ダーブロック錠1mg
ダーブロック錠2mg
ダーブロック錠4mg
ダーブロック錠6mg

製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）CTDの概要（サマリー）

2.4. 非臨床試験の概括評価

グラクソ・スミスクライン株式会社

May 16 2020 10:17:22

非臨床試験の概括評価の目次

頁

2.4. 非臨床試験の概括評価 1
2.4.1. 非臨床試験計画概略 1
2.4.1.1. 緒言 1
2.4.1.2. 非臨床試験計画概略 1
2.4.2. 薬理試験 3
2.4.2.1. 作用機序 3
2.4.2.2. 効力を裏付ける試験 4
2.4.2.3. 副次的薬理試験 7
2.4.2.4. 安全性薬理試験 7
2.4.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験 9
2.4.3. 薬物動態 9
2.4.3.1. 分析方法 10
2.4.3.2. 吸収 11
2.4.3.3. 分布 13
2.4.3.4. 代謝 14
2.4.3.5. 排泄 17
2.4.3.6. 薬物動態学的薬物相互作用 17
2.4.4. 毒性試験 18
2.4.4.1. 毒性試験パッケージ 18
2.4.4.2. 動物種の選択 19
2.4.4.3. 急性毒性 19
2.4.4.4. 反復投与毒性 19
2.4.4.5. がん原性及び遺伝毒性 27
2.4.4.6. 生殖発生毒性 28
2.4.4.7. 代謝物の毒性評価 30
2.4.4.8. 免疫毒性 31
2.4.4.9. 光毒性 31
2.4.4.10. 不純物、分解物及び添加物 31
2.4.5. 総括及び結論 32
2.4.6. 参考文献 37
APPENDIX 1 MODULE 4 SECTIONS WITHOUT STUDY REPORTS 41

2.4 の略号等一覧

略語（略称）	内　容
AAG	α1-酸性糖蛋白質
ADPKD	常染色体優性多発性嚢胞腎
α-KG	α ケトグルタル酸
ALP	アルカリホスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
APCI/LC-MS	Atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry
AUC	血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	ヒト breast cancer resistance protein
BDC	胆管カニュレーション処置
CKD	慢性腎臓病
CL	クリアランス
Cmax	最高血漿中濃度
COX	シクロオキシゲナーゼ
CP4H	コラーゲンプロリルヒドロキシラーゼ
CYP	チトクローム P450
DRM	薬物関連物質
EC50	50%有効濃度
ECG	心電図
EPO	エリスロポエチン
F	バイオアベイラビリティ
FaSSIF	人工腸液
FIH	低酸素誘導因子阻害因子
fu	血漿蛋白非結合率
GFR	糸球体ろ過率
GLP	医薬品の安全性試験の実施に関する基準
GSK2391220	ダプロデュスタットの代謝物 M2
GSK2487818	ダプロデュスタットの代謝物 M4（立体異性体）
GSK2499166	ダプロデュスタットの代謝物 M4（立体異性体）
GSK2506102	ダプロデュスタットの代謝物 M5（立体異性体）
GSK2506104	ダプロデュスタットの代謝物 M3（立体異性体）
GSK2531398	ダプロデュスタットの代謝物 M6（立体異性体）
GSK2531399	ダプロデュスタットの代謝物 M5（立体異性体）
GSK2531400	ダプロデュスタットの代謝物 M13（立体異性体）
GSK2531401	ダプロデュスタットの代謝物 M13（立体異性体）
GSK2531403	ダプロデュスタットの代謝物 M3（立体異性体）
Hb	ヘモグロビン
Hct	ヘマトクリット
Hep3B	ヒト肝がん細胞
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HIF	低酸素誘導因子
HMG	ヒドロキシメチルグルタリル
$hNa_v1.5$	ヒト電位依存性ナトリウムチャネル 1.5 サブタイプ
HPLC	高速液体クトマトグラフィー
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ 1
HSA	ヒト血清アルブミン

IC50	50%阻害濃度
Ki	阻害定数
LC-MS	液体クロマトグラフ／質量分析
LC-MS/MS	液体クロマトグラフ／タンデム質量分析
MATE	Multidrug and toxin extrusion
MDCKII	Madin-Darby イヌ腎臓由来細胞 II
MDR1	Multidrug resistance protein 1
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NMR	核磁気共鳴
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation
OECD	経済協力開発機構
PGK-1	ホスホグリセリン酸キナーゼ 1
P-gp	P 糖蛋白質
PHD	低酸素誘導因子プロリル-4-ヒドロキシラーゼ
PK	薬物動態
PRVP	右室収縮期圧
pVHL	von Hippel-Lindau 腫瘍抑制蛋白
QTc	補正 QT
RBC	赤血球数
rh	遺伝子組換えヒト
$t_{1/2}$	解離／消失半減期
TdP	torsades de pointes
TIBC	総鉄結合能
TK	トキシコキネティクス
tmax	最高血漿中濃度到達時間
Tp-e	心電図波形の T 波の頂点から終末までの時間
UIBC	不飽和鉄結合能
VEGF	血管内皮増殖因子
Vss	定常状態での分布容積

2.4.　非臨床試験の概括評価

2.4.1.　非臨床試験計画概略

2.4.1.1.　緒言

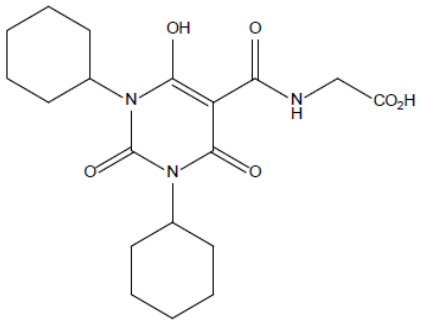
ダプロデュスタット（GSK1278863 とも記載）は腎性貧血に対する治療薬として開発された低酸素誘導因子（HIF）プロリル-4-ヒドロキシラーゼ（PHD）阻害薬である。

腎性貧血は慢性腎臓病（CKD）の代表的な合併症の一つである。低酸素症において血中酸素濃度が低下すると、これに応答して腎臓及び肝臓でエリスロポエチン（EPO）が産生されて骨髄での赤血球産生が促進されるが、腎障害を合併する CKD 患者では、ヘモグロビン（Hb）が低下したときに低酸素症に応答した腎臓での EPO 産生が不十分になると考えられている[日本透析医学会, 2016]。

腎性貧血に対する既存の治療法には、経口又は注射剤による鉄補充療法、遺伝子組換えヒト EPO（rhEPO）の投与及び輸血が挙げられる。これらの治療法は腎性貧血に対して効果を示し有用であるが、一方で、いずれの治療法にも安全性、有効性又は服薬コンプライアンスの側面での限界がある。特に、rhEPO の使用により死亡、重篤な心血管イベント、脳卒中、深部静脈血栓症及び高血圧の発現リスクが増加し、化学療法に伴う貧血の治療として rhEPO を使用したときには全生存期間の短縮、腫瘍増殖又はがんの再発リスクが増加することから、より安全な腎性貧血治療薬の開発が望まれている。

本承認申請では、腎性貧血に対してダプロデュスタットの最高臨床用量 24 mg を 1 日 1 回経口投与する。

ダプロデュスタットの非臨床試験は、特記しない限り臨床使用予定である GSK1278863 の親化合物を用いて実施した（図 2.4.1.1-1）。本項ではダプロデュスタットのすべての用量及び濃度を親化合物の量として表した（簡潔にするためダプロデュスタットと記載）。



Daprodustat (GSK1278863)

図 2.4.1.1-1　ダプロデュスタットの構造式

2.4.1.2.　非臨床試験計画概略

腎性貧血患者への経口投与の妥当性を裏付けるため、ダプロデュスタットの包括的な非臨床評価を行った。ダプロデュスタットの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験として種々の in vitro 及び in vivo 試験を実施し、安全性薬理試験として一連の in vitro 試験並びにラット

及びイヌでの in vivo 試験を実施した。吸収、分布、代謝及び排泄試験ではダプロデュスタットの薬物動態（PK）の特徴を明らかにし、毒性評価に用いた動物種の適切性を評価した。毒性試験としては、ダプロデュスタットを用いてマウス、ラット、イヌ及びサルの単回経口投与試験、マウス、ラット、イヌ及びサルのそれぞれ最長 13、26、13 及び 39 週間反復経口投与試験を実施した。また、2 年間のラット及びマウスがん原性試験、遺伝毒性試験及び生殖発生毒性試験を実施した。更に、その他の試験として、ヒト代謝物を用いた遺伝毒性試験、ラットの 14 日間静脈内投与試験（胃に対する影響に関する探索試験）、14 日間経口投与試験（血漿グルコース濃度に関する探索試験）及び局所刺激性試験を実施し、免疫毒性の可能性についても考察した。

経皮投与による開発（既に開発中止済み）のための非臨床試験も実施した。これらの試験については、考察には含めなかったが、透明性確保のため概要文及び概要表に結果を示す。

主要な安全性薬理試験、毒性試験及び一部の薬物動態試験はいずれも経済協力開発機構（OECD）加盟国において医薬品の安全性試験の実施に関する基準（GLP）及び OECD ガイドラインに従って実施された。

動物／ヒト曝露量比を算出するためのヒト曝露量には、血液透析患者（日本人、体重 54 kg）に最高臨床用量（24 mg/日）を投与したときの定常状態（非透析日）における推定曝露量（最高血漿中濃度（Cmax）：0.485 µg/mL、血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）：1.184 µg·hr/mL）を用いた[2019N405983]。

腎性貧血を伴う CKD 患者にダプロデュスタットの 5 mg を反復経口投与したときに、ダプロデュスタットの 3 種類の主な血中ヒト代謝物（M2、M3、M13）の曝露量はいずれも薬物関連物質（DRM）の 10%超であったが、他の 3 種類の血中ヒト代謝物（M4、M5、M6）は DRM の 10%を下回ることが示唆された（2.7.2.2.1.2.3.2.、2.7.2.2.1.2.3.3.）。これらの 6 種類のヒト代謝物（M2、M3、M4、M5、M6、M13）は、他の代謝物と比較して血中で高濃度に検出された。このうち M2 にはキラル中心が存在しないが、他の 5 種類（M3、M4、M5、M6、M13）はキラル中心を有するため立体異性体が存在する。

ヒト尿試料のキラル分析において、6 種類のヒト代謝物のうち M2、M3、M4 及び M13 についてはそれぞれ 1 種類（GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）、GSK2487818（M4）、GSK2531401（M13））が主に存在し、M5 及び M6 についてはそれぞれ 2 種類の立体異性体（GSK2531399（M5）、GSK2506102（M5）、GSK2531398（M6）、GSK2531407（M6））が存在することが示唆されている（2.6.4.1.）。

2.4.及び 2.6.では、9 化合物（GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）、GSK2531403（M3）、GSK2487818（M4）、GSK2531399（M5）、GSK2506102（M5）、GSK2531398（M6）、GSK2531407（M6）、GSK2531401（M13））をダプロデュスタットの 6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）と表記する。

ダプロデュスタットをウサギ及びサルに投与したときに産生される代謝物プロファイルはヒトと類似していることから、代謝物の安全性評価にはこれらの動物種を使用した。3 種類の主なヒト代謝物（GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）、GSK2531401（M13））をマウス及びラットに直接投与する安全性評価も行った。ダプロデュスタットの体内動態に関す

るデータから、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルはダプロデュスタットの安全性を評価する非臨床試験に使用する動物種として適切であると考えられる。

2.4.1.2.1.　　最終報告書の添付がない 4.の項

ダプロデュスタットの非臨床試験の概略を以下に示し、非臨床試験の最終報告書を 4.に添付した。最終報告書の添付がない 4.の項については、別添 1 でその妥当性を考察する。

2.4.2.　薬理試験

ダプロデュスタットの効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験として種々の in vitro 及び in vivo 試験を実施した。また、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）についても薬理試験を実施した。効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の各試験及びその所見の要約を 2.6.2.に示した。実施した効力を裏付ける試験、副次的薬理試験及び安全性薬理試験の一覧並びに安全性薬理試験所見の要約表を 2.6.3.に示した。すべての薬理試験の最終報告書は 4.2.に添付した。

2.4.2.1.　　作用機序

HIF は心不全、脳卒中、肺疾患、気圧変化及び網膜損傷等での低酸素症に対する応答を制御するマスター転写因子である[Bracken, 2003; Lee, 2004]。HIF は α 及び β サブユニットからなるヘテロダイマーである。正常酸素状態では HIFα は E3 ユビキチンリガーゼによって常にユビキチン化され、26S プロテアソームによる分解を受ける（2.6.2. 図 2.6.2 2）。このユビキチン化を介する HIFα の分解は、von Hippel-Lindau 腫瘍抑制蛋白（pVHL）との相互作用に依存しており[Maxwell, 1999]、HIFα-pVHL 相互作用に必要な認識エレメントには HIFα の水酸化プロリン残基が含まれている[Ivan, 2001; Jaakkola, 2001]。HIFα は 2 ヵ所の高度に保存されたプロリン残基が PHD1～3 で水酸化されることによって厳密に調節され、急速に分解される。HIFα の 2 種類のアイソフォーム（HIF1α、HIF2α）はいずれも上記の機序で調節されている。

PHD は鉄及び α ケトグルタル酸（α-KG）依存性ジオキシゲナーゼスーパーファミリーの一つである。低酸素状態によって PHD が阻害されると、水酸化されていない HIFα が蓄積し（安定化）、HIFβ とダイマーを形成して HIF 応答性遺伝子の発現を上昇させる。これらの HIF 応答性遺伝子は赤血球産生（EPO）、血管新生（血管内皮増殖因子（VEGF））、代謝及び炎症（ホスホグリセリン酸キナーゼ 1（PGK-1）、誘導型一酸化窒素合成酵素）の他、酸素利用の上昇及び鉄代謝／輸送（トランスフェリン、トランスフェリン受容体、ヘムオキシゲナーゼ 1（HO-1））等の多様な生理機能に関与している[Epstein, 2001; Ivan, 2001; Jaakkola, 2001; Yu, 2001]。多数の HIF 応答性遺伝子が同定されており[Semenza, 2014]、糖取込みと解糖、EPO 産生、鉄代謝／輸送、又は血管新生の促進による酸素運搬の増加、並びに低酸素状態での細胞生存及び増殖の促進等の複数の機能に幅広く関与している[Semenza, 2003]。HIF 応答はメバロン酸経路に関わっており、in vitro 及び in vivo において低酸素又は PHD 阻害薬（dimethyloxalylglycine）の処理により insulin-induced gene 2 の蛋白質発現が促進され、これを介してヒドロキシメチルグルタリル（HMG）-CoA 還元酵素のユビキチン化及び分解が促進される。また、それと同時に HMG-CoA 還元酵素遺伝子の転写促進に関わる経路が抑制される

ことが示されており、in vitro で細胞内コレステロールレベルが減少することが示されている[Hwang, 2017; Nguyen, 2007]。このことから、ダプロデュスタットを投与した患者で LDL コレステロールの低下がみられた（2.7.4.3.3.）ことは、HMG-CoA 還元酵素の抑制が関連すると考えられる。

PHD 活性の阻害により低酸素時の応答が誘導されて HIF1α 及び HIF2α が安定化する。HIFα の安定化により HIF 応答性遺伝子の転写が活性化されて赤血球産生経路が刺激され、赤血球が産生されて貧血が改善される。したがって、PHD 阻害薬は EPO 及び鉄代謝／輸送に関わる遺伝子等の HIF 応答性遺伝子の発現を上昇させて赤血球産生経路を刺激することにより、腎性貧血に対して治療効果を発揮することが期待される。

2.4.2.2.　効力を裏付ける試験

2.4.2.2.1.　ダプロデュスタットの in vitro 試験

ダプロデュスタットは強力で選択的な PHD 阻害薬であり、ラット PHD2 及び PHD3、イヌ PHD3 又はヒトの PHD1～3 に対していずれも同程度の阻害作用を示し、その阻害定数（Ki）は 1.2～7.3 nM であった（2.6.2.2.1.1.）。ダプロデュスタットはヒト PHD2 及び PHD3 に対していずれも可逆的で α-KG に競合的な阻害作用を示した。ヒト PHD2 及び PHD3 に対するダプロデュスタットの結合は緩徐であり、解離半減期（$t_{1/2}$）はそれぞれ 92 及び 132 分であった（2.6.2.2.1.2.）。ダプロデュスタットのヒト PHD1～3 に対する阻害作用の選択性は、コラーゲンプロリルヒドロキシラーゼ（CP4H）及び HIF 阻害因子（FIH）に対する阻害作用と比較して 400 倍以上であった（2.6.2.2.1.3.）。

ヒト肝がん細胞株（Hep3B 細胞株）において、ダプロデュスタットの処理により HIF1α 及び HIF2α の蓄積がみられ、これは PHD 阻害により HIF1α 及び HIF2α が安定化したことによるものと考えられる（2.6.2.2.1.4.）。Hep3B 細胞株を用いて EPO、PGK-1 及び PHD1～3 等の主な HIF 応答性遺伝子の発現並びに EPO 及び VEGF-A の蛋白質量に対するダプロデュスタットの作用を検討した。ダプロデュスタットは Hep3B 細胞株の EPO mRNA 量及び EPO 蛋白質量を濃度依存的に増加させ、PGK-1 mRNA 量及び VEGF-A 蛋白質量をわずかに増加させたが、PHD1～3 mRNA 量を変化させなかった（2.6.2.2.1.6.）。ダプロデュスタットの EPO 及び VEGF-A 誘導作用の 50%有効濃度（EC50）はそれぞれ 3.3 及び 2.2 μM であり、媒体と比較してそれぞれ最高で 5.8 及び 2.2 倍に増加させた（2.6.2.2.1.5.）。これらのことから、ダプロデュスタットは HIF1α 及び HIF2α を安定化させ、種々の HIF 応答性遺伝子の発現を誘導すると考えられる。留意すべき点として、EPO 産生腎細胞は特性が十分には明らかにされていないこと、一般的には評価に利用できないこと、及び VEGF-A は複数のタイプの細胞で産生されることから、細胞での効力評価には HIF 応答を再現できるサロゲート細胞株として Hep3B 細胞株を用いており、この細胞株での試験成績を in vivo に外挿することは困難であると考えられる。

ヘプシジンは消化管、肝臓及びマクロファージでの鉄の吸収／放出を制御する鉄恒常性及び Hb 産生の主要な調節因子である[Ganz, 2003]。ヘプシジンは肝臓で産生されてホルモンとして機能し、腸上皮細胞に発現する鉄排出輸送体であるフェロポルチンに結合してその内在化及び分解を誘導し、腸管からの鉄吸収を抑制する。ヘプシジンの発現は、体内の鉄貯蔵、

炎症、赤血球産生及び低酸素症等の様々な刺激によって転写レベルで調節されている[Finberg, 2011]。

ダプロデュスタットはHep3B細胞株において骨形成蛋白質6によるヘプシジンmRNA発現を抑制したことから、鉄輸送／利用を改善させる可能性があることが示された。一方、rhEPOはヘプシジンmRNA発現を抑制しなかった（2.6.2.2.1.7.）。このことから、ダプロデュスタットを介するHIF応答の活性化は、本試験条件下で誘導されたEPO非依存性経路を介してヘプシジン mRNA 発現の低下に直接的に関与していることが示唆される。この成績は、HIFを介してプロテアーゼであるTMPRSS6が増加し、これがヘプシジンの発現を低下させるという仮説と一致している[Lakhal, 2011]。肝細胞では、ヘプシジンはヘモジュベリンを共受容体とする受容体複合体を介して骨形成蛋白質によって誘導される。II型TMPRSS6は、ヘモジュベリンを細胞膜から切断することによって骨形成蛋白質によるヘプシジンの誘導を阻害することから、本試験においてHIFによって誘導されたTMPRSS6がヘプシジンの低下に直接的に寄与する可能性が考えられる。しかし、マウスを用いた最近の研究では、EPO誘導を介してヘプシジンmRNA発現が抑制され、これはHIFによる間接的な作用である可能性が示唆されている[Liu, 2012]。HIF応答の活性化がin vivoでの肝臓のヘプシジン発現に直接的に影響するか、造血又は他のメディエーターを介して間接的に影響するかについては、明らかにされていない。

2.4.2.2.2.　ダプロデュスタットのin vivo試験

肝臓及び腎臓はEPOの重要な供給源であり、いずれの臓器も赤血球産生に寄与し、血中EPO濃度の90%が腎臓由来である[Bernhardt, 2010; Tanaka, 2012]。

正常B6D2F1マウスにダプロデュスタットの60 mg/kgを単回経口投与すると、肝臓及び腎臓のEPO mRNA量は増加し、これに伴って血漿中EPO濃度が上昇して投与約12時間後にピーク（媒体と比較して11倍超の濃度）に到達した（2.6.2.2.3.1.1.、2.6.2.2.3.1.2.）。

Sprague Dawleyラットにダプロデュスタットの10又は30 mg/kgを単回経口投与すると、投与6時間後に肝臓のEPO mRNA量が増加し、媒体と比較して10 mg/kgでは4～11倍、30 mg/kgでは72～323倍に増加した（2.6.2.2.3.1.3.）。

ダプロデュスタットをマウスに8日間反復経口投与又はラットに21日間反復経口投与したときに、マウス（試験9日）及びラット（試験15日）において、3 mg/kg/日以上でHb及びヘマトクリット（Hct）の用量依存的な増加が認められ、赤血球はマウスの3 mg/kg/日以上で最高17%、ラットの0.3 mg/kg/日以上で最高18%の有意な増加がみられた（2.6.2.2.3.2.、2.6.2.2.3.3.）。マウスでは3 mg/kg/日以上で網状赤血球数の有意な高値（最高673%増加）がみられ、血小板及び白血球の有意な低値（それぞれ最高51及び34%減少）がみられた。

これらのin vitro及びin vivoの薬理試験成績から、ダプロデュスタットはげっ歯類に反復投与したときにPHDを阻害することによってHIF1α及びHIF2αを安定化させ、EPO等の主なHIF応答性遺伝子の発現を上昇させた後、赤血球産生を引き起こすことが示唆される。PHDの阻害によって赤血球産生を刺激するというダプロデュスタットの作用機序に基づくと、rhEPO療法ではHbを上昇させるために生理的範囲を大きく超えるEPO濃度に上昇させるのに対して、ダプロデュスタットは生理的範囲の内因性EPO濃度でHbを上昇させること

から、高濃度の rhEPO に関連する血圧上昇及び他の有害事象を回避できる可能性が考えられる。このことは、イヌの心血管系に関する安全性薬理試験で血圧上昇がみられなかった（2.4.2.4.）ことと一致している。

HIF 応答性の経路を調節することに関しては理論的に懸念すべき点が考えられる。遺伝子改変動物モデルの試験及びヒトの自然突然変異から得られた低酸素症が関連する病態生理の知見に基づいて、増殖性網膜症、黄斑浮腫、脈絡膜血管新生、肺動脈性肺高血圧、関節リウマチの増悪、心筋症及び癌が HIF 応答性の経路と関連する可能性が示唆されている[Bishop, 2015; Deng, 2016; Formenti, 2011; Semenza, 2011]。ダプロデュスタットの毒性試験では増殖性網膜症、黄斑浮腫、脈絡膜血管新生、肺高血圧及び関節炎症／関節炎を示唆する所見は認められていない（2.4.4.）。これまでに得られた臨床試験の安全性データレビューにおいて、これらの事象はダプロデュスタットの安全性に関する懸念事項として特定されていない（2.5.5.4.5.2.）。げっ歯類（ラット及びマウス）にダプロデュスタットを 2 年間経口投与したがん原性試験では、ダプロデュスタットに関連した腫瘍性の変化は認められなかった（2.6.6.5.）。ラットがん原性試験では進行性心筋症の増悪がみられた（2.6.6.9.）。心筋線維変性の発現頻度の増加は、rhEPO 製剤であるダルベポエチン アルファ及び peginesatide のラット反復投与毒性試験においてもみられている[FDA, 2012; Serabian, 2003]。CKD 患者にダプロデュスタットを最大 25 mg まで最長 52 週間投与した臨床試験において、心筋症のリスクを示唆するデータは得られていない（2.5.5.4.5.2.3.）。

常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）のマウスモデル（誘導性腎臓上皮細胞特異的 Pkd1 欠損モデル）において、HIF1α が多発性嚢胞腎の進行に関与している可能性を示唆するデータが報告されており、PHD 阻害薬である FG-2216（2-(1-chloro-4-hydroxyisoquinoline-3-carboxamido) acetate）の投与後に嚢胞の成長促進及び死亡率の上昇がみられている[Kraus, 2018]。しかし、この試験では FG-2216 の 12 週間投与開始から 8 週間の期間に正常レベルを超える Hct の 10%以上の増加がみられたように、赤血球産生能が顕著に亢進していた。この論文に対する論評[Hofherr, 2018]で述べられているように、この試験で使用された用量よりも低用量で Hct の増加の程度が少ない場合に、すなわち、CKD 患者に臨床用量を投与したときに嚢胞増大がみられるかどうかについては不明である。ダプロデュスタットの毒性試験では、媒体と比較してダプロデュスタットで腎嚢胞の悪化（発現頻度の増加や重症度の悪化）は認められていない。しかし、これらの毒性試験で用いた動物種及び系統の背景データでは腎嚢胞の発現頻度は非常に低く、Kraus らの論文で用いられた遺伝子改変マウスと比較することはできない。現在までにダプロデュスタットの臨床試験に参加した ADPKD を有する被験者はほとんどいないため、このような集団での腎機能に対する潜在的な影響に関するデータは限られている（2.5.5.4.8.1.）。

2.4.2.2.3.　　代謝物の薬理試験

ヒト血中代謝物に関する予備的な定量試験の結果、ダプロデュスタットはヒトで広く代謝されることが示されたことから、全体的なダプロデュスタットの薬理活性への代謝物の寄与について検討が必要と判断した。ダプロデュスタットの 6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）の薬理活性をダプロデュスタットと比較した。これらの代謝物の PHD に対

する活性、CP4H 及び FIH に対する選択性、並びに副次的薬理試験でのプロファイルはいずれもダプロデュスタットと類似していた（2.6.2.2.2.1.、2.6.2.2.2.2.、2.6.2.3.1.1.2.）。Hep3B 細胞株において、ダプロデュスタットは EPO 量を有意に増加させたが、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）では EPO 量の増加はみられなかった。これは、ダプロデュスタットと比較して代謝物は親水性が高く、細胞膜の透過性が低いことによるものと考えられる。マウスではダプロデュスタットの代謝物が産生されない又は産生される代謝物が限られており、また、代謝物の経口バイオアベイラビリティは非常に低い。そこで、3 種類の主なヒト代謝物（M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）、M13（GSK2531401））の混合液をマウスに 1 日 1 回 28 日間皮下投与したところ、血液学的パラメータに軽度（約 10%）の上昇がみられた（2.6.2.2.4.2.1.）。これらの成績から、ヒトでのダプロデュスタットの薬理活性にこれらの 3 種類の主なヒト代謝物が寄与している可能性が示唆される。

2.4.2.3.　副次的薬理試験

ダプロデュスタット

ダプロデュスタットの種々の受容体、酵素及びイオンチャネルに対する作用を評価した。ダプロデュスタット（最高 30 μM）は、50 種類を超える受容体結合、酵素及びイオンチャネルアッセイにおいて明らかな作用を示さなかった（2.6.2.3.1.1）。ダプロデュスタットの毒性試験でみられた胃に対する影響（2.6.6.8.2.2.1.）がシクロオキシゲナーゼ（COX）の阻害によるものであるかどうかについて検討するため、ラット全血を用いて COX に対する作用を評価した。非選択的 COX 阻害薬であるインドメタシンは COX1 及び COX2 に対して強力な阻害作用を示したが、ダプロデュスタットの阻害作用はインドメタシンと比較して 1/30 以下の強さであった（2.6.2.3.1.3.）。ラット全血アッセイにおけるダプロデュスタットの COX1 及び COX2 に対する 50%阻害濃度（IC50）はそれぞれ 65.9 μM 及び 100 μM 超であり、この濃度はダプロデュスタットの最高臨床用量を投与したときの定常状態における推定曝露量（Cmax：0.485 μg/mL、1.23 μM）の 53 倍以上の濃度に相当する。

代謝物

6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む、最高 200 μM）は、ダプロデュスタットと同様に、ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）を含む種々の分子に対していずれも明らかな作用を示さなかった（2.6.2.3.1.1.2.）。

2.4.2.4.　安全性薬理試験

ダプロデュスタットの主要臓器系（中枢及び末梢神経系、呼吸系並びに心血管系）に及ぼす影響及び意図しない薬理作用を示す可能性を評価するために、in vitro 及び in vivo 試験を実施した。また、急性低酸素応答時の心血管系パラメータに及ぼすダプロデュスタットの影響を評価する補足的試験を実施した。

ラットにダプロデュスタットの 20 mg/kg までを単回経口投与したときに、中枢及び末梢神経系並びに呼吸機能への影響はみられなかった（2.6.2.4.1.、2.6.2.4.2.）。ラットにダプロデュスタットの 20 mg/kg を経口投与したときの Cmax は 94.7 μg/mL であり（2.6.5.4.13.）、こ

の濃度は最高臨床用量を投与したときの定常状態における推定曝露量（Cmax：0.485 µg/mL）の約 195 倍に相当する。

In vitro 電気生理学的試験において、ダプロデュスタットはアッセイ緩衝液での最高溶解濃度である 47.66 µM（18.75 µg/mL に相当）で hERG テール電流を阻害しなかった。この濃度は最高臨床用量を投与したときの非結合型ダプロデュスタットの推定 Cmax（0.00485 µg/mL、ヒト血漿蛋白結合は 99%）の 3800 倍超に相当する。また、ダプロデュスタットはヒト電位依存性ナトリウムチャネル 1.5 サブタイプ（$hNa_v1.5$）に対してわずかに阻害作用を示し、その IC50 は 158 µM（62.16 µg/mL に相当）であった（2.6.2.4.3.1.）。

ウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本を用いたアッセイにおいて、ダプロデュスタットは 3～30 µM で軽度であるものの濃度依存的な QT 間隔及び T 波の頂点から終末までの時間（Tp-e）の延長作用（それぞれ最大 5.5 及び 5.6%）を示したが、100 µM では作用を示さなかった。また、100 µM で QRS 間隔のわずかな延長（9.1%）がみられ、3～30 µM で等尺性収縮力の上昇（最高 9.7%）がみられたが、100 µM までの濃度で torsades de pointes（TdP）の誘発はみられなかった（TdP スコア≦0）（2.6.2.4.3.2.）。

イヌの心血管系に関する試験において、ダプロデュスタットの 30 及び 90 mg/kg の単回経口投与により心拍数の軽度で一貫した上昇がみられた。この上昇は 30 mg/kg の投与約 14～24 時間後に最高で約 28%（20 回/分）及び 90 mg/kg の投与約 10～24 時間後に最高で約 33%（21 回/分）であった（2.6.2.4.3.3.2.）。イヌに 30 mg/kg を投与したときの Cmax は 6.64 µg/mL であり（2.6.5.4.23.）、この濃度は最高臨床用量を投与したときの定常状態における推定曝露量（Cmax：0.485 µg/mL）の約 14 倍に相当する。また、この作用は動脈圧の変化を伴わず、投与 72～76 時間後には回復し、3 mg/kg の投与では認められなかった。イヌにおいて心機能不全を誘発するには 3 週間にわたって持続する約 150 回/分の心拍数上昇が必要である[Wilson, 1987]ことから、本試験でみられた急性の心拍数変化は軽度と考えられる。90 mg/kg の単回経口投与において補正 QT（QTc）に対する影響はみられず、心電図（ECG）波形異常及び不整脈の誘発も認められなかった。イヌに 90 mg/kg を投与したときの Cmax は 12.7 µg/mL であり（2.6.5.4.23.）、この濃度は最高臨床用量を投与したときの定常状態における推定曝露量（Cmax：0.485 µg/mL）の約 26 倍に相当する。また、イヌの 13 週間（最高用量は雄 30 mg/kg/日、雌 15 mg/kg/日）並びにサルの 13 週間（最高用量 100 mg/kg/日）及び 39 週間（最高用量 50 mg/kg/日）の反復経口投与毒性試験において心拍数及び ECG 波形に影響はみられなかった（2.6.6.3.5.、2.6.6.3.7.）。サルの 39 週間試験での Cmax は 2.58 µg/mL であり（2.6.6.9.）、この濃度は最高臨床用量を投与したときの定常状態における推定曝露量（Cmax：0.485 µg/mL）の約 5 倍に相当する。これらの成績から、ダプロデュスタットの臨床使用において心血管系機能に影響を及ぼす可能性はわずかであると考えられる。

HIF の分解が低下するような自然突然変異を有する肺動脈性肺高血圧症患者での知見によって、HIF 応答性の経路が肺動脈性肺高血圧の病態生理に関与することが示唆されている[Formenti, 2011; Smith, 2006]。ダプロデュスタットの長期反復投与毒性試験では、肺高血圧を示唆する組織学的変化（肺血管の中膜肥厚等）は認められなかったが、急性低酸素応答時

のラットの心血管系パラメータに及ぼすダプロデュスタットの影響を評価する補足的試験を実施した。

ラットに 10 及び 30 mg/kg/日のダプロデュスタットを 1 日 1 回 5 日間反復経口投与した。これらの用量は、ラットで肝臓 EPO mRNA 量を用量依存的に増加させたことから、薬理作用を示す用量であることが確認されている。ダプロデュスタットは急性低酸素曝露による心拍数又は平均動脈圧の変化に対して影響を示さず、薬理作用によって末梢血の赤血球パラメータを上昇させた（媒体と比較して 30 mg/kg/日で Hb 及び Hct が 6～7%上昇）（2.6.2.4.3.3.1.）。急性低酸素曝露時の右室収縮期圧（PRVP）の上昇に対して、10 及び 30 mg/kg/日（3.8～5.0 mmHg 上昇）では媒体（2.3 mmHg 上昇）と比較していずれもわずかな上昇がみられた。しかし、急性低酸素曝露によるダプロデュスタット群の PRVP の上昇は、媒体群の PRVP の上昇範囲内の変化であった（2.6.2.4.3.3.1.）。

健康成人にダプロデュスタットの 5 又は 100 mg を 1 日 1 回 5 日間投与しても、正常酸素又は低酸素状態での肺動脈収縮期圧に対する影響は認められなかった（2.5.5.4.5.2.4.）。腎性貧血を有する CKD 患者に最高 25 mg を 24 週間投与した試験で実施された心エコー検査の評価において、肺動脈性肺高血圧はダプロデュスタットの安全性に関する懸念事項として特定されていない（2.5.5.4.5.2.4.）。ヒト QTc 評価試験において、治療域を超えるダプロデュスタットの 75 及び 500 mg を単回投与したときに、いずれの用量においても心拍数の平均変化量は増加した（2.7.2.2.2.3.2.）。75 及び 500 mg の投与による心拍数の増加は、最大でそれぞれ約 6 及び 17 拍/分であり、いずれの用量でも投与 8 時間後にみられた。モキシフロキサシンの投与では、心拍数の増加は最大で投与 1 時間後に約 4 拍/分であり、投与 8 時間後の増加は約 3 拍/分であった。

2.4.2.5.　薬力学的薬物相互作用試験

ダプロデュスタットと併用する可能性のある薬剤との相互作用を検討する非臨床薬理試験は実施していない。ダプロデュスタットは種々の in vitro アッセイにおいて PHD1～3 に対する強力で選択的な阻害薬であることが示されており（2.4.2.2.1.）、副次的薬理試験での 50 種類を超える受容体及びイオンチャネルアッセイにおいて明らかな結合性を示さなかった（2.4.2.3.）。これらのことから、ダプロデュスタットが併用薬と薬力学的薬物相互作用を示す可能性は低いと考えられる。

2.4.3.　薬物動態

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルに経口又は静脈内投与したとき、又はヒト生体試料を用いて、ダプロデュスタットの薬物動態試験を実施した。In vitro では、血漿蛋白結合率、血球移行性、膜透過性、トランスポーターを介した輸送及び阻害作用、CYP による代謝及び代謝酵素の誘導・阻害作用を検討した。In vivo では、臨床投与経路である経口投与及び静脈内投与し、薬物動態（PK）及びバイオアベイラビリティ（F）を評価した。ダプロデュスタットのヒトでの 6 種の主な代謝物（立体異性体を含む）を用いた試験も実施した。これらの試験成績は 2.6.4.及び 2.6.5.に記載した。ダプロデュスタットの 6 種のヒトでの主な代謝物（立体異性体を含む）の構造を 2.6.4.1.2.に示す。また、推定代謝経路を 2.6.5.12.1.に示

す。PK 試験では毒性試験で用いた動物種及び系統（CD-1 マウス、Sprague Dawley 及び Long Evans ラット、Dutch Belted ウサギ、ビーグル犬及びカニクイザル）を用いた。

ウサギ及びサルにダプロデュスタットを投与したときの代謝プロファイルは、ヒトと同様であることから、代謝物の安全性評価を行う上で、ウサギ及びサルは適切な動物種であると考えられた。また、マウス及びラットでは、ヒトでの 3 種の主な代謝物［M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）］が十分量生成されないため、マウス及びラットに皮下投与し、安全性を評価した。ダプロデュスタットの PK の結果から、ダプロデュスタットの安全性評価においてマウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルが適した動物種であることが示された。

2.4.3.1.　分析方法

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルの血漿中未変化体は、蛋白質沈殿法（必要に応じて固相抽出）で試料を前処理した後、主に LC-MS/MS 法を用いて定量した。生体試料中の未変化体濃度は、既知濃度のダプロデュスタットを添加した試料より得られた検量線を用いた。各分析法の妥当性は、真度、精度、直線性、範囲及び定量限界の評価により確認した。

ダプロデュスタットの安全性試験では、マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルの血漿中（20、25 又は 50 µL）の未変化体濃度の定量に、十分な真度及び精度を有するバリデートされた分析法を用いた。測定法は 50～50000 ng/mL の濃度範囲でバリデートされた。

同様の真度及び精度で、ヒト血漿及び尿中（50 µL）の未変化体を 1～1000 ng/mL の濃度範囲で、更にヒト血漿中（100 µL）の未変化体を 0.100～100 ng/mL の濃度範囲で測定可能な分析法を開発した。

また、マウス及びサル血漿中（50 µL）の M2、M3、M4、M5、M6 及び M13（ヒトでの主な代謝物）の定量のため、1～1000 ng/mL の濃度範囲でバリデートされた LC-MS/MS 測定法を開発した。これらの方法はアキラルな測定法であるため、マウス及びサル血漿中に存在する代謝物の立体異性体については検討できない。また、ヒト血漿中（50 µL）での主な 6 種の代謝物を定量するため、1～1000 ng/mL の濃度範囲でバリデートされた LC-MS/MS 測定法も開発した。

ヒトでの 6 種の主な代謝物のうち、M2（GSK2391220）を除き、M3、M4、M5、M6 及び M13 はキラル中心を持つことから複数の立体異性体が存在すると考えられた。そのため、PHX111427 試験（2012N137995）のヒト尿及び PPO116097 試験（2012N221116）のヒト血漿のキラル分析を行い、M3、M4、M5、M6 及び M13 の主な立体異性体を特定した。その結果、主な立体異性体は、M3 では GSK2506104、M4 では GSK2487818、M5 では GSK2506102、M6 では GSK2531398 及び M13 では GSK2531401 であることが示された。これらの主な立体異性体は、その後の生体試料分析法（アキラル HPLC）の開発及びバリデーションで使用されたが、キラル分析は立体異性体の純物質が使用可能になった後に導入されたため、マウス、サル及びヒトのアキラル分析の開発では標準物質として使用した立体異性体とは一致していない。しかしながら、アキラルの生体試料分析法の開発及びバリデートにおいては、十分なブリッジング試験が実施され、1 つの代謝物の標準物質に対して複数の立

体異性体の標準物質を用いた場合に同等の真度、感度及び特異性が得られている。測定法の手法及びバリデーションの概要を 2.6.4.の Appendix 1 に示す。

[14C]ダプロデュスタット（[14C]標識体）投与後の生体試料中の放射能の測定は、液体シンチレーションカウンター又は定量的全身オートラジオグラフィーで行った。代謝物のプロファイリング及び同定は、放射能及び UV 検出器付き HPLC、放射能検出器付き LC-MS、APCI/LC-MS、LC-MS/MS 及び NMR を用いた。

PK 及びトキシコキネティクス（TK）はノンコンパートメント法で解析した。

2.4.3.2.　吸収

2.4.3.2.1.　単回投与

マウス、ラット、イヌ及びサルに単回静脈内投与した薬物動態試験において、ダプロデュスタットのクリアランス（CL）は低く、定常状態での分布容積（Vss）は 0.3～0.8 L/kg と総体液量よりも低く（イヌでは同程度）、$t_{1/2}$ はそれぞれ 33.5、6.6 及び 1.9 時間であった（2.6.4.2.1.）。

マウス、ラット、イヌ及びサルに単回経口投与したときのダプロデュスタットの吸収は速やかで、t_{max} は概して投与後 1～4 時間に認められた。ダプロデュスタット（溶液）を経口投与したときの F はマウス及びラットで高く（それぞれ 88%及び 100%）、イヌ及びサルでは中程度（それぞれ 46%及び 34%）であった。イヌにダプロデュスタット（懸濁液）を経口投与したときの F は、溶液よりも概ね低く、ダプロデュスタットの溶解性が低いことによると考えられた（2.6.4.2.1.）。雄の胆管カニューレ処置した（BDC）ラット、BDC イヌ及び BDC サルに[14C]標識体（懸濁液）を経口投与したときの胆汁及び尿中排泄率より、それぞれ少なくとも 49%、8%及び 69%が吸収されたと考えられた（2.6.4.5.）。

マウス及びラットにヒト主代謝物の一つである M13（GSK2531401）を単回静脈内投与したときの CL は低く、Vss は小さく（0.4～0.8 L/kg）、$t_{1/2}$ は 0.9～4.6 時間であった（2.6.4.2.1.）。マウス及びラットに M13 を経口投与したときの M13 の吸収は速やかで、t_{max} は約 0.5 時間であった。ラットでの M13 の F は低く（1%未満）、M13 の溶解性が極めて低いことによると考えられた。また、マウスにヒト主代謝物である M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）を含むカクテルを単回皮下投与したとき、これら 3 種の代謝物の Cmax 及び AUC0-2 はいずれも同程度であった（2.6.4.2.1.）。

2.4.3.2.2.　反復投与

2.4.3.2.2.1.　静脈内投与

雄ラットを用いた 14 日間反復静脈内投与試験において、ダプロデュスタットの曝露量（Cmax 及び AUC0-t）は用量増加の割合を下回って増加した。投与 1 日目及び 14 日目の曝露量に明らかな差はなかった（2.6.4.2.2.）。

2.4.3.2.2.2.　経口投与

マウスに最長 26 週間、ラットに最長 2 年間、妊娠ウサギに最長 13 日間、イヌに最長 13 週間、及びサルに最長 39 週間反復経口投与した毒性試験で、血漿中ダプロデュスタットの TK を検討した（2.6.4.2.2.）。また、いくつかの試験ではヒトでの主な代謝物を皮下に併用投与した。反復経口投与毒性試験で得られたダプロデュスタットの曝露量の比較を表 2.4.4.4-2 に示す。

ダプロデュスタットをサル（39 週間）及び妊娠ウサギ（妊娠 7～11 日目に投与）に反復経口投与したときの、あるいは代謝物をマウス（26 週間）及び妊娠ラット（妊娠 9 日目に投与）に反復皮下投与したときの、3 種のヒトでの主な代謝物（M2、M3 及び M13）の曝露量の比較を表 2.4.4.4-3 に示す。

マウス、ラット、ウサギ及びイヌでのダプロデュスタットの曝露量（Cmax 及び AUC0-t）は概して投与量増加の割合を下回って増加した（2.6.4.2.2.）。サルの Cmax は、概して投与量増加の割合を下回って増加したが、AUC0-t は概して投与量増加の割合に伴って増加した。また、マウス、ラット、イヌ及びサルで明らかな性差は認められなかった。更に、いずれの動物種においても投与 1 日目及び投与最終日の曝露量に明らかな差はなかった。

サルの 13 週間及び 39 週間反復投与毒性試験で、6 種の代謝物（M2、M3、M4、M5、M6 及び M13）の曝露量は、ダプロデュスタットと同様に投与量増加の割合を下回って増加し、明らかな性差はなく、投与 1 日目及び投与最終日の間で明らかな差はなかった。マウス 13 週間反復投与試験では、1 例のマウスで M2 のみが 1 採血時点（投与後 1 時間）で定量可能であった（2.6.4.2.2.）。

ラットにダプロデュスタットの 30 mg/kg/日を 5 日間反復経口投与しときのダプロデュスタット、6 種のヒトでの主な代謝物（M2、M3、M4、M5、M6 及び M13）及び微量の代謝物（M8、M9/M22 及び M10）の曝露量を投与 5 日目に測定した。ダプロデュスタット及び M2、M8、M9/M22 及び M10 の血漿中濃度は、採血期間である投与後 24 時間にわたって定量されたが、代謝物の曝露量はダプロデュスタットの 0.03%未満と極めて低く、その他の代謝物（M3、M4、M5、M6 及び M13）はいずれも定量されなかった（2.6.4.2.2.）。

2.4.3.2.2.3.　代謝物の曝露量

雌雄マウスにダプロデュスタットの 6 及び 20 mg/kg/日を経口投与するとともに、ヒト血漿中主代謝物である M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）のカクテル（それぞれ 2.0、2.5 及び 1.3 mg/kg/日）を 13 週間併用皮下投与した。概して、ダプロデュスタットあるいは代謝物の曝露量（Cmax 及び AUC0-t）に、性差あるいは投与 1 日目及び 4 週目の間で明らかな差はみられなかった（2.6.4.2.2.）。マウスに M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）を投与したときの血漿中には投与した代謝物の立体異性体のみが検出され、投与した代謝物とは異なる立体異性体［M3（GSK2531403）及び M13（GSK2531400）］はみられなかったことから、これらは生体内で立体異性体への変換はないことが示された（2.6.4.4.2.）。

妊娠ラットにダプロデュスタット及び代謝物カクテル［M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）］を妊娠 9 日目～授乳 21 日目に投与した出生前

及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験において、母動物のダプロデュスタットの曝露量（Cmax 及び AUC0-t）は、投与量増加の割合を下回って増加し、ダプロデュスタット及び代謝物（M2、M3 及び M13）の曝露量（Cmax 及び AUC0-t）は、妊娠 9 日目及び授乳 21 日目で同程度であった。M2、M3 及び M13 の曝露量（Cmax 及び AUC0-t）は、併用したダプロデュスタットの投与量に関わらず同様であった（2.6.4.2.2.）。出生後 10 日目の出生児の血漿中には、ダプロデュスタット、M2、M3 及び M13 が定量された（2.6.4.5.5.）。

2.4.3.3.　分布

2.4.3.3.1.　In vitro

2.4.3.3.1.1.　ダプロデュスタットの血漿蛋白結合及び血球移行性

マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルでのダプロデュスタットの血漿蛋白結合率は 93.6%以上、ヒトでは 99%超といずれも高かった。ダプロデュスタットのヒト血清アルブミン（HSA）との結合率は 99%超と高かったが、α1-酸性糖蛋白質（AAG）との結合率は 20%未満と低かった（2.6.4.3.1.1.）。また、健康成人及び CKD 患者でのダプロデュスタットの血漿蛋白結合率も 99%以上と高いことが確認された（2.7.2.2.1.2.3.2.及び 2.7.2.2.1.2.3.3.）。

In vitro での動物及びヒトでのダプロデュスタットの血液／血漿比はそれぞれ 0.45～1.64 及び 0.75～1.23 と、ダプロデュスタットの血球移行は概してわずかであった（2.6.4.3.1.2.）。また、ラット及びイヌに[14C]標識体を投与したときの ex vivo での放射能の血液／血漿比は低く（0.51～0.87）、放射能と血球との結合が低いことが示された（2.6.4.3.2.2.及び 2.6.4.3.2.3.）。

2.4.3.3.1.2.　代謝物のヒト血漿蛋白結合率

6 種のヒトでの主な代謝物（立体異性体を含む）のヒト血漿蛋白結合率を検討した結果、M2（GSK2931220）、M3（GSK2506104 及び GSK2531403）、M6（GSK2531398）及び M13（GSK2531401 及び GSK2531400）の結合率は 34%未満と低かった。一方、GSK2499166（M4 の主ではない立体異性体）及び GSK2531399（M5 の主ではない立体異性体）の血漿蛋白結合率は 68%～98%と中程度～高かった（2.6.4.3.1.1.）。更に、健康成人及びステージ 3、4 及び 5 の CKD 患者における GSK2487818（M4 の主な立体異性体）及び GSK2506102（M5 の主な立体異性体）の血漿蛋白結合率を ex vivo で検討した。腎機能低下者での M4 及び M5 の投与 3 時間後の血漿蛋白結合率は、腎機能正常者（約 45 及び 55%）よりも低く、それぞれ約 31～41%及び約 34～50%であった（2.7.2.2.1.2.3.2.）。

2.4.3.3.1.3.　膜透過性

ヒト P 糖蛋白質（P-gp）を発現した MDCKII-MDR1 細胞を用いて検討したとき、[14C]標識体の受動膜透過性は中程度であり、人工腸液（FaSSIF）存在下の吸収条件での膜透過性は高かった（2.6.4.3.1.4.）。

なお、P-gp を含む、各種トランスポーターの試験成績については 2.4.3.6.に記載する。

2.4.3.3.2.　In vivo

2.4.3.3.2.1.　ダプロデュスタットの組織内分布

雄の有色ラットに[14C]標識体を単回経口投与したときの放射能は、速やかに広く組織分布した。ほとんどの組織内放射能は血液中放射能よりも低く、ダプロデュスタットの分布容積が小さいことと一致した。脳内放射能は血液中放射能の約 2%と、脳への移行はわずかであった。放射能は、ほとんどの組織の投与 1 時間後に最も高く、投与 7 日目までに定量限界未満となった。眼球及び皮膚のメラニン含有組織への放射能の結合はみられなかった（2.6.4.3.2.2.2.）。

2.4.3.3.2.2.　ダプロデュスタット及び M13（GSK2531401）の腎臓への分布

雄マウスにダプロデュスタットの 20 mg/kg 又は M13（GSK2531401）の 40 又は 100 mg/kg を静脈内投与したときの腎臓内ダプロデュスタット濃度は M13 の 15～500 倍であった（2.6.4.3.2.1.1.）。これは、マウスでのダプロデュスタットの血漿蛋白結合率が M13 よりも高く、CL が低かったことによると考えられる。

2.4.3.4.　代謝

2.4.3.4.1.　ダプロデュスタットの代謝

ヒト肝細胞を用いた in vitro 試験で、ダプロデュスタットはシクロヘキシル環が酸化された一酸化体及び二酸化体に代謝された。ヒト肝細胞でみられた代謝物は、ウサギ及びサルの肝細胞においても検出された（2.6.4.4.1.1.5.）。マウス、ラット及びハムスターの肝細胞は、一酸化体のみを生成した。イヌ肝細胞では代謝物は検出されなかった（2.6.4.4.1.1.5.～2.6.4.4.1.1.7.）。また、細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ試験で用いた試験条件下で、[14C]標識体をアロクロール 1254 で誘導させたラット肝臓の S9 画分とインキュベートしたときも代謝物は検出されなかった（2.6.4.4.1.1.3.）。

健康成人に[14C]標識体を単回経口投与したとき、血漿中放射能の主な成分は未変化体であった（血漿中放射能の約 40%）。その他に M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）は、血漿中放射能の 7.6%～8.3%と多く、次いで M4（GSK2487818）、M5（GSK2506102、M14 と co-elute）及び M6（GSK2531398）が 3.6%～5.7%であり、その他に M15 及び M33 等が認められた。尿糞中には未変化体は検出されないか、極めてわずかしか検出されなかった（2.6.4.4.3.6.2.）。

また、健康成人に[14C]標識体を静脈内投与したときの胆汁中の代謝物は、経口投与後の糞中の代謝物と同様であった。このことから、ダプロデュスタットを経口投与したとき、大部分が吸収され、主に酸化的代謝により体内から消失し、肝胆道系及び尿中排泄経路を介して排泄されると考えられた。

PHX111427 試験のヒト尿をキラル分析した結果、M2（GSK2391220）を除き、キラル中心を持つ M3、M4 及び M13 は単一な立体異性体として存在していた。すなわち、M3 は GSK2506104、M4 は GSK2487818、M13 は GSK2531401 であった。また、M5 及び M6 は一対の立体異性体が検出されたが、M5 は主に GSK2506102 で、M6 は主に GSK2531398 であ

った（表 2.4.3.4-1 及び 2.6.4.1.）。更に、PPO116097 試験のヒト血漿を用いて実施した M3 及び M13 のキラル分析の結果、ヒト血漿中の M3 及び M13 の主な立体異性体はそれぞれ GSK2506104 及び GSK2531401 であった。

CKD 患者（PHI115573 試験及び 200942 試験）の血漿中の主な成分もダプロデュスタットであった。また、血漿中の 3 種の代謝物（M2、M3 及び M13）はそれぞれ総薬物関連物質の 10%超で、その他の 3 種の代謝物（M4、M5 及び M6）は 10%を下回っていた（表 2.4.3.4-1、2.7.2.2.1.2.3.2.及び 2.7.2.2.1.2.3.3.）。また、サル及びウサギの血漿中には、これら 6 種のヒトでの主な代謝物が存在した。

ラット及びイヌに[14C]標識体を単回経口投与したとき、血漿中には未変化体のみが検出された（2.6.4.4.3.2.及び 2.6.4.4.3.4.）。ラットの胆汁及び糞中では代謝物が主な成分であり、イヌの尿、胆汁及び糞中では未変化体が主な成分であった。

サルに[14C]標識体を単回経口投与したとき、血漿中では未変化体が血漿中放射能の 47%超であり、主な成分であった（2.6.4.4.3.5.）。次いで、主な成分はグルクロン酸抱合体であった（20%超）。その他に一酸化体及び二酸化体が、それぞれ 5%未満であった。サルの胆汁及び糞中では未変化体が主な成分であり、数種のグルクロン酸抱合体及び酸化代謝物が低濃度で検出された。

表 2.4.3.4-1　ヒトでの主な 6 種の代謝物（立体異性体を含む）を評価した試験一覧

Metabolite number	GSK compound number	Percent DRM (P+6M's) in human plasma of CKD patients at Steady State (Study 200942 and PHI115573) [Report 2017N338206 and 2012N157420][a]	Percent DRM (total radioactivity) in circulation in human plasma (Study 200232) [Report 2018N376203][a]	Relative Abundance of each enantiomer of metabolite M3 and M13 in circulation in human plasma (Study PPO116097) [Report 2014N221116][b]	Approximate relative abundance of each stereoisomeric form in human urine (Study PHX111427) [Report2012N137995][b]	Nonclinical species demonstrating metabolites in circulation via endogenous productiona				
						Ms	Rt	Rb	D	Mo
Daprodustat	GSK1278863	16.0 to 39.4%	39.5 %	NA	NA	Y	Y	Y	Y	Y
M2	GSK2391220	14.8 to 19.3%	8.1 %	NA	100 % of M2 (Achiral)	Nc	Nc	Y	N	Y
M3	GSK2506104	18.4 to 25.1%	7.6 %	~94% of M3	100 % of M3	Nc	Nc	Y	N	Y
	GSK2531403			~6% of M3	0 % of M3 (not detectable)					
M4	GSK2487818	6.2 to 6.8%	5.7 %	NA	99 % of M4	N	N	Y	N	Y
	GSK2499166			NA	1 % of M4					
M5	GSK2506102	5.1 to 6.8%	<4.5 %	NA	79 % of M5	N	N	Y	N	Y
	GSK2531399			NA	20.5 % of M5					
M6	GSK2531398	5.6 to 7.1%	3.6 %	NA	89 % of M6	N	N	Y	N	Y
	GSK2531407			NA	10 % of M6					
M13	GSK2531400	12.9 to 20.7%	8.3 %	NQ	0 % of M13 (not detectable)	Nc	Nc	Y	N	Y
	GSK2531401			100% of M13	100 % of M13					

Key:
a = Methods used did not discriminate between chiral metabolites. b = Chiral methods where used for detection.
c = Mice and rats produced no or very limited metabolites M2, M3 and M13. Thus for several key studies, the relevant stereoisomeric forms for M2, M3 and M13 were administered SC with or without oral co-administration of daprodustat.
D = Dog; DRM = Drug-related material; M3, M4, M5, M6 and M13 = Stereoisomeric forms of chiral metabolites of daprodustat; M2 = Achiral metabolite of daprodustat;
Ms = Mouse; Mo = Monkey; N = Species did not sufficiently produce metabolite for metabolite qualification; NA = Not Appricable; NQ = Non-quantifiable; Rb = Rabbit; Rt =Rat; Y = Species produce sufficient metabolite for metabolite quantitation and qualification,
Note: The six predominant circulating human metabolites of daprodustat are M2, M3, M4, M5, M6 and M13.　Of these, M2, M3 and M13 are major (>10% DRM). The predominant stereoisomeric form of the human circulating metabolites that are chiral are separately shown.
Note: Systemic exposure of nonclinical species to the relevant stereoisomeric forms of the major metabolites, see Table 2.4.4.4-3

2.4.3.4.2.　反応性代謝物の生成

ヒト肝ミクロソームを[14C]標識体及びNADPHとインキュベートしたとき、ダプロデュスタットの反応性代謝物が生成される可能性は極めて低いことが示された（2.6.4.4.1.1.10.）。

2.4.3.4.3.　ダプロデュスタットのCYP誘導及び阻害

CYPの誘導及び阻害に関する試験成績については2.4.3.6.に記載する。

2.4.3.5.　排泄

未処置の雌雄ラット、イヌ及びサル並びに雄のBDCラット、BDCイヌ及びBDCサルに[14C]標識体を単回経口投与したときの排泄試験の結果、主な排泄経路は糞を介することが示され、尿中排泄はわずかであった。ラット、イヌ及びサルの胆汁中には、それぞれ投与量の約42、8及び53%が排泄され、胆汁及び尿中排泄率から少なくとも49、8及び69%が吸収されたと考えられた（2.6.4.5.）。

2.4.3.6.　薬物動態学的薬物相互作用

ダプロデュスタット及びヒトでの主な代謝物であるM2（GSK2391220）、M3（GSK2506104）、M4（GSK2487818）、M5（GSK2506102）、M6（GSK2531398）及びM13（GSK2531401）がCYP又はトランスポーターの基質となる、又は阻害する可能性についてin vitro試験で評価した。また、ダプロデュスタットによるCYP誘導についてもin vitroで評価した。これらの結果から、臨床で薬物動態学的薬物相互作用が起こる可能性を検討した。

2.4.3.6.1.　ダプロデュスタットの曝露量に及ぼす影響（被相互作用薬の可能性）

ヒト肝ミクロソーム及びCYP発現系を用いて、ダプロデュスタットの酸化的代謝に関与するCYPをin vitroで検討した結果、ダプロデュスタットの酸化的代謝にはCYP2C8が95%寄与し、CYP3A4の寄与は5%とわずかであることが示された（2.6.4.4.1.1.9.）。ダプロデュスタットをCYP2C8阻害薬又は誘導薬と併用した場合に薬物相互作用が起こる可能性が考えられた。ダプロデュスタットとCYP2C8阻害剤であるgemfibrozil又はトリメトプリムとの臨床薬物相互作用試験で、ダプロデュスタットの曝露量が増加することが示された（2.7.2.3.4.1.）。

排出トランスポーターであるP-gp及びBCRPとの相互作用の可能性をin vitroで検討した結果、ダプロデュスタットはP-gpの基質ではなかったが、BCRPの基質であった（2.6.4.3.1.4.2.及び2.6.4.3.1.6.2.）。そのため、BCRPの強力な阻害薬と併用した場合、臨床において薬物相互作用が起こる可能性が考えられたが、母集団薬物動態解析により、BCRP阻害剤はダプロデュスタットの薬物動態に影響を与えないと考えられた（2.7.2.3.1.2.1.）。

ダプロデュスタットはin vitroにおいて代謝酵素（CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19あるいはCYP2D6）又はトランスポーター（P-gp、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1及びMATE2-K）の基質ではなかった（2.6.4.3.1.及び2.6.4.4.1.1.9.）。

また、ダプロデュスタットと同様に M4、M5 及び M6 は、腎トランスポーターである OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 あるいは MATE2-K の基質ではなかった（2.6.4.3.1.10.1.）。M3 及び M13 は OAT3 の基質であり、M2 は OAT1 及び OAT3 の弱い基質であった。ヒトでの M2、M3 及び M13 の腎クリアランス（PHI115573 試験）は、血漿蛋白非結合率で補正した糸球体ろ過率（fu*GFR）よりも低かったことから、これらトランスポーターを介した尿細管分泌はわずかであると考えられ、腎トランスポーターを介した薬物相互作用の可能性は低いと考えられた。

2.4.3.6.2.　　併用薬の曝露量に及ぼす影響（相互作用薬の可能性）

ダプロデュスタットは in vitro において、CYP2C8、OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害し、その IC50 は臨床推定用量での血漿中ダプロデュスタット濃度よりも高かった（2.6.4.4.1.2.3. 及び 2.6.4.3.1.9.）。CYP2C8 の基質であるピオグリタゾン又は OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるロスバスタチンとの臨床薬物相互作用試験の結果、ピオグリタゾン又はロスバスタチンの曝露量に影響を及ぼさなかった（2.7.2.2.1.3.2.）。ダプロデュスタットは in vitro において CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 あるいは CYP3A4、又は P-gp、BCRP、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 あるいは MATE2-K の阻害薬ではなかった。更に、CYP1A2、CYP2B6 あるいは CYP3A4 を誘導しなかった（2.6.4.4.1.）。

M2、M3、M4、M5、M6 及び M13 は in vitro において CYP1A2、CYP2B6（M3 のみ）、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 あるいは CYP3A4、又は OATP1B1、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 あるいは MATE2-K の阻害薬ではなかった（2.6.4.4.1）。これらの代謝物の P-gp 及び BCRP の阻害作用は検討していないが、これらの代謝物は主に肝の CYP2C8 によって生成されること、P-gp 及び BCRP は主に腸管での吸収に関連していることから、薬物相互作用の可能性は低いと考えられる。

2.4.4.　　毒性試験

2.4.4.1.　　毒性試験パッケージ

ダプロデュスタットを CKD に伴う貧血治療薬として開発するため、毒性試験を実施した。一般毒性については、ダプロデュスタットの経口投与による、マウス、ラット、イヌ及びサルの単回投与試験、マウス、ラット、イヌ及びサルのそれぞれ最長 13、26、13 及び 39 週間反復投与試験を実施した。また、マウスを用いて、ダプロデュスタットのヒト代謝物の最長 7 日間の静脈内及び皮下投与試験、並びに最長 13 週間のダプロデュスタット（経口投与）及び代謝物（皮下投与）併用投与試験を実施した。遺伝毒性については、ダプロデュスタット及びヒト代謝物を用いた in vitro 及び in vivo 試験、がん原性については、マウス（ヒト代謝物の皮下併用投与を含む）及びラットの 2 年間投与試験を実施した。生殖発生毒性については、ラット雄受胎能に関する試験、ラット雌受胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギ胚・胎児発生に関する試験、ラット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（ヒト代謝物を皮下併用投与）をそれぞれ実施した。代謝物は混合液として投与し、動物における曝露量（AUC）はヒト推定最大曝露量の 1.04～1.54 倍以上となった。その他の試験として、溶血性試験、局所刺激性試験、並びにラットの 14 日間静脈内投与試験

（胃に対する影響に関する探索試験）及び 14 日間経口投与試験（血漿グルコース濃度に関する探索試験）を実施した。

各毒性試験の概要を 2.6.6.、概要表を 2.6.7.にそれぞれ示す。全ての毒性試験報告書は 4.2.に含まれている。

2.4.4.2.　　動物種の選択

初期の毒性試験では、ダプロデュスタットに対して薬理作用を示すこと、医薬品の非臨床評価に用いられる一般的な動物種であることから、ラット及びイヌを用いた。しかしながら、その後、開発中に特定されたヒト代謝物［M2（GSK2391220）、M3（GSK2506104 及び GSK2531403）、M4（GSK2487818）、M5（GSK2531399 及び GSK2506102）、M6（GSK2531398 及び GSK2531407）並びに M13（GSK2531401）］については、ラット及びイヌではほとんど生成されず、ウサギ及びサルで生成されることが明らかとなった。このため、非げっ歯類の長期反復投与試験では、イヌではなく、ヒトと代謝が類似していたサルを用いた。また、同様の理由で、代謝物の胚・胎児発生に関する影響評価には、主にウサギの試験結果を用いた。これらの動物種間（マウス、ラット、イヌ及びサル）では代謝物プロファイルが異なるにもかかわらず、反復投与試験における毒性プロファイルは類似しており、ダプロデュスタットの薬理作用に基づく変化が一貫してみられた。また、マウスのダプロデュスタット単独投与による 13 週間投与試験とダプロデュスタット及び 3 種のヒト代謝物の併用投与（M2、M3 及び M13）による 13 週間投与試験において、毒性プロファイルに明確な差は認められなかった。これらのことから、ヒト代謝物（M2、M3 及び M13）がダプロデュスタットと異なる毒性を示す可能性は低いと考えられた。

2.4.4.3.　　急性毒性

急性毒性は雌マウス、ラット、イヌ及びサルの単回経口投与試験に基づき評価した（2.6.6.2.）。マウス及びラットにダプロデュスタットを単回経口投与した結果、1500 mg/kg 以上の投与により半数以上の動物で死亡又は一般状態の悪化（活動低下、接触時冷感、皮膚弾性低下、被毛粗剛、糞便異常又は体重減少）による安楽死が認められたため、最小致死量は 1000～1500 mg/kg と推定された。イヌ及びサルにダプロデュスタットを単回経口投与した結果、摂餌量の低値、体重減少、糞便異常（イヌ 20 mg/kg 以上、サル 100 mg/kg 以上）、並びに嘔吐の頻度及び程度の増大（イヌ 120 mg/kg 以上、サル 300 mg/kg 以上）がみられ、それぞれ 180 及び 600 mg/kg の投与では忍容性が認められなかった。イヌ及びサルの単回経口投与時の最大耐量はそれぞれ 120 及び 300 mg/kg と推定された。

2.4.4.4.　　反復投与毒性

ダプロデュスタットを用いて、マウス、ラット、イヌ及びサルのそれぞれ最長 13、26、13 及び 39 週間反復投与試験を実施した（2.6.6.3.）。また、マウス及びラットの 2 年間がん原性試験でみられた非腫瘍性病変についても、反復投与毒性の評価に用いた。各試験におけるダプロデュスタット及びヒト代謝物の曝露量をそれぞれ表 2.4.4.4-2 及び表 2.4.4.4-3 に示す。

2.4.4.4.1.　　薬理作用に基づく造血亢進及びそれに伴う臨床病理学的変化

ダプロデュスタットの薬理作用に基づく脾臓及び肝臓の髄外造血の亢進並びに骨髄の赤芽球過形成がみられ、これらの変化は用量依存的な赤血球パラメータ［赤血球数（RBC）、Hb、Hct］及び網状赤血球数の増加並びに血清鉄パラメータ［鉄、総鉄結合能（TIBC）及び不飽和鉄結合能（UIBC）］の変化を伴った。持続的な赤血球造血の亢進は多血症、並びにそれに続く多臓器病変及び低酸素に関連した一般状態変化を引き起こした（2.4.4.4.3.）。ラット 26 週間投与試験及びサル 39 週間投与試験における Hb 及び Hct（平均値）を表 2.4.4.4-1 に示す。また、サル 39 週間投与試験における Hb（雌雄合算平均値）と CKD 患者の目標 Hb 値の比較を図 2.4.4.4-1 に示す。サルで認められた Hb の値及び上昇速度は、CKD 患者の Hb 目標範囲及び Hb 上昇速度（投与 4 週時の Hb 値のベースラインからの平均変化量：< 2 g/dL）（2.5.4.）よりも十分に大きかった。

臨床病理パラメータについては、複数の試験及び動物種で血小板数の低値、血清又は血漿グルコースの低値並びに総ビリルビンの高値がみられ、これらの変化は赤血球造血の著しい亢進がみられた用量で認められた。血小板数の低値は循環赤血球量の増加及び相対的な血漿量の減少による見かけ上の変化[Shibata, 2003]、又は血栓形成による消費増加に関連する可能性が考えられた。グルコースの低値は赤血球量の増加に伴うグルコース消費の増加による変化と考えられた[Magnani, 1983]。総ビリルビンの高値は赤血球回転の亢進に伴う変化と考えられた。

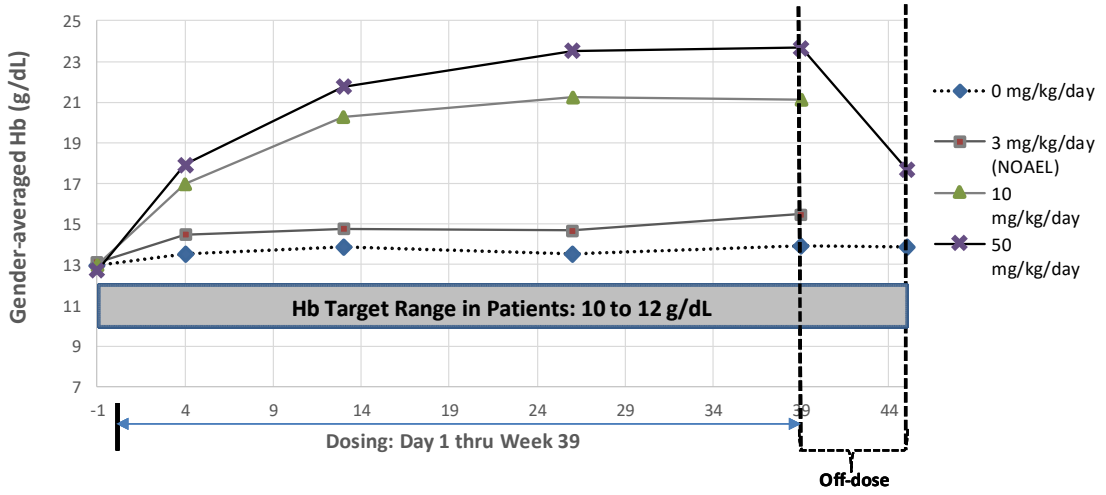
その他にも、リンパ球数、好中球数、鉄パラメータ（鉄、TIBC 及び UIBC）、血清トリグリセリド、コレステロール、尿素、クレアチニン及びアルカリホスファターゼ（ALP）に変化がみられたが、これらは rhEPO の非臨床試験でも認められていることから[FDA, 2012; Serabian, 2003; Woodburn, 2008]、ダプロデュスタットの薬理作用（赤血球造血の亢進）による二次的変化であり、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

上記のダプロデュスタットに関連する臨床病理学的変化は、休薬によって概して回復性又は回復傾向を示した（2.6.6.3.3.1.、2.6.6.3.5.1.及び 2.6.6.3.7.1.）。

表 2.4.4.4-1　ラット 26 週間投与試験及びサル 39 週間投与試験における Hb 及び Hct

動物種 [報告書番号]	投与量 (mg/kg/日)	Hb (g/dL) 投与終了時 [a]		Hb 比 (投薬群/対照群)		Hct (%) 投与終了時 [a]		Hct 比 (投薬群/対照群)	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
ラット [2011N126130]	0	16.62	15.90	-	-	49.48	45.93	-	-
	0.8	17.33	16.10	1.04	1.01	52.06	46.68	1.05	1.02
	4 (無毒性量)	19.08	16.27	1.15	1.02	56.43	46.83	1.14	1.02
	10	24.90[b]	21.24	1.50	1.34	75.31[b]	60.88	1.52	1.33
サル [2011N126131]	0	14.17	13.72	-	-	42.35	41.62	-	-
	3 (無毒性量)	16.23	14.75	1.15	1.08	48.73	45.78	1.15	1.10
	10	22.08	20.23	1.56	1.47	65.80	60.10	1.55	1.44
	50	23.02	24.35	1.62	1.77	72.24	73.63	1.71	1.77

注：臨床使用における用量調整の指標として Hb が用いられることから、図 2.4.4.4-1 には Hb 値を示した。なお、以下の考察では、各投薬群において Hb 及び Hct の対照群に対する変化量が同程度であることから、薬理作用の指標として Hct を用いた
a＝ ラットは試験 26 週、サルは試験 39 週の値
b＝ 投与 13 週の値。10 mg/kg/日群では投与 20 週（134 又は 135 日）に生存率の低下がみられたため、全例安楽死させた



注：NOAEL＝ 無毒性量.
Hb 値の目標範囲は血液透析患者で 10～12 g/dL（2.5.4.1.）
Data source: 2011N126131

図 2.4.4.4-1　　サル 39 週間投与試験における Hb と臨床における目標 Hb 値の比較

2.4.4.4.2.　　死亡及び一般状態への影響

マウス及びラットでは最長 14 日間の経口投与によってそれぞれ 100 及び 250 mg/kg/日以上、イヌでは最長 4 週間の経口投与によって 90 mg/kg/日で死亡又は一般状態の悪化が認められた（2.6.6.3.）。ラット及びイヌでは、死亡又は一般状態悪化に胃又は十二指腸のびらん／潰瘍が関連していると考えられた。ラットでは 250 mg/kg/日以上の群で脱水、糞便異常及び被毛の赤色化、500 mg/kg/日群で歩行異常、活動低下、振戦、体温低下、衰弱、努力性呼吸及び呼吸数の低下が認められた。イヌでは 90 mg/kg/日群で体重減少、摂餌量減少、活動低下、糞便異常、流涎、嘔吐等がみられ、摂餌量及び体重の減少が一般状態の悪化に関連したと考えられた。マウスの死亡及び重篤な一般状態悪化の原因は不明であった。マウスでは

体重減少、活動低下、接触時冷感、円背位、立毛又は皮膚弾力性低下がみられたが、死亡又は重篤な一般状態悪化例と生存例の一般状態所見に差は認められなかった。死亡又は重篤な一般状態悪化が認められたときの曝露量（AUC）はマウスで 905 µg·hr/mL（30 mg/kg/日群の値、100 mg/kg/日は死亡のためデータ無し）、ラットで 3184 µg·hr/mL（雌のみ）、イヌで 226 µg·hr/mL であり、ヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 764、2689 及び 191 倍であった。

マウス及びラットにそれぞれ 30 及び 20 mg/kg/日以上を最長 13 週間投与した結果、一般状態の悪化又は死亡がみられ、これらは Hct の著しい高値（対照群の 1.47～1.97 倍）による末梢循環障害又は血栓症に続発する多臓器病変による影響と考えられた（2.6.6.3.）。ラットの 26 週間投与試験及び 2 年間がん原性試験（2.6.6.5.）においてもそれぞれ 10 及び 4 mg/kg/日（雄のみ）群において同様の多臓器病変及び一般状態の悪化又は死亡が認められた。イヌの 13 週間投与試験では、試験 8～11 週に 15 mg/kg/日以上の群で Hct の顕著な高値（投与前値の 1.33 倍以上）による循環障害に関連すると考えられる一般状態の悪化（振戦、ふらつき、痙攣、虚脱、努力性呼吸等）及び死亡が認められた（2.6.6.3.）。

サルでは、14 日間投与試験において、100 mg/kg/日群で摂餌量の低値、嘔吐、流涎、一過性の糞便異常、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の高値（投与前値の 2.4 倍）及び血清コレステロールの低値（投与前値の 0.43 倍）が認められた（2.6.6.3.7.1.1.）。13 週間投与試験において死亡は認められなかったが、100 mg/kg/日群（高用量群）で衰弱、活動低下、体重減少（進行性）、血清総蛋白、アルブミン、カルシウム、リンの低値、一過性の赤血球パラメータの低値等が認められた（2.6.6.3.7.1.2.）。サルの 39 週間投与試験では、50 mg/kg/日群（高用量群）において皮膚発赤（うっ血）及び体重増加量の低値が認められたのみであり、忍容性が確認された（2.6.6.3.7.1.3.）。

2.4.4.4.3.　　多臓器への影響

マウス 13 週間投与試験の 30 mg/kg/日以上の群及びラット 26 週間投与試験の 10 mg/kg/日群において、ダプロデュスタットの薬理作用による顕著な骨髄内・外の赤血球造血亢進及び赤血球パラメータの高値（Hct は対照群の 1.4 倍超）等が認められた（2.6.6.3.）。これらの用量で観察された一般状態悪化及び死亡に関連する全身性うっ血、血栓症及び多臓器病変（心臓、腎臓、脳、肝臓、肺、血管壁等）は、Hct 高値及び血液粘稠度増加による循環障害に起因するものと考えられる。

ラットに同程度の Hct 増加を誘発する量の rhEPO を反復投与したときに、全身性うっ血及び同様の多臓器病変が認められている[Serabian, 2003; Woodburn, 2008]。ラットのがん原性試験では、ダプロデュスタットの経口投与期間の長期化（最長 2 年間）に伴い、より低い投与量でも類似所見が認められた。すなわち、0.8 mg/kg/日以上の群で進行性心筋症の頻度又は程度の増大、4 mg/kg/日群の雄で心房内血栓並びに梗塞又は分節状の壊死を伴う様々な組織における血栓が認められた（2.6.6.5.3.1.）。

サルに 100 mg/kg/日までのダプロデュスタットを 13 週間反復経口投与した結果、Hct の用量依存的な高値（対照群の 1.13～1.76 倍）がみられたが、血栓及びうっ血はみられず、低酸素症を示唆する一般状態変化も認められなかった（2.6.6.3.7.1.2.）。サルの 39 週間投与試験

では、10 mg/kg/日以上の群で用量依存的な Hct の高値（対照群の 1.58～1.86 倍）、多臓器うっ血及び脳の限局性出血がみられたが、血栓及び低酸素症を示唆する一般状態変化は認められなかった（2.6.6.3.7.1.3.）。rhEPO においても、サルの 9 ヵ月間静脈内投与試験で多臓器うっ血（脳を含む）がみられ、高用量群の死亡例の 1/3 例では脳に出血が認められている[FDA, 2012]。

これらのダプロデュスタットの赤血球造血亢進作用による多臓器病変は、Hct の顕著な高値がみられたときの末梢臓器病変であり、正常動物において顕著かつ慢性的に赤血球パラメータが増加することによる結果であると考えられた（2.6.6.3.）。しかしながら、ラットにおける 0.8 mg/kg/日は、Hct の高値が認められる最低用量であり、循環障害及び血栓に関連する病変を引き起こす最低用量であるが、個体毎に評価した際に Hct と病変との間に厳密な相関は認められなかった。

マウス 2 年間がん性試験［ダプロデュスタット（経口）及びヒト代謝物（M2：2.0 mg/kg/日、M3：2.5 mg/kg/日、M13：1.3 mg/kg/日、皮下）を併用投与］では、雄の 0.8 mg/kg/日のダプロデュスタット単独投与群（代謝物の併用無し）を除く全投薬群の多数の組織において、多発性動脈炎と一致する血管／血管周囲炎の増加が認められた（2.6.6.5.2.）。マウスの血管／血管周囲炎は加齢に伴う自然発生性の変化として知られており[Greaves, 2007]、生存率に影響しなかったことから本所見は悪影響ではないと判断した。また、加齢に伴って一般的にみられる本所見のような変化は、炎症を生じている状態においてよく認められることが知られている[Berridge, 2016; Frazier, 2015; Frazier, 2013]。代謝物を皮下投与した全群で、投与部位の出血頻度の増加、並びにマクロファージ（脾臓）、クッパー細胞（肝臓）及び腎尿細管の色素沈着（赤血球崩壊によるヘモジデリン又はビリルビン沈着と考えられる）が認められたことから、血管炎／血管周囲炎は代謝物の連日投与による持続的な皮下局所の刺激及び炎症（慢性炎症）に一部関連した変化と考えられる。胸腺では、雌の全投薬群にリンパ濾胞過形成の頻度増加が認められており、投薬によって免疫系が刺激されていることが示唆された。また、げっ歯類の短期毒性試験において、赤血球パラメータの高値、うっ血及び末梢循環障害による血管炎がみられていることから、ダプロデュスタットの過度の薬理作用も 2 年間投与試験でみられた血管炎の発現に関連していると考えられた。rhEPO においても、ラット及びサルで薬理作用に関連すると考えられるうっ血及び動脈周囲炎が認められている[FDA, 2012]。

ラット 2 年間がん原性試験では、ダプロデュスタットの経口投与により、0.8 mg/kg/日以上の群で自然発生性の進行性心筋症の頻度及び程度の増大がみられたが、その頻度及び程度は施設背景値の範囲内であった（2.6.6.5.3.）。4 mg/kg/日群（雄）では心房内血栓並びに梗塞又は分節状の壊死を伴う様々な臓器における血栓を伴った進行性心筋症によって生存率が低下したため、これらの変化を悪影響と判断した。7 mg/kg/日群（雌）及び 0.8 mg/kg/日群の雌雄では、進行性心筋症による生存率への影響は認められなかった。これらのことから、進行性心筋症に対する無毒性量は雄で 0.8 mg/kg/日、雌で 7 mg/kg/日と推定された。進行性心筋症の増悪はより短期の試験（13～26 週）でみられた赤血球造血の著しい亢進による二次的影響（うっ血、末梢循環障害又は血栓）に関連する変化と考えられた。心筋変性の頻度

増加は rhEPO のラットの長期反復投与試験においても認められている[FDA, 2012; Serabian, 2003]。

2.4.4.4.4.　　消化管への影響

ダプロデュスタットの経口投与によりマウス、ラット、イヌ及びサルで糞便異常（退色便、軟便、液状便又は粘液便）がみられ、更にイヌ及びサルでは嘔吐も認められた（2.6.6.3.）。また、マウス、ラット、イヌ及びサルのすべての動物種において胃のびらん／潰瘍が認められた。本変化はダプロデュスタットの静脈内投与時（1 日 1 回 14 日間、4 時間持続投与）においても、経口投与時と同程度の曝露量で誘発されたことから、局所刺激ではなく全身曝露による影響であることが示唆された。ラット及びイヌにおいて消化管潰瘍はシクロオキシゲナーゼ（COX）阻害薬による影響として広く知られているが、ラット全血を用いた検討の結果、ダプロデュスタットのラット COX-1 及び COX-2 に対する IC50 はそれぞれ 65.9 µM（25.9 µg/mL）及び 100 µM 超（39.3 µg/mL 超）と弱く（2.4.2.3.）、ヒト推定最大 Cmax（24 mg/日投与時）の 53 倍以上であった。

胃のびらん／潰瘍がみられたほとんどの動物では、赤血球造血亢進を示唆する Hct の顕著な高値が認められている。rhEPO のラットの反復投与試験においても、同程度の Hct 高値により、胃のびらんが認められている[Serabian, 2003; Woodburn, 2008]。しかしながら、ラットの 4 週間経口投与試験では、顕著な Hct の増加が認められなかった 7 mg/kg/日群においても、限局性の胃のびらん又は出血が低頻度（20%）で認められている（2.6.6.3.）。同群では、数例の Hct が対照群の最高値を超えており、更にほとんどの動物で赤血球の造血亢進を示唆する所見［骨髄の赤血球系細胞過形成（100%）、脾臓の髄外造血の亢進（75%）及び末梢血中の有核赤血球出現（100%）］が認められている。このことは、同群においても赤血球造血亢進と胃のびらん／潰瘍が関連していることを示唆している。血行静止、うっ血、動静脈瘻及び虚血性傷害の原因となる血液粘稠性の増加に対して、胃微小循環は特に影響を受けやすいと考えられている[Li, 2015; Spivak, 2002]。

サルでは胃のびらん／潰瘍又は出血は 39 週間投与試験でのみ観察され、これらの所見がみられた 10 mg/kg/日以上の群では Hct の顕著かつ持続的な高値（試験 13～39 週にかけて対照群の 1.44 倍以上）が認められた（表 2.4.4.4-1）。6 週間の休薬期間終了後、サルで胃のびらん／潰瘍は認められなかった。

2.4.4.4.5.　　神経への影響

マウスでは、13 週間投与試験の 30 mg/kg/日以上の群において、坐骨神経の神経線維変性、腰髄の軸索変性及び後肢骨格筋の筋線維萎縮が認められた（2.6.6.3.）。これらの発現メカニズムは明らかではないが、Hct 高値に伴う循環障害による虚血に関連すると考えられた。また、げっ歯類の後肢の末梢神経は低血糖症によって損傷を受けやすいこと[Potter, 1988; Sidenius, 1983]から、これらの動物でみられた血清グルコース濃度の低値も寄与している可能性が考えられた。3 種のヒト代謝物を併用投与したマウスの 13 週間投与試験（2.6.6.3.2.1.3.）及び 2 年間投与によるがん原性試験（2.6.6.5.2.）においても、ダプロデュスタットをそれぞれ 6 mg/kg/日以上及び 3 mg/kg/日投与した群で神経に対する影響が認められ

た。ラット及びサルにおいて神経変性はみられなかった。イヌでは、13 週間投与試験の 30 mg/kg/日群の 1 例（60 日間投与）で坐骨神経の軸索変性がみられたが、本動物で試験 57 日の投与直前に痙攣が観察されていたことから、本所見は痙攣時の外傷による影響であると考えられた（2.6.6.3.5.）。2 年間がん原性試験の結果に基づき、神経への影響に対するダプロデュスタットの無毒性量は 0.8 mg/kg/日と推定された。そのときの曝露量（AUC）はヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）の 57 倍であった（表 2.4.4.4-2）。

ラットにダプロデュスタットを 14 日間経口投与し、フッ化ナトリウム（解糖阻止剤）添加試験管に採取した血液を用いてグルコース濃度を測定した結果、血漿中グルコース濃度の低値が認められた（2.6.6.8.2.2.1.）。この結果から、ダプロデュスタットの投与による血漿又は血清グルコース濃度の低値は in vivo における影響であり、ex vivo（赤血球パラメータ増加によるグルコース消費量の増加）における影響ではないことが示された。幼若赤血球は老赤血球の 2.5 倍のグルコースを消費量すること[Magnani, 1983]から、毒性試験でみられた血清グルコース濃度の低値は薬理作用に関連した赤血球のグルコース消費量の増加による影響であると考えられた。

2.4.4.4.6.　　無毒性量及び安全域

無毒性量はマウスで 0.8 mg/kg/日（2 年間投与試験）、ラットで 0.8 mg/kg/日（2 年間投与試験）、イヌで 3 mg/kg/日（13 週間投与試験）及びサルで 3 mg/kg/日（39 週間投与試験）と推定された。無毒性量投与時と予定最大臨床用量（24 mg/日）投与時のダプロデュスタットの曝露量比は Cmax 及び AUC でそれぞれ 1.35（サル）～37.1（ラット）倍及び 2.95（サル）～231（ラット）倍であった（表 2.4.4.4-2）

サル 39 週間投与試験（2.6.6.3.7.）の無毒性量（3 mg/kg）における曝露量は、ヒト推定最大曝露量をわずかに超えた程度であり、Cmax 及び AUC はヒト推定最大曝露量のそれぞれ 1.35 及び 2.95 倍であった。サルでみられた所見は正常動物にダプロデュスタットを 39 週間連日投与した結果発現した過度な薬理作用に基づく造血亢進に関連する変化であった。既承認の赤血球造血刺激因子製剤の毒性試験でも同様の変化（赤血球増多症、全身性うっ血、虚血及び血栓症に関連する多臓器病変）が認められていることから、Hb 値のモニタリング及び用量調整により Hb 値を適切に維持することで、過剰な赤血球造血亢進による悪影響が発現するリスクは大幅に低減することができると考えられる。

表 2.4.4.4-2　ダプロデュスタット経口投与時の動物／ヒト曝露量比

動物種 (投与期間) [報告書番号]	投与量[b] (mg/kg/日)	性	Cmax (µg/mL)	AUC(0-24h) (µg·hr/mL)	動物/ヒト 曝露量比[a]	
			投与期間終了時[c]		Cmax	AUC
マウス (13 週間) [2011N112096]	**3 (無毒性量)**	♂♀	**14.5**	**181**	**29.9**	**153**
	30	♂♀	50.7	669	105	565
	60	♂♀	60.5	833	125	704
マウス (2 年間)[h] M2,M3,M13 併用 [2014N221714]	0.2	♂♀	1.35	20.6	2.78	17.4
	0.8[g] (無毒性量)	♂♀	**4.93**	**68.0**	**10.2**	**57.4**
	3	♂♀	14.9	238	30.7	201
ラット (26 週間)[d] [2011N126130]	0.8	♂♀	14.5	233	29.9	197
	4 (無毒性量)	♂♀	**46.8**	**785**	**96.5**	**663**
	10[d]	♂♀	75.0	1377	155	1163
ラット (2 年間) [2014N196080]	0.02	♂♀	0.484	8.47	0.998	7.15
	0.1	♂♀	2.64	40.9	5.44	34.5
	0.8[g] (無毒性量)	♂♀	**18.0**	**274**	**37.1**	**231**
	4	♂	58.0	889	120	751
	7	♀	83.5	1430	172	1208
ラット (胚・胎児発生) [CD2009/00388]	**7[f] (無毒性量)**	♀	**69.7**	**1086**	**144**	**917**
ラット (出生前後発生)[h] M2,M3,M13 併用 [2018N365151]	0.8	♀	8.51	146	17.5	123
	7 (無毒性量)	♀	**52.0**	**855**	**107**	**722**
	40	♀	128	2240	264	1892
ウサギ (胚・胎児発生)[h] [CD2009/00390]	4	♀	1.49	22.8	3.07	19.3
	30	♀	9.24	133	19.1	112
	60 (無毒性量)	♀	**11.8**	**197**	**24.3**	**166**
イヌ (13 週間) [CD2009/00952]	1	♂♀	1.31	7.73	2.70	6.53
	3 (無毒性量)	♂♀	**2.34**	**19.1**	**4.82**	**16.1**
	30/15[e]	♂♀	NA	NA	NA	NA
サル (13 週間) [2010N108482]	5	♂♀	0.758	4.55	1.56	3.84
	20 (無毒性量)	♂♀	**1.40**	**14.8**	**2.89**	**12.5**
	100	♂♀	3.34	43.3	6.89	36.6
サル (39 週間) [2011N126131]	**3 (無毒性量)**	♂♀	**0.655**	**3.49**	**1.35**	**2.95**
	10	♂♀	1.30	9.46	2.68	7.99
	50	♂♀	2.58	29.8	5.32	25.2
ヒト(推定)[a]	24 mg/日	♂♀	0.485	1.184	NA	NA

注：太字は無毒性量を示す。表中の曝露量は、雌雄それぞれにつきマウス及びウサギ（コンポジットサンプリング）では n=2～3、ラット、イヌ及びサルでは n=3～6 の平均値。NA = 該当せず

a. 動物の曝露量（投与期間終了時又は最終測定日）と、定常状態のヒト推定曝露量（Cmax 及び AUC）を用いて算出した。血液透析患者（日本人、体重 54 kg）に 24 mg 投与したときの定常状態（非透析日）における曝露量を推定した（2019N405983）

b. イヌの 13 週間投与試験（カプセル投与）を除き、強制経口投与によりダプロデュスタットを投与した

c. 試験終了時の TK 測定値を示した。ラットの 2 年間投与試験、マウスの 13 週間投与試験及び 2 年間投与試験、並びにウサギの胚・胎児発生試験については、それぞれ試験 26 週、4 週及び 26 週、並びに妊娠 11 日（投与 5 日目）の測定値を示した

d. 雌のみの値。雄は試験 20 週に生存率低下のため安楽死させた

e. 試験終了前に死亡又は一般状態悪化のために安楽死させた

f. ラットの 4 週間経口投与試験の試験 4 週の曝露量

g. ラット 2 年間投与試験（ダプロデュスタット単独経口投与）及びマウス 2 年間投与試験（ダプロデュスタットを経口投与、更に 3 種のヒト代謝物を皮下投与）における非腫瘍性所見についての無毒性量

h. 3 種のヒト代謝物（M2、M3 及び M13）の曝露量については表 2.4.4.4-3 参照

表 2.4.4.4-3　サル及び妊娠ウサギへのダプロデュスタットの経口投与又はマウス及び妊娠ラットへの直接皮下投与によるヒト代謝物の動物／ヒト曝露量比

代謝物	動物種	ダプロデュスタット経口投与量（マウス及びラットは代謝物の皮下投与量）(mg/kg/日)	平均全身曝露量 サル (試験 39 週) ウサギ (妊娠 11 日) ラット (妊娠 9 日) マウス (試験 26 週 [b])		動物/ヒト曝露量比 [a]	
			Cmax (μg/mL)	AUC(0-24h) (μg·hr/mL)	Cmax	AUC
GSK2391220 (M2)	サル	3 (39 週間、無毒性量)	0.0312	0.266	0.32	0.21
		50 (39 週間、最大耐量)	0.0899	1.27	0.91	0.99
	ウサギ	60 (胚・胎児発生、無毒性量)	1.02	11.7	10.4	9.11
	ラット	2.5 M2 (出生前後発生) [c]	1.55	2.50	15.7	1.95
	マウス	2 M2 (2 年間) [b]	3.87	1.66	39.3	1.29
	ヒト [a] (推定)	24 mg/日	0.0985	1.285	NA	
GSK2506104 (M3)	サル	3 (39 週間、無毒性量)	0.0110	0.0789	0.10	0.04
		50 (39 週間、最大耐量)	0.0329	0.468	0.29	0.27
	ウサギ	60 (胚・胎児発生、無毒性量)	0.222	2.69	1.98	1.53
	ラット	3.2 M3 (出生前後発生) [c]	1.72	2.47	15.4	1.40
	マウス	2.5 M3 (2 年間) [b]	4.55	1.84	40.6	1.04
	ヒト [a] (推定)	24 mg/日	0.1120	1.761	NA	
GSK2531401 (M13)	サル	3 (39 週間、無毒性量)	0.00642	0.0362	0.14	0.04
		50 (39 週間、最大耐量)	0.0171	0.247	0.38	0.28
	ウサギ	60 (胚・胎児発生、無毒性量)	0.0158	0.194	0.35	0.22
	ラット	1.8 M13 (出生前後発生) [c]	1.19	1.94	26.4	2.24
	マウス	1.3 M13 (2 年間) [b]	2.70	1.34	59.9	1.54
	ヒト [a] (推定)	24 mg/日	0.0451	0.868	NA	

注：　NA = 該当せず

a. 動物の曝露量（投与期間終了時又は最終測定日）と、定常状態のヒト推定曝露量（Cmax 及び AUC）を用いて算出した。血液透析患者（日本人、体重 54 kg）に 24 mg 投与したときの定常状態（非透析日）における曝露量を推定した（2019N405983）

b. マウス 2 年間がん原性試験の試験 26 週における代謝物の平均曝露量。投薬群には 3 種のヒト代謝物（M2: 2.0 mg/kg/日、M3: 2.5 mg/kg/日、M13: 1.3 mg/kg/日）の混合液を 1 日 1 回皮下投与し、更に、0.2、0.8 又は 3 mg/kg/日のダプロデュスタットを経口投与した。表中の値はダプロデュスタットが投与された 3 群の平均値（3 群ともに代謝物の投与量は同じ)

c. ラットの出生前後発生に関する試験の 7 mg/kg/日（＋代謝物）（無毒性量）群の妊娠 9 日における代謝物の平均曝露量

Data source: 2014N221714, 2018N365151, 2012N140611, 2011N126131

2.4.4.5.　がん原性及び遺伝毒性

ラット 2 年間経口投与試験（雌雄それぞれ 7 及び 4 mg/mg/日までのダプロデュスタットを投与）及びマウス 2 年間経口投与試験（3 mg/kg/日までのダプロデュスタットを投与）において、がん原性は認められなかった（2.6.6.5.）。これらの試験の最高用量における曝露量（AUC）は、ラット及びマウスでそれぞれヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）の 751 及び 201 倍であった（表 2.4.4.4-2）。ラット及びマウスではダプロデュスタットを投与しても 3 種のヒト代謝物が生成されないことから、マウス 2 年間がん原性試験ではヒト代謝物（M2、M3 及び M13、それぞれ 2.0、2.5 及び 1.3 mg/kg/日）をダプロデュスタットと併用投与した。マウス 2 年がん原性試験における GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）及び

GSK2531401（M13）の曝露量（AUC）はヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 1.29、1.04 及び 1.54 倍であった（表 2.4.4.4-3）。

ダプロデュスタットは、細菌を用いる復帰突然変異試験で突然変異誘発性を示さず、マウスリンフォーマ TK 試験で遺伝子突然変異誘発性を示さなかった（2.6.6.4.2.）。ダプロデュスタットの in vivo 骨髄小核試験において、1000 mg/kg/日群では陰性であったが、2000 mg/kg/日群において小核を有する多染性赤血球のわずかな増加（2 倍）が認められた（2.6.6.4.4.）。赤血球造血を亢進させる化合物は遺伝毒性と異なる機序により小核含有赤血球のわずかな増加を引き起こすとされていること[Tweats, 2007]から、本変化はダプロデュスタットの薬理作用に起因すると考えられた。また、ダプロデュスタットの in vivo 肝臓コメットアッセイ（1000 mg/kg/日までを 2 回経口投与）において、DNA 損傷性は認められなかった。

ヒト代謝物の遺伝毒性評価において、M2 及び M3 は細菌を用いる復帰突然変異試験及びマウスリンフォーマ TK 試験で陰性であった（2.6.6.4.3.1.1.及び 2.6.6.4.3.2.1.）。M13 は、マウスリンフォーマ TK 試験において細胞毒性を示す濃度で弱陽性を示し、in vivo 肝臓コメットアッセイでは最大耐量（200 mg/kg、静脈内投与）で「不確か（equivocal）」な結果を示した。しかしながら、M13 は細菌を用いる復帰突然変異試験において陰性を示し、in vivo 肝臓コメットアッセイ（100 mg/kg、静脈内投与）で再現性のある陰性を示し、in vivo マウス骨髄染色体異常試験においても最大耐量（200 mg/kg、静脈内投与）で遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.4.3.及び 2.6.6.4.5.）。

以上の結果から、ダプロデュスタット及びヒト代謝物（M2、M3 及び M13）はヒトに対してがん原性及び遺伝毒性を示さないと考えられた。

2.4.4.6.　　生殖発生毒性

ラット及びウサギにおいて、ダプロデュスタットに関連した奇形は認められなかった（2.6.6.6.）。雄受胎能について、ラットでダプロデュスタットに関連した影響は認められなかった（2.6.6.6.2.）。雌受胎能についても、ラットで母動物毒性のみられない用量において、ダプロデュスタットに関連した影響は認められなかった（2.6.6.6.3.）。

ラットの雄受胎能に関する試験では、雄生殖器重量、交尾行動、受胎能及び生殖能にダプロデュスタットに関連した影響は認められず、無毒性量は 20 mg/kg/日（最高用量）と推定された。

ラットの雌受胎能及び初期胚発生に関する試験では、交尾所要日数、受胎能・妊娠率、性周期に対して、ダプロデュスタットによる影響は認められなかった。母動物毒性のみられた 100 mg/kg/日群（最高用量）において、黄体数及び着床数の低値並びに着床後死亡率の高値（生存胎児数の低値に関連）が認められたことから、雌受胎能及び初期胚発生に対する無毒性量は 7 mg/kg/日（中用量）と推定された。無毒性量の 7 mg/kg/日における曝露量（AUC）は 1086 μg·hr/mL であり、ヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）の 917 倍であった（表 2.4.4.4-2）。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験において、妊娠 7～19 日にダプロデュスタットを経口投与した結果、無毒性量は 60 mg/kg/日（最高用量）と推定された。

ラットでは、母動物毒性のみられた 60 mg/kg/日群（妊娠 6～17 日に投与）及び 100 mg/kg/日群（妊娠 0～6 日に投与）で着床後死亡率の高値、生存胎児数の軽度低値（胎児体重に影響なし）及び肋骨変異がみられたが、7 mg/kg/日までの群で胚・胎児発生に対する影響は認められなかった。

胚・胎児発生について、ウサギ及びラットの無毒性量における曝露量（AUC、それぞれ 197 及び 1086 µg·hr/mL）はそれぞれヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）の 166 及び 917 倍であった（表 2.4.4.4-2）。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験の無毒性量におけるヒト代謝物の曝露量（AUC）は、M2、M3 及び M13 でヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 9.11、1.53 及び 0.22 倍であり（表 2.4.4.4-3）、M2 及び M3 についてはヒト推定最大曝露量を上回る条件下での安全性が確認された。しかし、M13 についてはその曝露量がヒト推定最大曝露量を下回ったため、ラットの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において、3 種のヒト代謝物を直接投与することにより、代謝物の胚・胎児発生に対する影響を更に評価した。本試験ではダプロデュスタット及び代謝物の曝露による F1 出生児の形態変化及び機能への影響を評価するため、ラットにダプロデュスタットを 0（媒体）、0.8、7 及び 40 mg/kg/日の用量で妊娠 6 日～授乳 20 日に 1 日 1 回経口投与し、更に、全投薬群に対してヒト代謝物の混合液［GSK2391220（M2）：2.5 mg/kg/日、GSK2506104（M3）：3.2 mg/kg/日、GSK2531401（M13）：1.8 mg/kg/日］を 1 日 2 回皮下投与（6 時間間隔）した。本試験では通常のラット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の検査項目に剖検（生後 91 日）を追加し、F1 出生児の内臓（胸部・腹部・骨盤内）を肉眼的に観察した。

試験の結果、40 mg/kg（＋代謝物）群において、F0 母動物の体重増加量及び摂餌量の低値（妊娠後期及び授乳期）並びに F1 出生児生存率の低値（生後 2～4 日）及び体重低値が認められた。いずれの群においても、投薬に関連した剖検所見（胸部・腹部・骨盤内臓器の肉眼的観察）はみられず、また、F0 母動物の妊娠期間、分娩率、死産児数、F1 出生児の出生児死亡数（生後 1 日）、性比、外表形態、性成熟、生殖能、自発運動量、神経行動学的検査及び大腿骨長、F1 雌の性周期、交尾能及び分娩、並びに F2 出生児の成長及び発達（生後 7 日まで）に投薬による影響は認められなかった。生後 10 日の F1 出生児からダプロデュスタット及び 3 種のヒト代謝物（M2、M3 及び M13）が検出され、乳汁移行性が示唆された。

40 mg/kg/日（＋代謝物）群において母動物毒性による F1 出生児の生存率及び体重低値が認められたことから、F0 母動物の生殖能及び出生児の出生前・後発生に対するダプロデュスタットの無毒性量は 7 mg/kg/日（＋代謝物）と推定された。7 mg/kg/日（＋代謝物）群の妊娠 9 日におけるダプロデュスタット、M2、M3 及び M13 の曝露量（AUC）は、ヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 722、1.95、1.40 及び 2.24 倍であった（表 2.4.4.4-2 及び表 2.4.4.4-3）。このことから、ラットの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において、ヒト推定最大曝露量を上回る条件下でのヒト代謝物（M2、M3、M13）の安全性が確認された。

2.4.4.6.1.　　胎盤通過性及び乳汁移行性

ダプロデュスタットの胎盤通過性及び乳汁移行性を直接評価した非臨床試験は実施していない。

乳汁移行性について、ラットの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の結果（2.6.6.6.5.1.1.）に基づき検討した結果、生後 10 日の出生児からダプロデュスタット及び 3 種のヒト代謝物（M2、M3 及び M13）が検出されたことから、ラットにおけるダプロデュスタット及びこれら 3 種のヒト代謝物の乳汁移行性が示唆された。また、ダプロデュスタットについては、膜透過性が高いことが確認されている（2.4.3.3.1.3.）。これらのことから、ヒトにおいても、ダプロデュスタットは乳汁へ移行する可能性があると考えられる。なお、乳汁を介した曝露による出生児への影響については、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における出生児の成長・発達を基に評価している。

胎盤通過性については、いずれの生殖発生毒性試験においても胎児中の薬物濃度の測定を実施していないため不明であるが、ダプロデュスタットは膜透過性が高いこと（2.4.3.3.1.3.）から、受動拡散によって胎盤を通過する可能性が考えられる。ラットの胚・胎児発生に関する試験（2.6.6.6.4.1.1.）において、60 mg/kg/日群で胎児毒性（着床後死亡率の高値及び骨格変異）がみられたが、これらの変化には母動物毒性又はダプロデュスタットの胎児への直接曝露が関連している可能性が考えられる。ラットの胚・胎児発生に関する試験の結果（胎児への影響）及びダプロデュスタットの膜透過性が高いことから、ダプロデュスタットはヒトで胎盤を通過する可能性が考えられる。

2.4.4.7.　　代謝物の毒性評価

CKD 患者において、ダプロデュスタットの 3 種のヒト血漿中代謝物（M2、M3 及び M13）が薬物関連物質の総曝露量の 10%を超える主代謝物と考えられた。これらの代謝物はげっ歯類及びイヌの血漿でほとんど検出されなかったが、ウサギ及びサルの血漿中ではすべて検出された（2.6.6.3.）。

これらの動物種間（マウス、ラット、イヌ及びサル）では代謝物プロファイルが異なるにもかかわらず、反復投与試験における毒性プロファイルは類似しており、ダプロデュスタットの薬理作用に基づく変化が一貫してみられた。また、マウスのダプロデュスタット単独投与による 13 週間投与試験とダプロデュスタット及び 3 種のヒト代謝物の併用投与（M2、M3 及び M13）による 13 週間投与試験において、毒性プロファイルに明確な差は認められなかった。これらのことから、ヒト代謝物（M2、M3 及び M13）がダプロデュスタットと異なる毒性を示す可能性は低いと考えられた。

サルの 39 週間投与試験の最大耐量（50 mg/kg/日）における M2、M3 及び M13 の曝露量は、ヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 0.99、0.27 及び 0.28 倍であった（表 2.4.4.4-3）。マウス 2 年間がん原性試験（ダプロデュスタットを経口投与後、3 種のヒト血漿中代謝物を皮下投与）における GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）及び GSK2531401（M13）の曝露量（AUC）はヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 1.29、1.04 及び 1.54 倍であった（表 2.4.4.4-3）。マウス 2 年間がん原性試験の結果から、ヒト代謝物の反復投与毒性及びがん原性は適切な曝露条件下で評価されたと考える。

ウサギの胚・胎児発生に関する試験の無毒性量（60 mg/kg/日）における GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）及び GSK2531401（M13）の曝露量（AUC）はヒトに予定最大臨床用量（24 mg/日）を投与したときのそれぞれ 9.11、1.53 及び 0.22 倍であった（表 2.4.4.4-3）。ウサギの胚・胎児発生に関する試験の無毒性量における GSK2531401（M13）曝露量（AUC）がヒト推定最大曝露量の 0.22 倍であったことから、ラットの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 3 種のヒト代謝物をダプロデュスタットと併用投与し、F1 出生児の形態及び機能への影響を評価した。ラットの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の無毒性量（7 mg/kg/日＋代謝物）における M13 の曝露量（AUC）はヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）の 2.24 倍であった（表 2.4.4.4-3）。これらの試験から、ヒト代謝物（M2、M3 及び M13）の胚・胎児発生毒性は適切な曝露条件下で評価されたと考える。

2.4.4.8.　免疫毒性

ダプロデュスタットの過度の薬理作用の結果として、免疫抑制又は炎症の理論的リスクが想定され、一般毒性試験では薬理作用による二次的影響と考えられる脾臓の肥大（薬理作用による髄外造血亢進に関連）、炎症及び白血球数の高値がみられたが、ダプロデュスタットの直接的な影響として免疫毒性を示す所見はほとんど認められなかった。リンパ球数の低値については、回復性があり、無毒性量よりも十分高い用量においてのみ発現することから、臨床的に意義のある所見ではないと考えられた。臨床試験においてダプロデュスタットの投与に関連した血小板及び白血球パラメータへの影響は認められておらず（2.7.4.3.1.）、ダプロデュスタットがヒトに免疫毒性を示す可能性は低いと考えられる。

2.4.4.9.　光毒性

ダプロデュスタットは紫外-可視光領域（290～700 nm）の波長の光を吸収しないことから、光毒性の懸念はない。

2.4.4.10.　不純物、分解物及び添加物

市販製剤の製剤化に供する原薬中の非遺伝毒性不純物（　gsk001*　及び　gsk002*　）及びその他の不純物については、ICH Q3A に従って、それぞれ≤0.15%（安全性確認の必要な閾値）及び≤0.10%（構造決定の必要な閾値）となるようにコントロールされている（2.3.S.2.6.及び 2.3.S.4.5.）。

変異原性不純物が原薬中に存在する可能性を確認するため、ダプロデュスタットの合成ルートを評価した。評価の結果、予定される臨床用量の原薬中において、既知の変異原性不純物又は変異原性が懸念される不純物（復帰突然変異試験、DEREK 及び Leadscope により評価）が毒性学的懸念の閾値（TTC）[薬生薬審発 0627 第 1 号通知, 2018]を超えて存在する可能性はないと考えられた（2.3.S.2.6.8.）。

ダプロデュスタットの原薬の不純物プロファイル及び不純物の規格値（2.3.S.4.1.）から、ダプロデュスタットの製剤においても安全性上の懸念はないと考えられた。

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.5.　総括及び結論

全体として、ダプロデュスタットの非臨床試験成績は、最高 24 mg を 1 日 1 回経口投与する腎性貧血の治療薬として承認申請することを支持するものであった。毒性試験に用いた動物種の全身曝露量及び代謝を検討した結果、これらはヒトにおけるダプロデュスタット及びその代謝物の安全性を予測するための適切な動物種であることが示された。

薬理

ダプロデュスタットは、経口投与可能で PHD1～3 に対する強力かつ選択的な阻害薬である。ダプロデュスタットは PHD の阻害により、転写因子である HIF1α 及び HIF2α の水酸化を抑制して HIFα を安定化させる。その結果、EPO 及びその他の酸素運搬や鉄代謝／輸送を促進する因子（ヘモジュベリン、フェロポルチン、トランスフェリン、HO-1）等の低酸素時に調節される HIF 応答性遺伝子の転写を促進させると考えられる[Semenza, 2003]。HIF 応答性の経路で調節される他の細胞機能には、血管新生、細胞外マトリックス代謝、アポトーシス、エネルギー／グルコース代謝、血管緊張、細胞接着及び細胞運動性が含まれる[Semenza, 2003]。非臨床薬理試験の成績から、ダプロデュスタットは赤血球産生を促進させ、鉄の取込み及び利用を増加させることで低酸素に対する代謝性適応を向上させると考えられる。

ダプロデュスタットはヒト PHD1～3 に対しておおむね同程度の阻害作用を示した。ダプロデュスタットのヒト PHD2 及び PHD3 に対する阻害作用は時間依存的及び可逆的であり、α-KG に競合的であった。ダプロデュスタットの PHD1～3 に対する阻害作用は、CP4H 及び FIH に対する作用と比較して 400 倍以上の選択性を示した。In vitro 試験の成績から、ダプロデュスタットは HIF1α 及び HIF2α を強固に安定化させ、広範な HIF 応答性遺伝子の発現を誘導することが示唆される。

マウスにダプロデュスタットを単回経口投与すると、肝臓及び腎臓の EPO mRNA 量が増加し、それに伴って血漿中 EPO 濃度が上昇した。また、マウスにダプロデュスタットを反復経口投与したときに、Hb、Hct、赤血球数及び網状赤血球数の有意な増加がみられた。ダプロデュスタットはげっ歯類への反復投与により PHD を阻害し、EPO 等の HIF 応答性遺伝子の発現を上昇させて赤血球産生を誘導することが示唆された。PHD 阻害を介して赤血球産生を誘導するという作用機序から、ダプロデュスタットは rhEPO 療法に伴う血中 EPO 濃度の生理的範囲の超過（血中 EPO 濃度の生理的範囲が 200 U/L 未満であるのに対して rhEPO 療法では 1000 U/L を超える）を起こすことなく Hb を上昇させると考えられ、血圧上昇及び生理的範囲を超える EPO 濃度による有害事象を回避できる可能性がある[Fishbane, 2007]。

ダプロデュスタットはヒトで広範に代謝され、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）の定量試験において、これらの代謝物の薬理活性の検討が必要であることが示された。6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）の PHD に対する活性及び選択性はいずれもダプロデュスタットと類似していた。ダプロデュスタットは in vitro で EPO 量を有意に増加させたが、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）では EPO 量の増加はみられなかった。これはダプロデュスタットと比較して代謝物の親水性が高いため、細胞膜の透過性が低下した可能性が考えられる。3 種類の主なヒト代謝物（M2、M3、M13）の混合液をマウスに皮下投与したときに、血液学的パラメータのわずかな上昇がみられた。このときのマ

ウスの AUC は最高臨床用量をヒトに投与したときの AUC の 1.04～1.54 倍に相当する。これらの成績から、ヒトでのダプロデュスタットの薬理活性にこれらの代謝物が寄与している可能性が示唆されるが、寄与の程度は不明である。ダプロデュスタット及び 6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）の副次的薬理試験において、57 種類の in vitro パネルアッセイで明らかな作用を示さなかった。

ダプロデュスタットの中枢神経系、呼吸系及び心血管系に及ぼす影響を検討した安全性薬理試験において、臨床的に重要な変化は認められなかった。ダプロデュスタットはウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本アッセイにおいて TdP を誘発せず、ダプロデュスタット及び 3 種類の主なヒト代謝物（M2、M3、M13）はいずれも hERG テール電流を阻害しなかった。ダプロデュスタットの安全性薬理試験において、血圧への顕著な影響は認められなかった。

イヌの心血管系に関する試験において、ダプロデュスタットの 30 mg/kg/日以上でみられた心拍数の上昇は軽度と考えられ、QTc 及び他の ECG パラメータに対する影響はみられなかった。また、イヌの最長 13 週間及びサルの最長 39 週間の反復経口投与毒性試験において ECG 波形に対する影響はみられなかった（2.6.6.3.5.、2.6.6.3.7.）。

ダプロデュスタットは経口投与可能な PHD1～3 に対する選択的な阻害薬であり、細胞アッセイで HIF1α 及び HIF2α を安定化させて EPO 等の HIF 応答性遺伝子の発現を上昇させ、非臨床及び臨床試験において用量依存的に Hb 等の赤血球系パラメータを上昇させることが示された。したがって、ダプロデュスタットは腎性貧血患者において赤血球産生を改善することが期待される。

薬物動態

ウサギ及びサルでのダプロデュスタットの代謝物プロファイルは、ヒトと類似していた。その他の動物ではヒトで生成されるダプロデュスタットの主な代謝物の一部しか生成されないため、マウス及びラットを用いた安全性及び薬物動態試験ではヒトでの主な 3 種の代謝物［GSK2391220（M2）、GSK2506104（M3）及び GSK2531401（M13）］を投与し、安全性プロファイルを検討した。

ダプロデュスタット（溶液）を経口投与したときの F は、マウスで 88%及びラットで 100%と高く、イヌで 46%及びサルで 34%と中程度であった。また、イヌにダプロデュスタット（懸濁液）を経口投与したときの F は溶液よりも概ね低く、ダプロデュスタットの溶解性が低いことによると考えられた。マウス、ラット、イヌ及びサルに静脈内投与したときのダプロデュスタットの CL は低く、Vss は総体液量[Davies, 1993]よりも小さいか、同程度であった。

マウス、ラット、イヌ及びサルに反復経口投与したときのダプロデュスタットの曝露量は、概して投与量増加の割合を下回って増加し、単回及び反復投与の曝露量に明らかな差はなく、また明らかな性差もみられなかった。

ダプロデュスタットは速やかに広く組織に分布し、組織内放射能は血液中放射能よりも低く、脳内放射能は血漿中放射能の約 2%であった。また、放射能は組織から速やかに消失した。

In vitro において、動物及びヒトでのダプロデュスタットの血漿蛋白結合率は高く、それぞれ 93.6%以上及び 99%超であった。動物及びヒトでの血液／血漿比は、それぞれ 0.45～1.64 及び 0.75～1.23 であり、血球との結合は低いことが示された。

ヒトに[14C]標識体を経口投与したとき、血漿中の主な成分は未変化体であった。CKD 患者にダプロデュスタットを投与した臨床成績（200942 試験及び PHI115573 試験）から、定常状態での血漿中に主な 3 種の代謝物（M2、M3 及び M13）が認められ、それぞれ DRM の 10%超であり、次いで 3 種の代謝物（M4、M5 及び M6）が 10%未満であった（2.7.2.2.1.2.3.2.及び 2.7.2.2.1.2.3.3.）。

ヒト肝ミクロソームを用いた in vitro 試験において、ダプロデュスタットが反応性代謝物を生成する可能性は極めて低いことが示された。

ラット、イヌ及びサルに[14C]標識体を経口投与したときの主な排泄経路は、糞中であった。BDC ラット、BDC イヌ及び BDC サルに[14C]標識体を経口投与したとき、ラット及びサルでは放射能は主に胆汁中に排泄され、イヌでは一部が胆汁中に排泄された。ラット、イヌ及びサルの胆汁中には、それぞれ投与量の約 42、8 及び 53%が排泄され、胆汁及び尿中排泄率より、それぞれ投与量の少なくとも 49、8 及び 69%が吸収されたと考えられた。

In vitro において、ダプロデュスタットの酸化的代謝には CYP2C8 が 95%寄与し、CYP3A4 の寄与は 5%とわずかであったことから、CYP2C8 阻害又は誘導剤との併用投与により薬物相互作用が生じる可能性が考えられた。CYP2C8 阻害剤である gemfibrozil 又はトリメトプリムと併用投与した臨床薬物相互作用試験において、ダプロデュスタットの曝露量が増加することが示された（2.7.2.3.4.1.）。

In vitro で、ダプロデュスタットは CYP2C8 を阻害し、その IC50 は 21 μM であった。しかしながら、CYP2C8 の基質であるピオグリタゾンと併用投与した臨床薬物相互作用試験において、ダプロデュスタットはピオグリタゾンの曝露量に影響を及ぼさなかった（2.7.2.2.1.2.4.2.）。

ヒト肝細胞において、ダプロデュスタットによる CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A4 の誘導は認められなかった。

また、ダプロデュスタットは BCRP の基質であったが、母集団薬物動態解析により、BCRP 阻害剤はダプロデュスタットの薬物動態に影響を与えないと考えられた（2.7.2.3.1.2.1）。

In vitro でダプロデュスタットは OATP1B1 及び OATP1B3 を阻害し、その IC50 はそれぞれ 6 及び 11 μM であった。しかしながら、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であるロスバスタチンと併用投与した臨床薬物相互作用試験で、ダプロデュスタットはロスバスタチンの曝露量に影響を及ぼさなかった（2.7.2.2.1.3.2.）。

毒性

ダプロデュスタットの毒性試験における主要所見は全身性うっ血、血栓症及び多臓器病変（心臓、腎臓、脳、肝臓、肺、血管壁等）であり、これらは薬理作用に基づく Hct 高値（2.4.4.4.1.）及び血液粘稠度増加による循環障害に起因するものと考えられた。マウスでは神経への影響（坐骨神経の神経線維変性、腰髄の軸索変性及び後肢骨格筋の筋線維萎縮）が

代謝物（M2、M3 及び M13）の併用投与の有無にかかわらず 13 週間以上の試験で認められた。神経への影響には、Hct 高値に伴う循環障害又は血清グルコース濃度の低値が関連していると考えられた。

単回経口投与試験では、マウス及びラットでは 1500 mg/kg 以上で死亡が認められた。イヌ及びサルでは摂餌量の低値、体重減少、糞便異常（イヌ 20 mg/kg 以上、サル 100 mg/kg 以上）、並びに嘔吐の頻度及び程度の増大（イヌ 120 mg/kg 以上、サル 300 mg/kg 以上）がみられ、それぞれ 180 及び 600 mg/kg の投与では忍容性が認められなかった。

反復経口投与試験では、マウス、ラット、イヌ及びサルで糞便異常（退色便、軟便、液状便又は粘液便）がみられ、更にイヌ及びサルでは嘔吐が認められた。また、マウス、ラット、イヌ及びサルのすべての動物種において胃のびらん／潰瘍が認められた。胃のびらん／潰瘍は Hct の顕著な高値に伴う循環障害によって引き起こされた可能性が高く、rhEPO のラットの反復投与試験においても、同程度の Hct 高値により、胃のびらんが認められている [Serabian, 2003; Woodburn, 2008]。

13 週間以上の試験においては Hct の著しい高値がみられ、マウス及びラットではそれぞれ 30 及び 4 mg/kg/日以上の群で一般状態悪化及び死亡（全身性うっ血、血栓症及び多臓器病変を伴う）、イヌでは 15 mg/kg/日以上の群で重度の一般状態悪化（振戦、ふらつき、痙攣、虚脱、努力性呼吸等）、サルでは 10 mg/kg/日以上の群で多臓器うっ血及び限局性の脳出血が認められた。

これらのダプロデュスタットの赤血球造血亢進作用による多臓器病変は、Hct の顕著な高値がみられたときの末梢臓器病変であり、正常動物において顕著かつ慢性的に赤血球パラメータが増加することによる結果であると考えられた。しかしながら、ラットにおける 0.8 mg/kg/日は、Hct の高値が認められる最低用量であり、循環障害及び血栓に関連する病変を引き起こす最低用量であるが、個体毎に評価した際に Hct と病変との間に厳密な相関は認められなかった。

これら赤血球パラメータの過剰な増加及びそれに伴う悪影響が発現するリスクは、赤血球造血刺激因子製剤同様に Hb 濃度を適切に維持することで大幅に低減することができると考えられる。

遺伝毒性及びがん原性については、それぞれの試験結果から、ダプロデュスタットはヒトに対して遺伝毒性及びがん原性を示さないと考えられた。

生殖発生毒性試験では、ラット及びウサギにおいて、ダプロデュスタットに関連した奇形は認められなかった（2.6.6.6.）。雄受胎能について、ラットでダプロデュスタットに関連した影響は認められなかった（2.6.6.6.2.）。雌受胎能についても、ラットで母動物毒性のみられない用量において、ダプロデュスタットに関連した影響は認められなかった（2.6.6.6.3.）。胚・胎児発生に関する試験において、ウサギでは 60 mg/kg/日（最高用量）まで胚・胎児発生に対する影響は認められなかった。ラットでは、母動物毒性のみられた 60 mg/kg/日以上の群で着床後死亡率の高値、生存胎児数の軽度低値（胎児体重に影響なし）及び肋骨変異がみられたが、7 mg/kg/日までの群で胚・胎児発生に対する影響は認められなかった。ラットの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、7 mg/kg/日までのダプロデュスタットとヒト代謝物（M2：2.5 mg/kg/日、M3：3.2 mg/kg/日、M13：1.8 mg/kg/日）を併

用投与した群において、F0 母動物の生殖能及び出生児の出生前・後発生に影響はみられなかったが、40 mg/kg/日（＋代謝物）群で母動物毒性（妊娠後期及び授乳期間における体重増加量及び摂餌量の低値）並びに F1 出生児の生存率低値及び体重低値が認められた。生後 10 日の出生児からダプロデュスタット及び 3 種のヒト代謝物が検出され、乳汁移行性が示唆された。ラットの雄受胎能に関する試験では、雄生殖器重量、交尾行動、受胎能及び生殖能にダプロデュスタットに関連した影響は認められず、無毒性量は 20 mg/kg/日（最高用量）と推定された。ラットの雌受胎能及び初期胚発生に関する試験では、交尾所要日数、受胎能・妊娠率、性周期に対して、ダプロデュスタットによる影響は認められなかった。母動物毒性のみられた 100 mg/kg/日群（最高用量）において、黄体数及び着床数の低値並びに着床後死亡率の高値（生存胎児数の低値に関連）が認められたことから、雌受胎能及び初期胚発生に対する無毒性量は 7 mg/kg/日（中用量）と推定された。これらの生殖発生毒性試験の無毒性量における曝露量（AUC）は、ヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）に比べて十分高いことから［ラット（7 mg/kg/日）において 722 倍、ウサギ（60 mg/kg/日）において 166 倍］、ダプロデュスタットはヒトの発生、受胎能に対して悪影響を及ぼさず、催奇形性も示さないと考えられた。

本剤のヒトの妊娠に対する影響は不明であり、妊婦への使用に関する安全性は確立されていない。生殖発生毒性試験の結果及びダプロデュスタットの膜透過性が高いことから、ダプロデュスタットは乳汁移行及び胎盤通過する可能性があると考えられる。

3 種のヒト代謝物（M2、M3 及び M13）については、ダプロデュスタットの投与（サル及びウサギ）及び代謝物の直接投与（マウス及びラット）による毒性試験において、ヒト推定最大曝露量（AUC）を超える曝露条件下で適切に評価されており（表 2.4.4.4-3）、これらはヒトに対して遺伝毒性、がん原性及び発生毒性を示さず、ヒトに反復投与したときに危惧すべき事象を発現する可能性はないと考えられた。

ダプロデュスタットの過度の薬理作用の結果として、免疫抑制又は炎症の理論的リスクが想定されたが、一般毒性試験においてダプロデュスタットの直接的な影響として免疫毒性を示す所見はほとんど認められなかった。このことから、ダプロデュスタットがヒトに免疫毒性を示す可能性は低いと考えられた。

毒性試験の無毒性量における曝露量（Cmax 及び AUC）はヒト推定最大曝露量（24 mg/日投与時）のそれぞれ 1.35（サル）～37.1（ラット）倍及び 2.95（サル）～231（ラット）倍であった（表 2.4.4.4-2）。

現時点で他の PHD 阻害薬は上市されていないため、それらの毒性試験成績については不明であるが、ダプロデュスタットの投与によってみられた過度の赤血球造血亢進は PHD 阻害薬のクラスエフェクトと考えられる。毒性試験でみられたダプロデュスタットによる影響は、主に正常動物において赤血球パラメータが増加したことによるものであると考えられる。既承認の赤血球造血刺激因子製剤の毒性試験でも同様の変化（赤血球増多症、全身性うっ血、虚血及び血栓症に関連する多臓器病変）が認められていることから、Hb 濃度のモニタリング及び本剤の用量調整により Hb 濃度を適切に維持することで、過剰な赤血球造血に関連する悪影響が発現するリスクは大幅に低減することができると考えられる。

以上のように、毒性試験によってダプロデュスタットの毒性は十分に評価され、その試験成績は本剤の臨床使用を支持するものであった。

2.4.6.　参考文献

Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD. J Am Soc Nephrol. 2010;21:2151-6.

Berridge BR, Mowat V, Nagai H, et al. Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. Toxicol Pathol. 2016;29:1S-47S.

Bishop T, Ratcliffe PJ. HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. Circ Res. 2015;117:65-79.

Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. Cell Mol Life Sci. 2003;60:1376-93.

Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res. 1993;10:1093-5.

Deng W, Feng X, Li X, et al. Hypoxia-inducible factor 1 in autoimmune diseases. Cell Immunol. 2016;303:7-15.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell. 2001;107:43-54.

FDA. Peginesatide Summary Basis for Approval. Center for Drug Evaluation and Research. Application Number:202799Orig1s000, Pharmacology Review. Available at URL (2019.7): https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2012/202799Orig1s000PharmR.pdf. 2012:.

Finberg KE. Unraveling Mechanisms Regulating Systemic Iron Homeostasis. Hematology. 2011;532-7.

Fishbane S, Besarab A. Mechanism of increased mortality risk with erythropoietin treatment to higher hemoglobin targets. Clin J Am Soc Nephrol. 2007;2:1274-82.

Formenti F, Beer PA, Croft QP. Cardiopulmonary function in two human disorders of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway: von Hippel-Lindau disease and HIF-2α gain-of-function mutation. FASEB J. 2011;25:2001-11.

Frazier KS, Engelhardt JA, Fant P, et al. Scientific and regulatory policy committee points-to-consider paper: Drug-induced vascular injury associated with nonsmall molecule therapeutics in preclinical development: Part I. Biotherapeutics. Toxicol Pathol. 2015;43:915-34.

Frazier KS, Seely JC. Urinary System. In: Sahota PS, Popp JA, Hardisty JF, et al., editor. Toxicologic

Pathology: Nonclinical Safety Assessment. Boca Raton, FL:CRC Press; 2013:421-84.

Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. Blood. 2003;102:783-8.

GlaxoSmithKline Document Number 2019N405983 Study ID NA. Population Pharmacokinetic Modeling, including Covariate Analysis, of Daprodustat (GSK1278863) and its Metabolites in Healthy Volunteers and Chronic Kidney Disease patients from Phase 1 and Phase 2 data. Report Date 4-Jul-2019.

Greaves P. Cardiovascular System. In: Greaves P, editor. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. 3rd ed. New York:Academic Press; 2007:270-333.

Hofherr A, Busch T, Köttgen M. HIF-1α drives cyst growth in advanced stages of autosomal dominant polycystic kidney disease. Kidney Int. 2018;94:849-51.

Hwang S, Nguyen AD, Jo Y, et al. Hypoxia-inducible factor 1α activates insulin-induced gene 2 (Insig-2) transcription for degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase in the liver. J Biol Chem. 2017;292:9382-93.

Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIFα targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O_2 sensing. Science. 2001;292:464-8.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O_2-regulated prolyl hydroxylation. Science. 2001;292:468-72.

Kraus A, Peters DJ, Klanke B, et al. HIF-1α promotes cyst progression in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. Kidney Int. 2018;94:887-99.

Lakhal S, Schödel J, Townsend AR, et al. Regulation of type II transmembrane serine proteinase TMPRSS6 by hypoxia-inducible factors: New link between hypoxia signaling and iron homeostatsis. J Biol Chem. 2011;286:4090-7.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)α: its protein stability and biological functions. Exp Mol Med. 2004;36:1-12.

Li K, Gesang L, Dan Z, et al. Transcriptome reveals 1400-fold upregulation of APOA4-APOC3 and 1100-fold downregulation of GIF in the patients with polycythemia-induced gastric injury. PLOS ONE. 2015;10:e0140534.

Liu Q, Davidoff O, Niss K, et al. Hypoxia-inducible factor regulates hepcidin via erythropoietin-induced erythropoiesis. J Clin Invest. 2012;122:4635-44.

Magnani M, Piatti E, Serafini N, et al. The age-dependent metabolic decline of the red blood cell. Mech Ageing Dev. 1983;22:295-308.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature. 1999;399:271-5.

Nguyen AD, McDonald JG, Bruick RK, et al. 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;282:27436-46.

Potter CG, Sharma AK, Farber MO, et al. Hypoglycemic neuropathy in experimental diabetes. J Neurol Sci. 1988;88:293-301.

Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. Annu Rev Physiol. 2014;76:39-56.

Semenza GL. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. N Engl J Med. 2011;365:537-47.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2003;3:721-32.

Serabian MA. FDA Toxicologist’s Review of Darbepoetin Alfa. BLA 99–1492. 2003.

Shibata J, Hasegawa J, Siemens HJ, et al. Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequence of erythrocytosis. Blood. 2003;101:4416-22.

Sidenius P, Jakobsen J. Peripheral neuropathy in rats induced by insulin treatment. Diabetes. 1983;32:383-6.

Smith TG, Brooks JT, Balanos GM, et al. Mutation of von Hippel-Lindau tumour suppressor and human cardiopulmonary physiology. PloS Med. 2006;3:e290.

Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. Blood. 2002;100:4272-90.

Tanaka T, Nangaku M. Recent advances and clinical application of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents. Exp Cell Res. 2012;318:1068-73.

Tweats DJ, Blakey D, Heflich RH. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory in vivo tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. Mutat Res. 2007;627:78-91.

Wilson JR, Douglas P, Hickey WF, et al. Experimental congestive heart failure produced by rapid ventricular pacing in the dog: cardiac effects. Circulation. 1987;75:857-67.

Woodburn KW, Schatz PJ, Fong KL, et al. Preclinical safety and pharmacology of Hematide, a peptidic erythropoiesis stimulating agent (ESA), in rats and monkeys. Drug Chem Toxicol. 2008;31:229-44.

Yu F, White SB, Zhao Q, et al. HIF-1α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline

hydroxylation. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:9630-5.

日本透析医学会. 慢性腎臓病患者における腎性貧血治療のガイドライン. 透析会誌. 2016;49(2):89-158.

薬生薬審発 0627 第 1 号通知. 「潜在的発がんリスクを低減するための医薬品中 DNA 反応性（変異原性）不純物の評価及び管理ガイドラインについて」の一部改正について. 平成 30 年 6 月 27 日. 2018.

APPENDIX 1 MODULE 4 SECTIONS WITHOUT STUDY REPORTS

The following provides brief justification for the absence of studies in certain sections of Module 4.

Pharmacodynamic Drug Interactions (4.2.1.4.): No specific pharmacodynamic drug interaction studies were conducted. However, a discussion of pharmacodynamic drug interactions, based on primary and secondary pharmacology studies provided in 4.2.1.1. and 4.2.1.2., is presented in 2.4.2.5. of the Nonclinical Overview.

Pharmacokinetic Drug Interactions (4.2.2.6.): No specific pharmacokinetic drug interaction studies were conducted. However, a discussion of pharmacokinetic drug interactions, based on distribution and metabolism studies provided in 4.2.2.3. and 4.2.2.4., is presented in 2.4.3.6. of the Nonclinical Overview.

Other Pharmacokinetic Studies (4.2.2.7.): No other pharmacokinetic studies were performed beyond the study reports included in 4.2.2.1., 4.2.2.2., 4.2.2.3., 4.2.2.4. and 4.2.2.5.; therefore, this section is not applicable.