD3：7.63 nmol/L	AKB-6548-NC-[redacted]	［4.2.1.1-1］
MT-6548 O-グルクロン酸抱合体のヒト PHD2 阻害作用	ヒト PHD2	0.1 nmol/L~10 μmol/L	IC_{50} 値：2.31 μmol/L	AKB-6548-NC-[redacted]	［4.2.1.1-2］
Hep3B 細胞及び HUVEC における HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現に対する作用 EPO 及び VEGF 分泌への作用	Hep3B 細胞 HUVEC	0.1～100 μmol/L	Hep3B 細胞 • 6 及び 24 時間で，HIF-1α たん白発現量が増加した • 10 μmol/L 以上で EPO 分泌が亢進した • VEGF 分泌への影響なし HUVEC • 6 及び 24 時間で，HIF-1α 及び HIF-2α たん白発現量が増加した	[redacted]04989	［4.2.1.1-3］

2.6.3.2.2　*In vivo* 薬理試験

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量（mg/kg/日）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
単回静脈内投与及び4日間反復経口投与による血中EPO濃度及び網状赤血球比率増加作用	マウス/Swiss Webster	静脈内/単回	1日1回 0，60	雄 12	• 血中EPO濃度は投与4時間後で最も高く1936 pg/mL（対照群：269 pg/mL）であった	[redacted]-0302	［4.2.1.1-4］
		経口/4日間	1日3回 0，30，90，270	雄 18	• 30及び90 mg/kg/日では明確な作用は認められなかった • 270 mg/kg/日では，血中EPO濃度は投与2時間後で最も高く1461 pg/mL（対照群：<94 pg/mL）であった • 網状赤血球比率は投与8時間後で最も高く5.55%（対照群：1.30%）であった		
単日及び4日間反復経口投与による網状赤血球比率増加作用	マウス/Swiss Webster	経口/単日及び4日間	1日1回 0，270，1000 a) 1日2回 270 1日3回 270	雄 2～3	• 単日投与と比較して，4日間反復投与で脾臓重量増加幅及び網状赤血球比率増加幅が大きかった • 脾臓重量増加及び網状赤血球比率増加作用は1日1回，1日2回及び1日3回の4日間反復投与間で明らかな差はなかった	[redacted]-0446	［4.2.1.1-5］

a)　1000 mg/kg/日投与は単日投与のみ実施

2.6.3.2.2　*In vivo* 薬理試験（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量（mg/kg/日）	性別及び動物数/群	特記すべき所見	試験番号	記載箇所
7 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用	マウス/Swiss Webster	経口/7 日間	1 日 1 回 0，200	雄 10	• Hb 値，Hct 値，MCV 及び MCH が有意に増加した • 脾臓における髄外造血の亢進及び脾臓重量の増加が認められた	[redacted]-0102	［4.2.1.1-6］
28 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用	マウス /CByB6F1 ヘミ接合野生型マウス	経口/28 日間	1 日 1 回 0，25，100	雄 4 雌 4	• 25 mg/kg/日では明確な作用は認められなかった • 100 mg/kg/日で赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH 及び RDW が有意に増加した	20065328	［4.2.1.1-7］
単回経口投与による血中 EPO 及び VEGF 濃度増加作用	ラット /Sprague Dawley	経口/単回	1 日 1 回 50，150	雄 15	• 50 及び 150 mg/kg/日で投与 6 時間後をピークとして，投与 3～24 時間後の血中 EPO 濃度が上昇した • いずれの用量においても，血中 VEGF 値への影響は認められなかった	6901490	［4.2.1.1-8］

2.6.3.2.2　*In vivo* 薬理試験（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量（mg/kg/日）	性別及び動物数/群	特記すべき所見 [b)]	試験番号	記載箇所
8 日間反復経口投与による赤血球造血亢進作用	ラット/Sprague Dawley	経口/8 日間	1 日 1 回 150	雄 6	• 投与前と比較して，赤血球数（31.6%），Hb 値（32.8%），Hct 値（43.6%），RDW（31.2%）及び網状赤血球比率（42.1%）が増加した • 肝臓における髄外造血の亢進が認められた	[redacted] 0146	［4.2.1.1-9］
14 日間反復経口投与による血中 EPO，VEGF 濃度及び赤血球造血亢進作用	ラット/Sprague Dawley	経口/14 日間	1 日 1 回 0，30，90	雄 18	• 30 mg/kg/日で対照群と比較して，血中 EPO 値が最大 5 倍高値を示し，Hb 値が有意に増加した • 90 mg/kg/日で対照群と比較して，血中 EPO 値が最大 146 倍高値を示し，赤血球数，Hb 値，Hct 値，MCV，MCH，RDW 及び網状赤血球数が有意に増加した • いずれの用量においても，血中 VEGF 値への影響は認められなかった	6901491	［4.2.1.1-10］

b)　投与前又は対照群と比較した際の変化率を括弧内に%で示す

2.6.3.3　副次的薬理試験

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
各種受容体等に対する選択性	112 種類の受容体 42 種類の酵素	*In vitro*	10 µmol/L	NA，n=2	• アンジオテンシン変換酵素（ACE），末梢性ベンゾジアゼピン（pBZD）受容体及び Ca^{2+}/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ IIα（CAMK2α）に対して阻害（>50%または<−50%）が認められた • ACE：対照値の 60%阻害．ただし，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． • pBZD：対照特異的結合の 70%阻害 • CAMK2α：対照値の-89%阻害	非適	14651	［4.2.1.2-1］
ACE 及び pBZD に対する作用	ヒト pBZD ウサギ大動脈	*In vitro* *Ex vivo*	0.3，1，3，10，30，100，300 µmol/L	NA，n=2	• MT-6548 はいずれの試験濃度でも pBZD に作用を示さなかった • MT-6548 は ACE に活性化作用を示さなかったが，阻害作用を示し，その IC_{50} 値は 72 µmol/L であった	非適	100043777	［4.2.1.2-2］

2.6.3.3　副次的薬理試験（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
ラット肺動脈圧に対する作用	ラット /Sprague Dawley	経口/29 日間	0，30，90 mg/kg/日	雄 6	• 90 mg/kg/日の投与 15 日目に収縮期及び平均肺動脈圧の有意な増加が，投与 27 日目に収縮期，拡張期及び平均肺動脈圧の有意な増加がそれぞれ認められた．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）には影響が認められなかった	非適	021-1802	［4.2.1.2-3］

2.6.3.4　安全性薬理試験

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
ラットにおける FOB	ラット/Sprague Dawley	経口/単回	0，120，180，360 mg/kg	雄 10	• 一般症状，行動及び神経関連パラメータに対する作用なし • 用量依存的な排便量減少（120，180 及び 360 mg/kg の用量で対照群に対してそれぞれ 45%，59%及び 68%）が投与 8 時間後にみられた	適	1008-2361	［4.2.1.3-1］
hERG 電流への影響	HEK293 細胞	*In vitro*	9.5，28.4，94.8，284.4 µmol/L	NA，n=7	• 9.5 µmol/L 以上の濃度で統計学的有意な hERG 阻害（13～27%阻害）がみられたが，濃度依存的な作用ではなかった • IC_{50} 値は算出されなかった	適	701205-2	［4.2.1.3-2］

2.6.3.4　安全性薬理試験（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
覚醒下ラットにおける血圧，心拍数及び体温への影響	ラット/Sprague Dawley	経口/単回	0，120，180，360 mg/kg	雄 6	• 180 及び 360 mg/kg の用量の投与 3～6 時間後に軽度であるが散発的に統計学的有意な全身血圧低下（↓8%～15%）がみられた • MT-6548 の全投与群で投与 1.5～8 時間後に心拍数増加がみられた（↑9%～23%） • 180 及び 360 mg/kg の用量で体温低下がみられた	適	1008-2391	［4.2.1.3-3］

2.6.3.4　安全性薬理試験（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
覚醒下イヌにおける血圧，心拍数，体温，活動量及び心電図への影響	イヌ/Beagle	経口/単回	0，60，120，360 mg/kg	雄 4	• P-QRS-T 波の形態及び間隔において顕著な変化なし．薬物誘発性 QTc 変化の所見なし • 全用量で心拍数が増加し，120 及び 360 mg/kg の用量ではそれぞれ投与約 7 及び 17 時間後に媒体対照群のレベルに回復した • 60 mg/kg 以上で平均血圧，収縮期血圧及び拡張期血圧が低下し，約 20%の血圧低下が最長 8 時間持続した • 360 mg/kg で投与 3～23 時間後に脈圧の低下が認められた	適	1008-2382	［4.2.1.3-4］

2.6.3.4　安全性薬理試験（続き）

被験物質：MT-6548

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量	性別及び動物数/群	特記すべき所見	GLP 適用	試験番号	記載箇所
覚醒下ラットにおける一回換気量，分時換気量及び呼吸数への影響	ラット/Sprague Dawley	経口/単回	0，120，180，360 mg/kg	雄 6	• 180 mg/kg までラットの呼吸機能に対する影響は認められなかった • 360 mg/kg の投与 8～9 時間後に一回換気量及び分時換気量の統計学的有意な増加がみられた（それぞれ↑52%及び 19%）	適	1008-2371	［4.2.1.3-5］
ラットの腎機能への影響	ラット/Sprague Dawley	経口/単回	0，120，180，360 mg/kg	雄 10	• 腎機能に対する影響は認められなかった	適	0209RA104.001	［4.2.1.3-6］

2.6.3.5　薬力学的薬物相互作用試験

MT-6548 の薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった.