

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）

#### 2.6. 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1. 緒言

2.6.2. 薬理試験の概要文

2.6.3. 薬理試験概要表

グラクソ・スミスクライン株式会社

## 非臨床概要 薬理試験の目次

	項目 - 頁
2.6.1. 緒言.....	2.6.1 - p.1
2.6.2. 薬理試験の概要文.....	2.6.2 - p.1
2.6.2.1. まとめ.....	2.6.2 - p.1
2.6.2.2. 効力を裏付ける試験.....	2.6.2 - p.6
2.6.2.3. 副次的薬理試験.....	2.6.2 - p.30
2.6.2.4. 安全性薬理試験.....	2.6.2 - p.34
2.6.2.5. 薬力学的薬物相互作用試験.....	2.6.2 - p.41
2.6.2.6. 考察及び結論.....	2.6.2 - p.41
2.6.2.7. 図表.....	2.6.2 - p.43
2.6.2.8. 参考文献.....	2.6.2 - p.43
2.6.3. 薬理試験概要表.....	2.6.3 - p.1
1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW FOR DAPRODUSTAT .....	2.6.3 - p.1
2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS .....	2.6.3 - p.9
3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS.....	2.6.3 - p.10
4. SAFETY PHARMACOLOGY .....	2.6.3 - p.11
5. PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS .....	2.6.3 - p.14

## 2.6.1、2.6.2 及び 2.6.3 の略号等一覧

略語 (略称)	内容
$\alpha$ -KG	$\alpha$ ケトグルタル酸
ANOVA	一元配置分散分析
AUC	血漿中濃度-時間曲線下面積
BMP-6	骨形成蛋白質 6
CKD	慢性腎臓病
Cmax	最高血漿中濃度
CODDD	C 末端酸素依存性分解ドメイン
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
CTAD	C 末端活性化ドメイン
CXCL5	CXC モチーフケモカイン 5
DFX	deferoxamine
DMEM	ダルベッコ改変イーグル培地
DMSO	ジメチルスルホキシド
EC50	50%有効濃度
ECC	遠心性収縮
ECG	心電図
ELISA	酵素結合免疫吸着アッセイ
EPO	エリスロポエチン
ESA	赤血球造血刺激因子製剤
FBS	ウシ胎児血清
FIH	低酸素誘導因子阻害因子
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-P-デヒドロゲナーゼ
Glut-1	グルコーストランスポーター1
Hb	ヘモグロビン
Hct	ヘマトクリット
HEK293	ヒト胎児由来腎細胞
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
hNa <sub>v</sub> 1.5	ヒト電位依存性ナトリウムチャンネル 1.5 サブタイプ
HO-1	ヘムオキシゲナーゼ 1
HPMC	ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IC50	50%阻害濃度
Ki	阻害定数
KU812	ヒト白血病細胞
LANCE アッセイ	ランタニドキレートを利用したホモジニアス時間分解蛍光アッセイ
LC-MRM-MS	多重反応検出法による液体クロマトグラフィー質量分析
LC-SIM-MS	選択イオン検出法による液体クロマトグラフィー質量分析
MSD	Meso Scale Discovery
PDK1	ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 1
PGK-1	ホスホグリセリン酸キナーゼ 1
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
(Pro-Pro-Gly) <sub>10</sub>	天然コラーゲンのモデルペプチド
PRVP	右室収縮期圧

略語 (略称)	内容
pVHL	von Hippel-Lindau 腫瘍抑制蛋白
QT	ECG 波形の Q 波の開始から T 波の終わりまで
QTc	補正 QT
rh	遺伝子組換えヒト
RT-PCR	リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法
$t_{1/2}$	解離半減期
TdP	torsades de pointes
Tp-e	心電図波形の T 波の頂点から終末までの時間
VEGF-A	血管内皮増殖因子 A

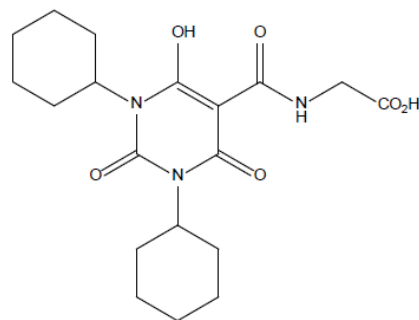
### 2.6.1. 緒言

ダプロデュスタット (GSK1278863 とも記載) は低酸素誘導因子 (HIF) プロリル-4-ヒドロキシラーゼ (PHD) に対する強力な阻害薬であり、*in vitro* で3種類の PHD アイソフォーム (PHD1~3) に対して同程度の阻害作用を示した。また、ダプロデュスタットは PHD2 及び PHD3 に対して  $\alpha$  ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) 競合的な阻害作用を示し、PHD1~3 に対する作用は  $\alpha$ -KG 依存性酵素であるコラーゲンプロリルヒドロキシラーゼ及び HIF 阻害因子に対する作用と比較して 400 倍以上の選択性を示した。

マウスにダプロデュスタットを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。ラットにダプロデュスタットを投与したときには、肝臓の EPO mRNA 量は増加したものの血漿中 EPO 濃度の上昇はみられず、これはダプロデュスタットの用量がマウスの試験での用量と比較して低かったことによると考えられる。また、マウス、ラット、イヌ及びサル の 反 復 経 口 投 与 毒 性 試 験 に お いて、ダプロデュスタットの投与によりおおむね用量依存的な赤血球系パラメータの上昇が認められた。そこで、ダプロデュスタットは腎性貧血患者に長期投与する治療薬として開発された。

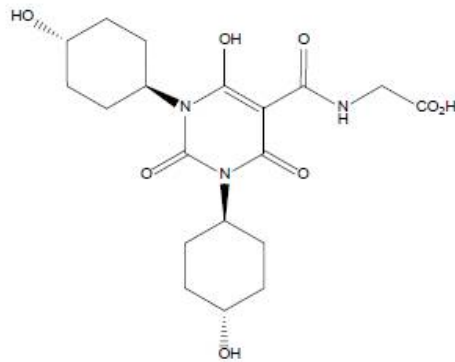
3 種類 の 主 な ヒ ト 代 謝 物 (M2、M3、M13) を 含 む 6 種 類 の ヒ ト 代 謝 物 (M2、M3、M4、M5、M6、M13) 及びこれらのうちキラル中心を有する 5 種類の代謝物のキラリティ (M3、M4、M5、M6、M13 はキラル中心を有することから複数の立体異性体が存在し、M2 はキラル中心を有しない) については 2.6.4.1. に記載した。

ダプロデュスタットはケト/エノール互変異性を示し、これらの構造類似性は代謝物でも同様であると考えられている (2.3.S.1.2.)。参考として、ダプロデュスタット及び3種類の主なヒト代謝物のエノール形に相当する構造式を図 2.6.1-1 に示す。

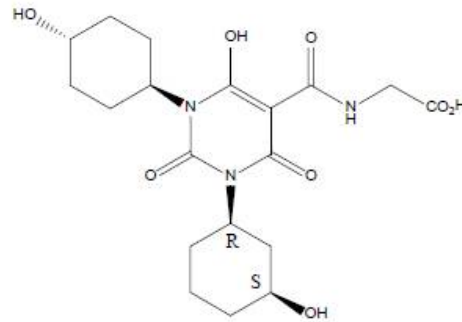
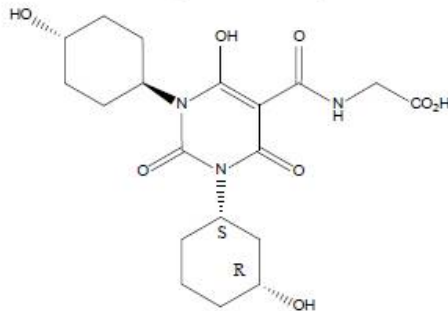


Daprodustat (GSK1278863)

## Major metabolites of daprodustat (including relevant stereoisomers)

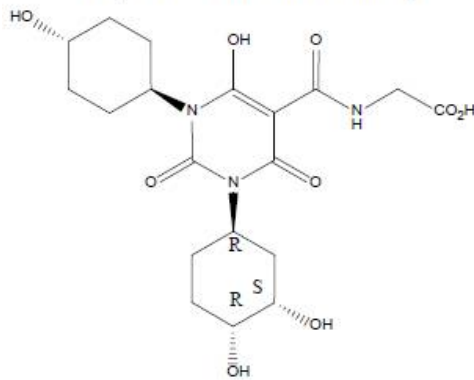


M2 (GSK2391220)



M3 (GSK2531403 stereoisomer)

M3 (GSK2506104 stereoisomer)



M13 (GSK2531401 stereoisomer)

図 2.6.1-1 ダプロデュスタット及び主なヒト代謝物の構造式

ダプロデュスタットは腎性貧血の治療において最高 24 mg（体重 54 kg として 0.44 mg/kg に相当する）を 1 日 1 回経口投与する。日本人透析患者に最高臨床用量である 24 mg を投与したときの非透析日における推定曝露量として、最高血漿中濃度（C<sub>max</sub>）は 0.485 µg/mL、血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は 1.184 µg·hr/mL であった[2019N405983]。これらの値は腎性貧血の治療において推定されるダプロデュスタットの最大曝露量と考えられることから、2.6.での非臨床試験に使用した動物種の無毒性量での曝露量とヒト曝露量の比較にはこれらの値を用いた。

ダプロデュスタットの効力を裏付ける試験として、PHD に対する阻害活性、並びにマウス及びラットでの薬理作用について検討する試験を実施した。使用した実験モデルはダプロデュスタットが臨床効果を示す可能性を評価するのに適切なものであった。また、標準的な安全性薬理試験を実施した。

ダプロデュスタットのヒトでの安全性評価をサポートするため、毒性試験に使用した動物種での薬物動態 (PK)、分布、代謝及び排泄試験を実施して特性を評価し、薬物相互作用を予測する試験を実施した。

ダプロデュスタットの毒性について、PK プロファイルを考慮して、包括的な毒性評価を行った。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 週間反復投与試験により評価した。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、マウス及びラットの 2 年間投与試験により評価した。生殖発生毒性については、ラット及びウサギを用いて経口投与による一連の生殖発生毒性試験により評価した。その他の試験として、ラット及びヒト全血を用いた溶血性試験を実施した。また、ラットを用いて、経口投与時にみられた消化管への影響に関する静脈内投与探索試験、及び血糖値への影響に関する経口投与探索試験を実施した。更に、*in vitro* で M13 のトポイソメラーゼ II に対する影響を評価した。一部の反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験では、3 種類の主なヒト代謝物を皮下に併用投与した。

ダプロデュスタットの主要な安全性薬理及び毒性試験は GLP に従って実施した。毒性及び薬物動態試験の用量設定試験も GLP の一般原則に従って実施した。主要な安全性薬理、毒性及び一部の薬物動態試験はいずれも OECD 加盟国において OECD ガイドラインに従って実施した。

2.6.に記載した試験の多くはダプロデュスタットの親化合物を用いて実施したが、一部の薬物動態、分布、代謝及び排泄試験はカリウム塩、トリスー水和物塩又は[14C]標識したダプロデュスタットを用いて実施し、また、一部の非臨床試験は 6 種類のヒト代謝物を用いて実施した。すべての用量及び濃度（血漿中薬物濃度を含む）はダプロデュスタット又は代謝物の親化合物の量として表した。

安全性薬理及び毒性試験に使用した原薬のバッチ情報及び被験物質調製法の一覧表を 2.6.2.及び 2.6.6.に示した。市販製剤の製剤化に供する原薬中の不純物については、ICH Q3A に従ってコントロールされている。

薬理、薬物動態及び毒性試験の概要を 2.6.2.~2.6.7.に記載した。各試験の最終報告書を 4.2.に添付した。

## 参考文献

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.

## 2.6.2. 薬理試験の概要文

### 2.6.2.1. まとめ

ダプロデュスタット (GSK1278863 とも記載) は低酸素誘導因子 (HIF) プロリル-4-ヒドロキシラーゼ (PHD) に対する強力な阻害薬であり、1 日 1 回の経口投与により腎性貧血を改善することが期待されている。ダプロデュスタットは *in vitro* で 3 種類の PHD アイソフォーム (PHD1~3) に対して同程度の阻害作用を示した。また、ダプロデュスタットは PHD2 及び PHD3 に対して  $\alpha$  ケトグルタル酸 ( $\alpha$ -KG) 競合的な阻害作用を示し、PHD1~3 に対する作用は  $\alpha$ -KG 依存性酵素である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) に対する作用と比較して 400 倍以上の選択性を示した。

腎性貧血の治療に関連するダプロデュスタットの効力を裏付ける試験として、一連の *in vitro* 試験及び経口投与による *in vivo* 試験を実施した。これらの試験でダプロデュスタットはエリスロポエチン (EPO) 等の HIF 応答性遺伝子の発現を上昇させ、げっ歯類への反復投与により赤血球産生を誘導した。また、開発を中止した他の適応症に関連する効力試験を実施しており、その成績を本項に記載している。更に、ダプロデュスタットの副次的薬理試験を実施し、安全性薬理試験として *in vitro* 試験並びにラット及びイヌの *in vivo* 試験を実施した。

腎性貧血を伴う慢性腎臓病 (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の総曝露量の 10% 超であったが、他の 3 種類の血中ヒト代謝物 (M4、M5、M6) は薬物関連物質の総曝露量の 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.)。また、ヒト血漿試料を用いて M3 及び M13 のキラル分析を実施し、血中に存在する M3 及び M13 の主な立体異性体はそれぞれ GSK2536104 及び GSK2531401 であることが確認されている (2.6.4.1.)。立体異性体の分離・分析法が確立されて M3 の立体異性体である GSK2531403 がヒト血中で検出されないことが確認される以前に実施した *in vitro* 薬理試験では、GSK2531403 を含む代謝物の評価を行っている。本項ではこれらの 9 化合物 (GSK2391220 (M2)、GSK2506104 (M3)、GSK2531403 (M3)、GSK2487818 (M4)、GSK2531399 (M5)、GSK2506102 (M5)、GSK2531398 (M6)、GSK2531407 (M6)、GSK2531401 (M13)) を 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 (表 2.6.2-1)。



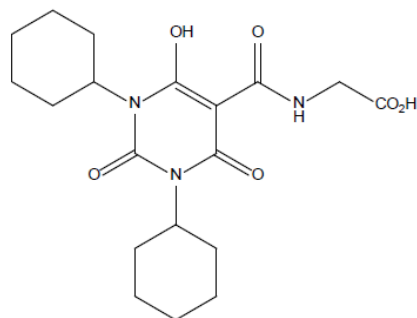
表 2.6.2-1 薬理試験で検討したダプロデュスタットの6種類のヒト代謝物  
(関連する立体異性体を含む)

代謝物番号	化合物番号
M2 <sup>a</sup>	GSK2391220
M3 <sup>b</sup>	GSK2531403
M3 <sup>a</sup>	GSK2506104
M4 <sup>c</sup>	GSK2487818
M5 <sup>c</sup>	GSK2506102
M5 <sup>c</sup>	GSK2531399
M6 <sup>c</sup>	GSK2531407
M6 <sup>c</sup>	GSK2531398
M13 <sup>a</sup>	GSK2531401

M2 はキラル中心を有していないが M3、M4、M5、M6 及び M13 は立体異性体が存在する代謝物

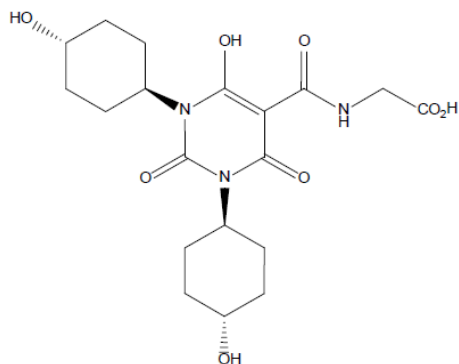
a : 血中曝露量が薬物関連物質の総曝露量の 10%を超える代謝物、b : 初期の in vitro 薬理試験でのみ検討、  
c : 血中曝露量が薬物関連物質の総曝露量の 10%を下回る代謝物

ダプロデュスタットはケト/エノール互変異性を示し、これらの構造類似性は代謝物でも同様であると考えられている (2.3.S.1.2.)。参考として、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) 9 化合物のエノール形に相当する構造式を図 2.6.2-1 に示す。

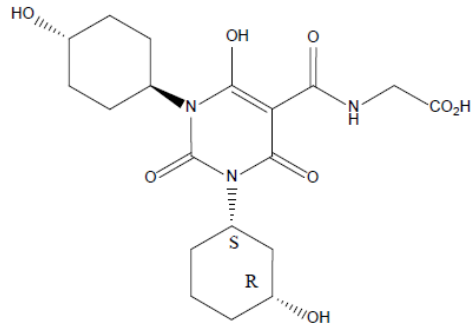


Daprodustat (GSK1278863)

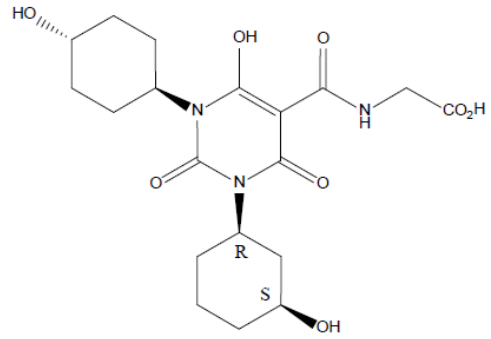
Predominant metabolites of daprodustat (including relevant stereoisomers)



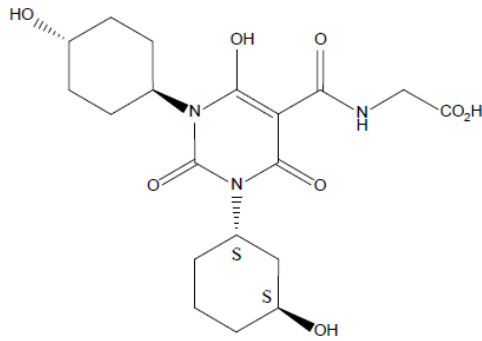
M2 (GSK2391220)



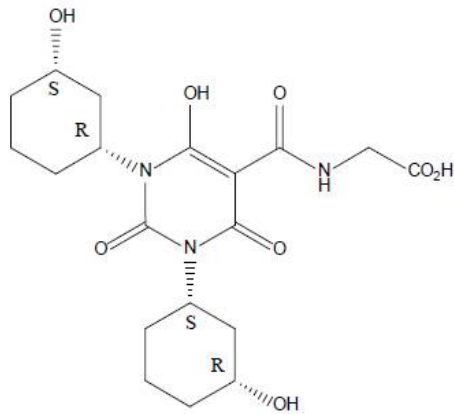
M3 (GSK2531403 stereoisomer)



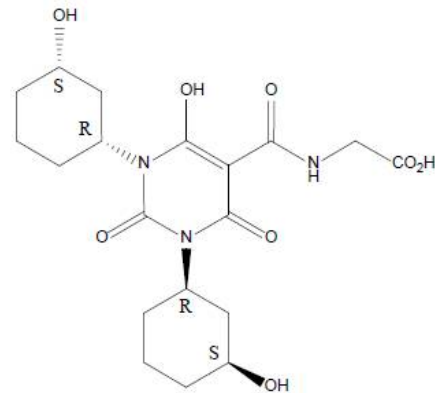
M3 (GSK2506104 stereoisomer)



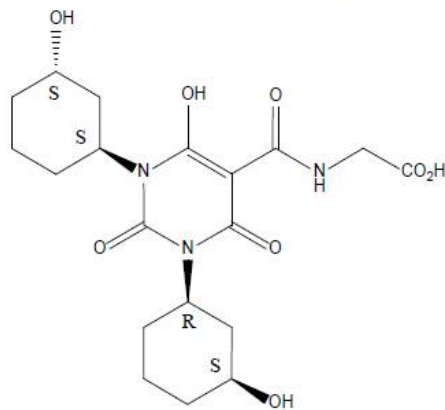
M4 (GSK2487818 stereoisomer)



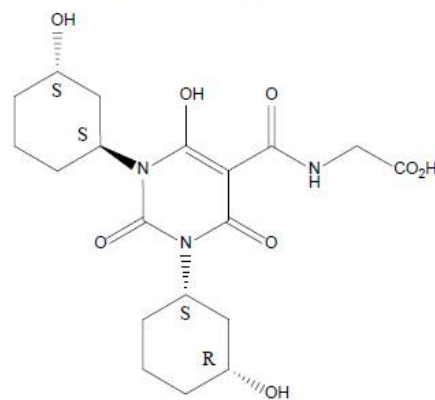
M5 (GSK2531399 stereoisomer)



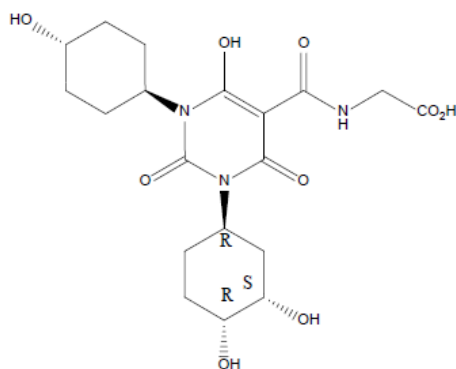
M5 (GSK2506102 stereoisomer)



M6 (GSK2531398 stereoisomer)



M6 (GSK2531407 stereoisomer)



M13 (GSK2531401 stereoisomer)

### 図 2.6.2-1 ダプロデュスタット及び代謝物の構造式

ダプロデュスタットの薬理試験は、特記しない限り臨床使用予定である GSK1278863A (GSK1278863 の親化合物) を用いて実施した。本項ではダプロデュスタットのすべての用量及び濃度 (血漿中薬物濃度を含む) を親化合物の量として表した。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験は適切な試験方法に従って実施した。スクリーニングとして実施したヒト ether-a-go-go 関連遺伝子 (hERG) 及びヒト電位依存性ナトリウムチャンネル 1.5 サブタイプ (hNav1.5) のアッセイ、ウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本アッセイ並びに急性低酸素曝露ラットの心血管系に関する探索試験は適切な試験方法に従って非 GLP 下で実施した。主要な安全性薬理試験は OECD 加盟国で GLP 及び OECD ガイドラインに従って実施した。実施した試験の一覧、最終報告書の添付場所及び GLP 適用状況をそれぞれ表 2.6.2-2、表 2.6.2-13 及び表 2.6.2-14 に示した。安全性薬理試験の概要表は 2.6.3.4. に記載した。

ダプロデュスタットの安全性薬理試験に用いた原薬は製法 A により製造され、その不純物含量は市販製剤の製剤化に供する原薬中で規定される量を下回っていた (2.3.S.4.4.)。安全性薬理試験に用いた原薬 (製法 A) は市販予定製剤の原薬 (製法 B3) とは合成経路が異なる (2.3.S.2.6.3.)。市販製剤の製剤化に供する原薬中の特定の不純物 (GW342946X 及び GSK1714346A、 $\leq 0.15\%$ ) については、ICH Q3A に従って適切にコントロールされている (2.3.S.2.6.、2.3.S.4.5.)。安全性薬理試験に用いた原薬のバッチ情報及び被験物質調製法の一覧を表 2.6.2-15 に記載した。

ダプロデュスタットの薬理試験成績を以下に要約する。各試験の方法及び成績を 2.6.2.2.~2.6.2.5. に、薬理試験成績に関する全般的な評価は 2.6.2.6. の考察及び結論に記載した。

#### 効力を裏付ける試験

酵素アッセイにおいて、ダプロデュスタットはラット、イヌ又はヒトの PHD1~3 に対していずれも同程度の阻害作用を示した。ダプロデュスタットのヒト PHD2 及び PHD3 に対する作用はいずれも可逆的で  $\alpha$ -KG に競合的な阻害様式であることが示唆され、ヒト PHD1~3 に対する阻害定数 ( $K_i$ ) は 1.8~7.3 nM であった。サル PHD の触媒ドメインの配列はヒトと相同性が高いことから、サル PHD に対するダプロデュスタットの阻害作用はヒト PHD に対する阻害作用と同程度と予想される。ダプロデュスタットのヒト PHD1~3 に対する阻害作用

(IC50) は、関連酵素である CP4H 及び FIH に対する阻害作用と比較して 400 倍以上の強さを示した。

In vitro において、ヒト肝がん細胞株 (Hep3B 細胞株) をダプロデュスタットで処理することにより HIF $\alpha$  の蓄積がみられた。このとき HIF $\alpha$  は安定化し、HIF $\beta$  とのダイマー形成及び HIF 応答性遺伝子の転写を活性化させると考えられる。ダプロデュスタットは Hep3B 細胞株の EPO 及び血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) の蛋白質量をそれぞれ 5.8 及び 2.2 倍に増加させた。ダプロデュスタットは in vitro で骨形成蛋白質 6 (BMP-6) による Hep3B 細胞株のヘプシジン mRNA 量の増加に対して抑制作用を示したことから、鉄輸送/利用を改善させる可能性が示唆された。一方、遺伝子組換えヒト EPO (rhEPO) はヘプシジン mRNA 量の増加を抑制しなかった。

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 in vitro での PHD1~3 に対する阻害作用は、ダプロデュスタットと同程度であった。検討した代謝物の PHD に対する作用はダプロデュスタットと同様にいずれも選択的であり、CP4H 及び FIH に対する作用と比較して 900 倍超の選択性を示した。また、Hep3B 細胞株のアッセイで 6 種類のヒト代謝物 (関連する立体異性体を含む) は EPO 産生を増加させなかった。

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、血漿中 EPO 濃度は投与 8 時間後から一過性に上昇し、投与 16 時間後にはベースラインまで低下した。ラットにダプロデュスタットの 1, 3 及び 10 mg/kg/日を単回又は 3 日間反復経口投与しても血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度の上昇はみられなかったが、10 及び 30 mg/kg の単回経口投与では肝臓で EPO mRNA 量の増加がみられた。マウスにダプロデュスタットの 3, 10 及び 30 mg/kg/日を 8 日間反復経口投与したときに、ヘモグロビン (Hb)、ヘマトクリット (Hct)、赤血球数又は網状赤血球数の上昇がみられた。ダプロデュスタットの網状赤血球数に対する作用には用量依存性がみられたが、他のパラメータに対する作用は低用量で最大作用に到達した。

ダプロデュスタットの 3 種類の子なヒト代謝物 M2、M3 (GSK2506104) 及び M13 (GSK2531401) のそれぞれ 2.0、2.5 及び 1.3 mg/kg/日を混合液としてマウスに 28 日間反復皮下投与したときに、試験 29 日の Hb、Hct 及び赤血球数はわずかに上昇した。

運動負荷により筋損傷を誘発し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、筋機能低下を抑制し、非傷害時の脚力にまで回復するのに要する時間を短縮させた。

### 副次的薬理試験

50 種類以上の受容体、酵素及びイオンチャネルのアッセイを用いた選択性の評価において、ダプロデュスタットは明らかな作用を示さなかった。また、6 種類のヒト代謝物 (関連する立体異性体を含む) は、6 種類の標的分子クラスに関する 46 種類のアッセイにおいて 200  $\mu$ M までの濃度で明らかな作用を示さなかった。ダプロデュスタットは 10  $\mu$ M までの濃度で 7 種類のプロテインキナーゼに対して阻害作用を示さなかった。ダプロデュスタットはラットシクロオキシゲナーゼ (COX) 1 に対して弱い阻害作用を示したが (IC50 は 65.9  $\mu$ M)、ラット及びヒト COX2 に対しては作用を示さなかった。ダプロデュスタットの COX1 に対する阻害作用は陽性対照薬であるインドメタシンの作用と比較して 1/30 の強さであった。

CD34 陽性赤芽球前駆細胞をダプロデュスタットで処理したときに、ヒト Hb $\gamma$  鎖の蛋白質量に影響はみられず、PHD 阻害によりヒト Hb $\gamma$  鎖の産生は誘導されなかった。

### 安全性薬理試験

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、神経行動学的及び薬理的な影響はみられなかった。

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、換気機能、気道抵抗及び体温に対して投与に関連する影響はみられなかった。

スクリーニング試験において、ダプロデュスタット (75  $\mu$ M まで) 及び 6 種類のヒト代謝物 (関連する立体異性体を含む、30  $\mu$ M まで) は hERG テール電流及び hNav1.5 チャネルに対して有意な阻害作用を示さなかった。GLP 試験として実施した hERG アッセイでも、ダプロデュスタットは最高溶解濃度である 47.66  $\mu$ M (18.75  $\mu$ g/mL に相当) で hERG テール電流に対して有意な阻害作用を示さなかった。ウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本アッセイにおいて、ダプロデュスタットは 100  $\mu$ M までの濃度で torsades de pointes (TdP) 及び伝導依存的な不整脈の誘発を示唆する影響を示さなかった。

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影響を検討する目的でダプロデュスタットの 30 mg/kg/日までを 5 日間反復経口投与したときに、急性低酸素応答時のいずれの心血管系パラメータにも影響を示さなかった。

イヌにダプロデュスタットの 30 及び 90 mg/kg を単回経口投与したときに、それぞれ投与 14~24 時間後及び 10~24 時間後に心拍数の軽度増加 (それぞれ最大 20 及び 21 回/分) が一過性にみられた。この心拍数の増加は動脈圧の変化を伴っていなかった。90 mg/kg までの用量で補正 QT (QTc) に影響はみられず、ダプロデュスタットの投与に関連する心電図 (ECG) 波形異常及び不整脈を示唆する所見はみられなかった。

### 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

#### 2.6.2.2. 効力を裏付ける試験

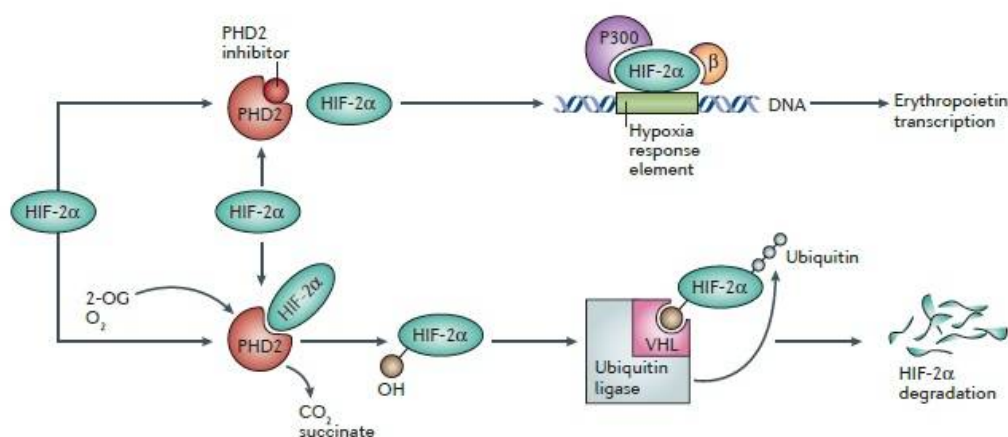
貧血は CKD 患者でよくみられる症状であり、その原因は EPO の相対的又は絶対的欠乏、慢性炎症に関連する鉄利用能の低下及び消化管出血等と様々である。貧血によって酸素供給が不十分になる (低酸素症) と、細胞の機能不全や細胞死を引き起こす可能性がある。低酸素症では血中酸素濃度の低下に応答し、腎臓及び肝臓で EPO が産生されて骨髄での赤血球産生が促進されるが、腎障害を合併する CKD 患者では、Hb が低下したときに低酸素症に応答した腎臓での EPO 産生が不十分になると考えられている [日本透析医学会, 2016]。腎性貧血に対する既存の治療法には、鉄補充療法、rhEPO である赤血球造血刺激因子製剤 (ESA) の投与及び輸血が挙げられるが、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。

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]。HIF1 は  $\alpha$  及び  $\beta$  サブユニットからな

るヘテロダイマーであるが、HIF2 $\alpha$  も HIF1 $\beta$  とヘテロダイマーを形成する。正常酸素状態では HIF $\alpha$  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 (図 2.6.2-2)。このユビキチン化を介する HIF $\alpha$  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, 2016; Maxwell, 1999]、HIF $\alpha$ -pVHL 相互作用に必要な認識エレメントには HIF $\alpha$  の水酸化プロリン残基が含まれている [Ivan, 2001; Jaakkola, 2001]。HIF $\alpha$  は 2 ヲ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。

PHD は鉄及び  $\alpha$ -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 HIF $\alpha$  が蓄積し (安定化)、HIF $\beta$  とダイマーを形成して EPO、VEGF-A、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及び鉄代謝や酸素利用の上昇に関わる因子 (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 HIF 応答性遺伝子の発現を上昇させる [Epstein, 2001; Ivan, 2001; Jaakkola, 2001; Yu, 2001]。HIF 応答性遺伝子は糖取込み、解糖、赤血球産生刺激による酸素運搬の上昇、鉄代謝/輸送、血管新生、並びに低酸素状態での細胞生存及び増殖の促進等の多様な機能に関与している [Semenza, 2003]。

PHD 活性の阻害により低酸素症に対する応答が誘導され、プロテアソームによる HIF $\alpha$  の分解が抑制されて HIF $\alpha$  が安定化し、低酸素症に対する応答に関わる遺伝子の発現を促進すると考えられる (図 2.6.2-2)。HIF $\alpha$  が安定化すると赤血球産生経路が刺激され、赤血球産生が誘導されて貧血が改善される。したがって、PHD 阻害薬は 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。



OH : 水酸化プロリン残基、P300 : 転写コアクチベーターp300

Data source: [Maxwell, 2016]

図 2.6.2-2 HIF 経路による EPO 産生の調節

実施した効力を裏付ける試験の一覧及び最終報告書の CTD における添付場所を表 2.6.2-2 図 2.6.2-2 に記載した。

表 2.6.2-2 ダプロデュスタット及びヒト代謝物の効力を裏付ける試験

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
<b>In vitro studies with Daprodustat</b>							
Inhibition of PHD1, PHD2 and PHD3 enzymatic activities	Rat PHD2 and PHD3, Dog PHD3, Human PHD 1, PHD2 and PHD3 / LANCE assays <sup>a</sup>	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036 2011N121507	4.2.1.1. 4.2.1.1.
Mode of inhibition	PHD2 and PHD3 LANCE assays <sup>a</sup>	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036	4.2.1.1.
Selectivity against other $\alpha$ -KG- dependent iron di-oxygenases	CP4H and FIH enzyme assays	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036	4.2.1.1.
HIF stabilization	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00026	4.2.1.1.
Effect on EPO and VEGF-A production	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00024	4.2.1.1.
Effects on mRNA levels and protein secretion of selected HIF responsive genes	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00027	4.2.1.1.
Effects on hepcidin expression	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2009/00011	4.2.1.1.
<b>In vitro studies with metabolites of Daprodustat</b>							
Inhibition of PHD1, PHD2 and PHD3 enzymatic activities	Rat PHD2 and PHD3, Dog PHD3, Human PHD 1, PHD2 and PHD3 enzyme assays	In vitro	A	No	GSK	2011N121507	4.2.1.1.



Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Selectivity against other $\alpha$ -KG- dependent iron di-oxygenases	CP4H and FIH enzyme assays	In vitro	A	No	GSK	2011N121507	4.2.1.1.
Effect on EPO production	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	2012N134715	4.2.1.1.
<b>In vivo studies with Daprodustat supporting anemia</b>							
Effect on EPO and PGK-1 mRNA and EPO protein levels	Mouse (B6D2F1)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00022	4.2.1.1.
Effect on EPO and VEGF-A levels in plasma	Mouse (B6D2F1)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00023	4.2.1.1.
EPO and HIF-related gene expression	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	A	No	GSK	2011N126015 (I11211)	4.2.1.1.
Effect on erythropoiesis	Mouse (B6D2F1)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00028	4.2.1.1.
Effect on erythropoiesis	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00025	4.2.1.1.
<b>In vivo studies with metabolites of Daprodustat</b>							
Evaluation of M13	Mouse (CD-1)	IV (bolus)	A	No	GSK	2012N156583 (12DMM041)	4.2.1.1.
Evaluation of M2, M3 & M13	Mouse (CD-1)	SC (Injection)	A	No	GSK	2014N208198 (M70590N)	4.2.1.1.



Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
<b>In vivo studies for other indications<sup>b</sup></b>							
Effect on limb function after muscle damage	Mouse (C57/BL6)	Oral (gavage)	A	No	GSK	2014N197528	4.2.1.1.
HIF target gene expression and systemic exposure	Mouse (C57/BL6)	Topical	A	No	GSK	2011N118983	4.2.1.1.
Evaluation of topical formulations on mouse skin	Mouse (C57/BL6)	Topical	A	No	GSK [REDACTED]	2012N155204	4.2.1.1.

**Key:**

a = A homogeneous time resolved fluorescence quenching assay based on lanthanide chelates.

b = Studies were designed to support indications and/or routes of administration that are no longer being pursued.

A = GSK1278863A, the parent form.

$\alpha$ -KG =  $\alpha$ -ketoglutarate. CP4H = Collagen prolyl hydroxylase. EPO = Erythropoietin. FIH = Factor inhibiting HIF.

Hep3B = Human hepatocellular carcinoma cell line. HIF = Hypoxia-inducible factor. mRNA = Messenger RNA.

M2 = M2 metabolite of daprodustat (also known as GSK2391220).

M3 = One of two chiral M3 metabolites of daprodustat (also known as GSK2506104)

M13 = One of two chiral M13 metabolites of daprodustat (also known as GSK2531401).

PGK-1 = Phosphoglycerate kinase-1.

PHD1 = Prolyl-4-hydroxylase 1.

PHD2 = Prolyl-4-hydroxylase 2.

PHD3 = Prolyl-4-hydroxylase 3.

SC = Subcutaneous.

VEGF-A = Vascular endothelial growth factor A.

**Testing Facility:**

GSK = GlaxoSmithKline.

[REDACTED] = [REDACTED]

### 2.6.2.2.1. In vitro 試験

#### 2.6.2.2.1.1. PHD1~3 の酵素活性に対する阻害作用

ヒト PHD1~3、ラット PHD2 及び PHD3 並びにイヌ PHD3 の酵素活性に対するダプロデュスタット (0.0006~50  $\mu\text{M}$ ) の作用を蛍光検出による in vitro の LANCE アッセイ (ランタニドキレートを利用したホモジニアス時間分解蛍光アッセイ) で検討した (UH2008/00036、2011N121507)。ダプロデュスタット、PHD 及び反応バッファーをアッセイプレートに分注し、30 分間室温でプレインキュベーションを行った。基質 (Cy5 標識した HIF1 $\alpha$  CODDD (C 末端酸素依存性分解ドメイン) 又は HIF2 $\alpha$  CODDD) を添加し、30 分間反応させて蛍光強度を測定した。

ダプロデュスタットはヒト PHD1~3 に対して同程度の阻害作用を示し、見かけの阻害定数 (Ki) はそれぞれ 1.8、7.3 及び 1.8 nM であった (表 2.6.2-3)。また、ラット PHD2 及び PHD3 並びにイヌ PHD3 に対するダプロデュスタットの阻害作用はヒト PHD1~3 に対する阻害作用と同程度であり、Ki はそれぞれ 1.2、2.2 及び 2.0 nM であった (表 2.6.2-3)。

これらのことから、ダプロデュスタットはヒト、ラット及びイヌ PHD に対して同程度の阻害作用を示すと考えられる。

表 2.6.2-3 PHD1~3 に対するダプロデュスタットの阻害作用

酵素	基質	IC50 <sup>a</sup> (nM)	見かけの Ki <sup>b</sup> (nM)	アッセイ	報告書番号
ヒト PHD1	HIF1 $\alpha$ <sup>c</sup>	3.5 (n=2)	1.8 (n=2)	LANCE	2011N121507
ヒト PHD2	HIF1 $\alpha$ <sup>c</sup>	22.2 (n=10)	7.3 (n=10)	LANCE	UH2008/00036
ヒト PHD3	HIF2 $\alpha$ <sup>d</sup>	5.5 (n=10)	1.8 (n=10)	LANCE	UH2008/00036
ヒト PHD2	HIF1 $\alpha$ <sup>c</sup>	3.3 (n=2)	1.7 (n=2)	LANCE	2011N121507
ラット PHD2	HIF1 $\alpha$ <sup>c</sup>	2.4 (n=2)	1.2 (n=2)	LANCE	2011N121507
ヒト PHD3	HIF2 $\alpha$ <sup>d</sup>	8.9 (n=2)	4.4 (n=2)	LANCE	2011N121507
ラット PHD3	HIF2 $\alpha$ <sup>d</sup>	4.3 (n=2)	2.2 (n=2)	LANCE	2011N121507
イヌ PHD3	HIF2 $\alpha$ <sup>d</sup>	4.1 (n=2)	2.0 (n=2)	LANCE	2011N121507

a : プレインキュベーションは 30 分間、b : 競合的阻害に適用する Cheng-Prusoff 式を用いて見かけの Ki を算出、c : HIF1 $\alpha$  の C 末端酸素依存性分解ドメイン (CODDD) を使用、d : HIF2 $\alpha$  の CODDD を使用

Data source: UH2008/00036 Table 1, 2011N121507 Table 2, Table 3

#### 2.6.2.2.1.2. PHD に対する阻害様式

PHD2 及び PHD3 に対する阻害様式を検討するため、種々の濃度の  $\alpha$ -KG (PHD2 : 0.074~6  $\mu\text{M}$ 、PHD3 : 2.5~200  $\mu\text{M}$ ) の存在下で LANCE アッセイを行った (UH2008/00036)。時間依存性の検討では、PHD2 又は PHD3 とダプロデュスタット (それぞれ 0.0041~80  $\mu\text{M}$ 、0.00064~12.5  $\mu\text{M}$ 、n=10) を 1~5 分間室温でプレインキュベーションした後、2.6.2.2.1.1. と同様の方法で反応させて蛍光強度を測定し、50%阻害濃度 (IC50) を算出した。

ダプロデュスタットの PHD2 及び PHD3 に対する IC50 は、いずれも  $\alpha$ -KG 濃度の増加に伴って直線的に増加したことから  $\alpha$ -KG に競合的な阻害様式であることが示唆された。プレインキュベーションを 30 分間としたときのダプロデュスタットのヒト PHD2 及び PHD3 に対する IC50 (それぞれ 22.2 及び 5.5 nM) と、1~5 分間としたときの IC50 との比 (1 分間/30 分間) はそれぞれ 64 及び 144 であった (表 2.6.2-4)。したがって、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であることが示唆された。また、希釈実験においてダプロデュスタットの PHD2 及び PHD3 に対する阻害作用は可逆的であることが示された。PHD2 及び PHD3 に対するダプロデュスタットの解離半減期 ( $t_{1/2}$ ) はそれぞれ 92 及び 132 分であり、ダプロデュスタットと PHD2 及び PHD3 の解離は緩やかであることが示された (表 2.6.2-4)。この  $t_{1/2}$  は  $K_i$  を算出したときのプレインキュベーション時間 (30 分間) よりも長いことから、PHD2 及び PHD3 に対するダプロデュスタットの真の  $K_i$  は見かけの  $K_i$  (それぞれ 7.3 及び 1.8 nM) よりも低値であると考えられる。

表 2.6.2-4 PHD2 及び PHD3 に対するダプロデュスタットの阻害様式

酵素	基質	IC50 <sup>a</sup> (nM)	IC50 比 (1 分間/30 分間)	見かけの $K_i$ <sup>b</sup> (nM)	$t_{1/2}$ (分)
ヒト PHD2	HIF1 $\alpha$ <sup>c</sup>	22.2 (n=10)	64 (n=2)	7.3 (n=10)	92 (n=2)
ヒト PHD3	HIF2 $\alpha$ <sup>d</sup>	5.5 (n=10)	144 (n=1)	1.8 (n=10)	132 (n=4)

a : プレインキュベーションは 30 分間、b : Cheng-Prusoff 式を用いて算出、c : HIF1 $\alpha$  の CODDD を使用、  
d : HIF2 $\alpha$  の CODDD を使用

Data source: UH2008/00036 Table 1, Table 2, Table 3

### 2.6.2.2.1.3. 他の $\alpha$ -KG 依存性鉄ジオキシゲナーゼに対する選択性

PHD と同様に  $\alpha$ -KG 依存性鉄ジオキシゲナーゼスーパーファミリーに属する CP4H 及び FIH に対するダプロデュスタットの阻害作用を検討した (UH2008/00036)。CP4H 又は FIH とダプロデュスタット (CP4H : 0.01~665  $\mu$ M, FIH : 0.02~400  $\mu$ M, n=2~3) を室温で 30 分間プレインキュベーションし、それぞれの基質と反応バッファーを添加してアッセイを行った。

CP4H 及び FIH に対するダプロデュスタットの IC50 はそれぞれ 200  $\mu$ M 超及び 9.8  $\mu$ M であり、PHD に対する IC50 のそれぞれ 9000 倍超及び約 441 倍であった (表 2.6.2-5)。

以上のことから、ダプロデュスタットの PHD に対する阻害作用の選択性は、CP4H 及び FIH に対する阻害作用と比較して 400 倍以上であることが示された。

表 2.6.2-5  $\alpha$ -KG 依存性鉄ジオキシゲナーゼに対するダプロデュスタットの阻害作用

酵素	基質	IC50 <sup>a</sup>	見かけの $K_i$ <sup>b</sup>	アッセイ
ヒト PHD1 <sup>c</sup>	HIF1 $\alpha$ <sup>d</sup>	3.5 nM (n=2)	1.8 nM (n=2)	LANCE
ヒト PHD2	HIF1 $\alpha$ <sup>d</sup>	22.2 nM (n=10)	7.3 nM (n=10)	LANCE
ヒト PHD3	HIF2 $\alpha$ <sup>e</sup>	5.5 nM (n=10)	1.8 nM (n=10)	LANCE
ヒト CP4H	プロコラーゲン	>200 $\mu$ M (n=2)	-	CO <sub>2</sub> 放出
ヒト CP4H <sup>c</sup>	プロコラーゲン	>100 $\mu$ M (n=2)	>50 $\mu$ M (n=2)	LC-SIM-MS
ヒト FIH	HIF1 $\alpha$ <sup>d</sup>	9.8 $\mu$ M (n=2)	-	CO <sub>2</sub> 放出
ヒト FIH <sup>c</sup>	HIF1 $\alpha$ <sup>d</sup>	1.4 $\mu$ M (n=2)	0.7 $\mu$ M (n=2)	LC-MRM-MS

a : プレインキュベーションは 30 分間、b : Cheng-Prusoff 式を用いて算出、c : 別試験データのため選択性の算出から除外、d : HIF1 $\alpha$  の CODDD を使用、e : HIF2 $\alpha$  の CODDD を使用、- : 算出せず、LC-SIM-MS : 選択イオン検出法による液体クロマトグラフィー質量分析、LC-MRM-MS : 多重反応検出法による液体クロマトグラフィー質量分析

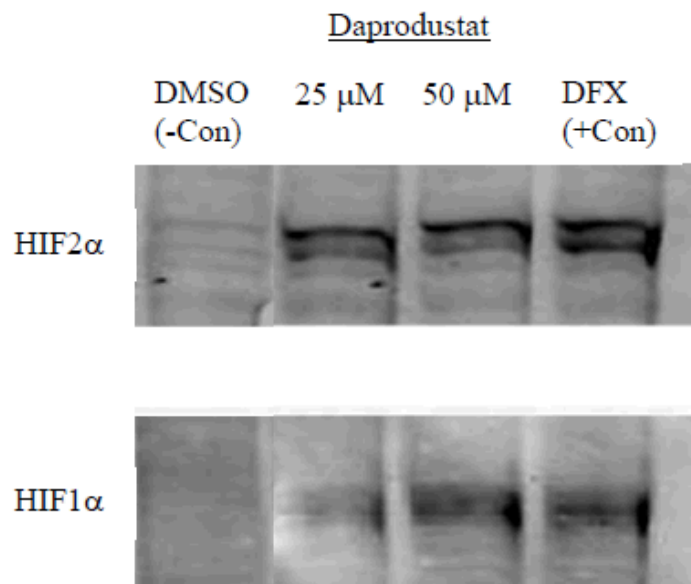
Data source: UH2008/00036 Table 1, Table 4, 2011N121507 Table 2, Table 4

#### 2.6.2.2.1.4. HIF 安定化

ダプロデュスタットの PHD 阻害作用を介する HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  の安定化について検討した (UH2008/00026)。10%ウシ胎児血清 (FBS) 及び 0.1%ジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した高グルコース/グルタミン含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した Hep3B 細胞株をダプロデュスタット (25, 50  $\mu$ M) 又は陽性対照として deferoxamine (DFX, 鉄キレートにより低酸素状態を誘導、100  $\mu$ M) で 6 時間処理したときの HIF $\alpha$  の蓄積を検出して安定化の指標とした (n=1)。処理 6 時間後に HIF $\alpha$  が検出可能な量になるようにするため、ダプロデュスタットによる処理は Hep3B 細胞株の EPO 分泌に対する 50%有効濃度 (EC50) (表 2.6.2-6) の約 15 倍までの濃度で行った。核蛋白質を抽出した後、可溶化してドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動により HIF 複合体を分離した。HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  に対するそれぞれの特異的抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、高感度ケミルミネッセンス ECL-Plus を用いて抗体/蛋白質複合体を検出した。

媒体処理細胞では HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  のいずれも検出されなかったが、DFX 処理細胞では HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  がいずれも検出された。ダプロデュスタット処理細胞では 25 及び 50  $\mu$ M のいずれの濃度においても HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  が検出された (図 2.6.2-3)。

これらのことから、Hep3B 細胞株をダプロデュスタットで処理することによって HIF $\alpha$  の蓄積が起こることが示され、これは HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  の両方が安定化することによるものと考えられる。



DMSO (-Con) : 陰性対照として 0.1%DMSO を使用、DFX (+Con) : 陽性対照として 100  $\mu$ M の DFX を使用  
Data source: UH2008/00026 Figure 1

**図 2.6.2-3** ダプロデュスタット (25 及び 50  $\mu$ M) で 6 時間処理した Hep3B 細胞株の核抽出物における HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  のウェスタンブロット解析

### 2.6.2.2.1.5. EPO 及び VEGF-A 産生に対する作用

EPO 及び VEGF-A 等の HIF 応答性遺伝子は、それぞれ赤血球産生及び血管新生等の様々な生理機能に関与している。そこで、Hep3B 細胞株の EPO 及び VEGF-A 産生に対するダプロデュスタットの作用を検討した (UH2008/00024)。Hep3B 細胞株を 1%DMSO 添加無血清 DMEM (媒体) で調製したダプロデュスタット (0.01~100  $\mu$ M) で 48 時間処理した。培養液中への EPO 及び VEGF-A の分泌量を Meso Scale Discovery (MSD) EPO/VEGF-A 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を用いて測定した。細胞生存率は CellTiter-Glo ルミネッセンス法を用いて算出した。

ダプロデュスタットの EPO 及び VEGF-A 誘導作用の EC50 はそれぞれ 3.3 及び 2.2  $\mu$ M 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 (表 2.6.2-6)。細胞生存率は 40  $\mu$ M 以上で 75%未満に低下した。

**表 2.6.2-6 Hep3B 細胞株におけるダプロデュスタットの EPO 及び VEGF-A 誘導作用**

蛋白質	EC50 ( $\mu$ M)	媒体と比較したときの最高誘導率 (倍)
EPO	3.3 (n=5)	5.8
VEGF-A	2.2 (n=5)	2.2

Data source: UH2008/00024 Table 1

### 2.6.2.2.1.6. HIF 応答性遺伝子の mRNA 及び蛋白質量に対する作用

PHD の阻害は HIF $\alpha$  の安定化を引き起こし、それを介して HIF 応答性遺伝子である EPO 遺伝子の転写及び翻訳が誘導される。Hep3B 細胞株を高グルコース/グルタミン含有 2%FBS/0.1%DMSO 添加 DMEM で調製したダプロデュスタット (2.5, 12.5, 25  $\mu$ M, n=1) で処理し、EPO 及び VEGF-A 等の特定の HIF 応答性遺伝子の mRNA 量及び蛋白質量の変化を測定した (UH2008/00027)。処理 16 時間後にリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) を用いて mRNA 量を定量し、ヒト 18S rRNA の値で補正した。別の試験において、処理 24 時間後に MSD ELISA を用いて培養液中に分泌された蛋白質量を測定した。陽性対照として DFX (100  $\mu$ M) を使用した。

EPO mRNA 量はダプロデュスタットの濃度依存的に 1.7~7.4 倍に増加し、DFX では 14 倍に増加した (表 2.6.2-7)。また、HIF1 $\alpha$  特異的 PGK-1 mRNA 量については、ダプロデュスタットでは 1.7~2.9 倍に増加し、DFX では 6.6 倍に増加した。ダプロデュスタットでは PHD1~3 の mRNA 量 (0.8~1.4 倍) は変化しなかったが、DFX では PHD2 及び PHD3 の mRNA 量はそれぞれ 2.7 及び 7.2 倍に増加した。

培養液中の EPO 蛋白質量はダプロデュスタットの濃度依存的に 1.4~4.2 倍に増加し、DFX では 7.7 倍に増加した。VEGF-A 蛋白質量については、ダプロデュスタットでは 1.6~2.1 倍とわずかに増加したが、DFX では 5.6 倍に増加した。ダプロデュスタットでみられた VEGF-A 蛋白質量のわずかな増加の臨床的意義は不明である。

これらのことから、Hep3B 細胞株においてダプロデュスタットの処理により、濃度依存的に EPO mRNA 量及び EPO 蛋白質量が増加することが示された。ダプロデュスタットは

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。

**表 2.6.2-7 ダプロデュスタットによる mRNA 及び蛋白質量に対する作用**

ダプロデュスタット 濃度 (μM)	媒体と比較したときの誘導率 (倍)						
	EPO mRNA	EPO 蛋白質	PGK-1 mRNA	PHD1 mRNA	PHD2 mRNA	PHD3 mRNA	VEGF-A 蛋白質
0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
2.5	1.7	1.4	1.7	1.1	1.4	1.2	1.6
12.5	5.0	3.8	2.6	0.9	1.2	1.3	2.1
25	7.4	4.2	2.9	0.8	1.2	1.2	2.0
100 μM DFX (陽性対照)	14	7.7	6.6	0.8	2.7	7.2	5.6

Data source: UH2008/00027 Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 4, Figure 5

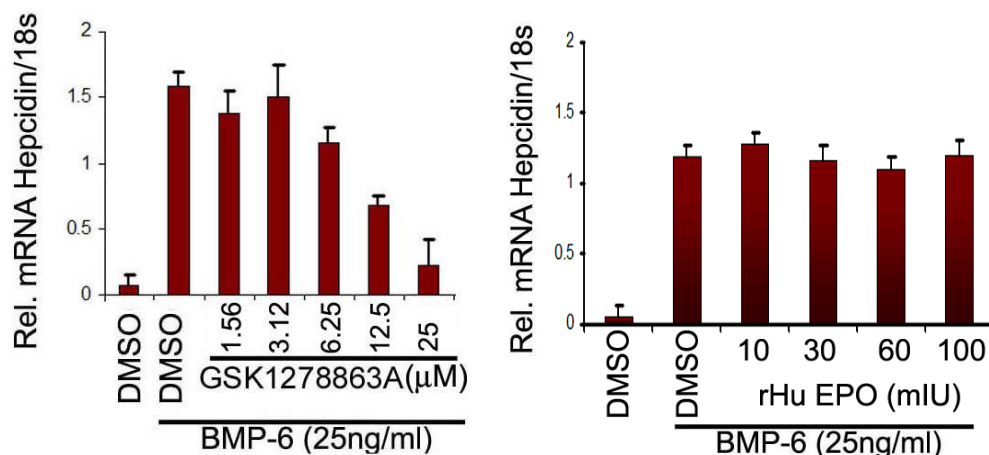
#### 2.6.2.2.1.7. ヘプシジン発現に対する作用

マウスにおいて HIF 及び低酸素により肝臓のヘプシジン発現が抑制されることが示されている。ヘプシジンは主に肝臓で産生されて分泌されるペプチドホルモンであり、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]。ヘプシジン発現が低下すると Hb 産生における鉄利用が上昇することが示されていることから、ヘプシジンに対するダプロデュスタットの作用を検討した

(UH2009/00011)。Hep3B 細胞株を 25 ng/mL の BMP-6 で 6 時間処理することで検出可能な量のヘプシジン mRNA 発現を誘導した。6 時間処理の後、10%FBS/0.1%DMSO 添加 DMEM で調製した rhEPO (10, 30, 60, 100 mIU/mL) 又はダプロデュスタット (1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 μM) を細胞に添加して 48 時間処理した (n=2)。細胞から総 RNA を抽出して定量 RT-PCR によって特異的な mRNA を測定し、ヒト 18S rRNA の値で補正した。並行して実施した試験では CellTiter Glo アッセイにより 72 時間処理後の細胞の生存率を測定した。

ダプロデュスタットは 12.5 μM までの濃度では Hep3B 細胞株の生存率に影響を示さなかったが、25 μM では生存率が 25%低下した。BMP-6 処理によりヘプシジン mRNA 量は DMSO コントロールと比較して 34 倍に増加した。この BMP-6 によるヘプシジン mRNA 量の増加は 100 mIU/mL までの rhEPO の処理では変化しなかったが、ダプロデュスタットの 12.5 μM では、48 時間処理によりヘプシジン mRNA 量は 55%以上減少した (図 2.6.2-4)。

これらのことから、ダプロデュスタットは鉄輸送/利用を改善する可能性があることが示唆された。また、本試験条件において、ダプロデュスタット処理でみられたヘプシジン mRNA 量の減少は HIF 安定化を介した直接的な作用であり、ダプロデュスタットによって誘導された EPO による間接的な作用ではないと考えられる。



平均±標準偏差、ヘプシジン mRNA 量を 18S rRNA 量に対する相対値で示す

Data source: UH2009/00011 Figure 1, Figure 3

**図 2.6.2-4 BMP-6 処理 Hep3B 細胞株におけるダプロデュスタット及び rhEPO の 48 時間処理によるヘプシジン mRNA 量に対する作用**

#### 2.6.2.2.2. 代謝物の in vitro 試験

ダプロデュスタットはヒトにおいて酸化経路を介して広く代謝される。ヒト血中代謝物に関する予備的な定量試験の結果から、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む：M2（GSK2391220）、M3（立体異性体 GSK2531403、GSK2506104）、M4（立体異性体 GSK2487818）、M5（立体異性体 GSK2531399、GSK2506102）、M6（立体異性体 GSK2531398、GSK2531407）、M13（立体異性体 GSK2531401））について薬理活性の検討が必要と判断した（2.6.4.1.）。

##### 2.6.2.2.2.1. PHD1~3 の酵素活性に対する阻害作用

ヒト PHD1~3、ラット PHD2 及び PHD3 並びにイヌ PHD3 の酵素活性に対す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、0.85~50000 nM）の作用を、2.6.2.2.1.1.と同様の方法で蛍光検出による LANCE アッセイを用いて検討した（2011N121507）。

検討したすべての代謝物はヒト PHD1~3 に対して阻害作用を示し、その活性はいずれもダプロデュスタットと同程度であった（表 2.6.2-8）。同様に、検討した代謝物のラット PHD2 及び PHD3 並びにイヌ PHD3 に対する阻害作用は、いずれもダプロデュスタットと同程度であった（表 2.6.2-8）。

これらのことから、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）のヒト、ラット及びイヌの PHD に対する作用はいずれも同程度であることが示された。

サル PHD の触媒ドメインの配列はヒトと相同性が高く、アカゲザルとヒトを比較したときの相同性は 99%超であった（accession number：PHD1（NP\_001248020、AAK82943）、PHD2（XP\_01104870、CAD38741）、PHD3（NP\_001181354、BAG53892））[Minervini, 2015]ことから、ダプロデュスタットのサル PHD に対する阻害作用はヒト PHD と同程度と推測される。

**表 2.6.2-8 ラット、イヌ及びヒトの PHD に対す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）の阻害作用**

酵素	IC50 (nM)		見かけの Ki (nM)	
	ダプロデュスタット	代謝物 (IC50 の範囲)	ダプロデュスタット	代謝物 (見かけの Ki の範囲)
ヒト PHD1	3.5	2.3~9.3	1.8	1.2~4.6
ラット PHD2	2.4	0.8~7.7	1.2	0.4~3.9
ヒト PHD2	3.3	1.6~7.7	1.7	0.8~3.8
ラット PHD3	4.3	3.4~13.9	2.2	1.7~7.0
イヌ PHD3	4.1	0.4~9.5	2.0	0.2~4.7
ヒト PHD3	8.9	4.1~13.2	4.4	2.0~6.6

Data source: 2011N121507 Table 2, Table 3

#### 2.6.2.2.2.2. 他の $\alpha$ -KG 依存性鉄ジオキシゲナーゼに対する選択性

$\alpha$ -KG 依存性酵素である CP4H 及び FIH に対す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）（0.1~100  $\mu$ M、n=2）の作用をそれぞれ LC-SIM-MS 及び LC-MRM-MS を用いて検討した（2011N121507）。

検討した化合物は CP4H に対していずれも 100  $\mu$ M までの濃度で阻害作用を示さず、FIH に対してはいずれもダプロデュスタット（IC50 は 1.4  $\mu$ M、見かけの Ki は 0.7  $\mu$ M）よりも阻害作用は弱かった（IC50 は 12.3~71.3  $\mu$ M、見かけの Ki は 6.2~35.6  $\mu$ M）（表 2.6.2-9）。

これらのことから、ダプロデュスタットと類似して、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）の PHD 阻害作用は FIH 阻害作用に対していずれも 900 倍超の高い選択性を示し、CP4H 阻害作用に対してはより高い選択性を示した。

**表 2.6.2-9 CP4H 及び FIH に対す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）の阻害作用**

被験物質	FIH (基質: HIF1 $\alpha$ CTAD)		CP4H (基質: (Pro-Pro-Gly) <sub>10</sub> )	
	IC50 ( $\mu$ M)	見かけの Ki ( $\mu$ M)	IC50 ( $\mu$ M)	見かけの Ki ( $\mu$ M)
ダプロデュスタット	1.4	0.7	>100	>50
M2 (GSK2391220)	66.8	33.4	>100	>50
M3 (GSK2531403)	12.3	6.2	>100	>50
M3 (GSK2506104)	27.8	13.9	>100	>50
M4 (GSK2487818)	58.7	29.4	>100	>50
M5 (GSK2531399)	25.7	12.9	>100	>50
M5 (GSK2506102)	27.7	13.9	>100	>50
M6 (GSK2531398)	71.3	35.6	>100	>50
M6 (GSK2531407)	16.7	8.3	>100	>50
M13 (GSK2531401)	31.9	15.9	>100	>50

CTAD : C 末端活性化ドメイン、(Pro-Pro-Gly)<sub>10</sub> : 天然コラーゲンのモデルペプチド

Data source: 2011N121507 Table 4

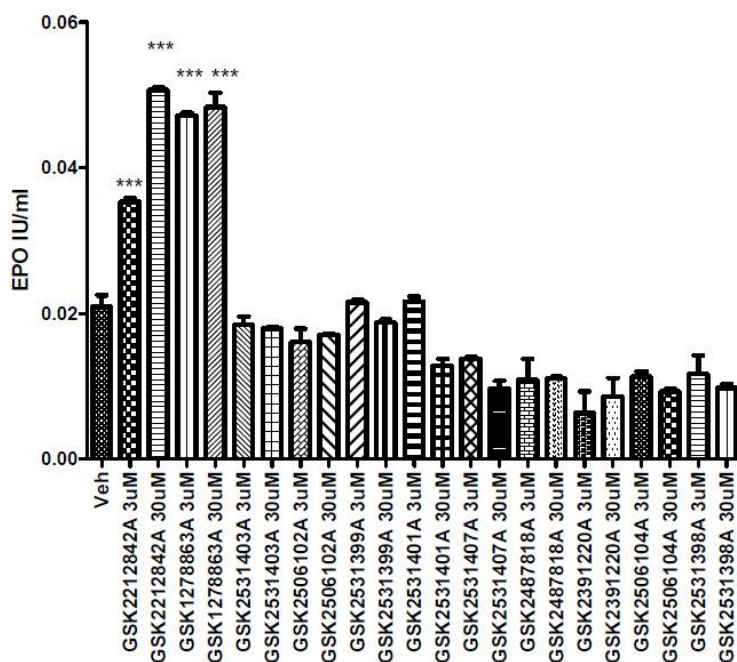


### 2.6.2.2.3. EPO 産生に対する作用

Hep3B 細胞株の EPO 産生に対す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）の作用を検討した（2012N134715）。3 又は 30  $\mu\text{M}$  のダプロデュスタット又は代謝物を Hep3B 細胞株に添加して 24 時間処理した（ $n=2\sim 4$ ）。24 時間処理後の培養液を回収し、細胞から分泌された EPO 量を MSD EPO アッセイにより測定した。検量線を用いて EPO 量を算出し、すべての被験物質処理サンプルの EPO 量を一元配置分散分析（ANOVA）及び Tukey's post-hoc 解析により媒体処理サンプルの EPO 量と比較した。

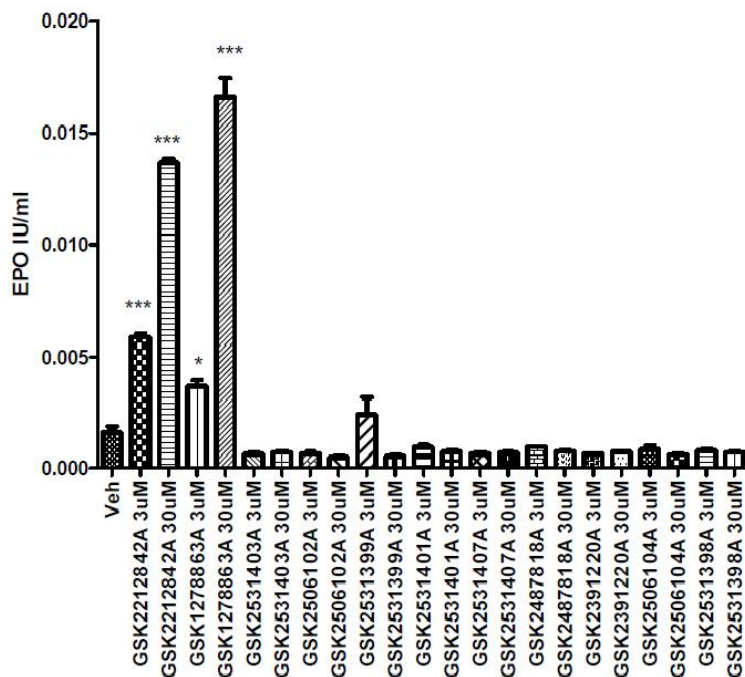
コンフルエント細胞でアッセイを行った後にサブコンフルエント状態で同様のアッセイを行ったが、いずれのアッセイにおいても代謝物（3, 30  $\mu\text{M}$ ）の処理による EPO 量の増加はみられなかった（図 2.6.2-5、図 2.6.2-6）。これらの被験物質については LC/MS 解析により各化合物であることを確認している。一方、サブコンフルエント状態のアッセイでダプロデュスタット及び陽性対照の PHD 阻害薬である GSK2212842A は、濃度依存的に EPO 量を増加させた。

したがって、二酸化体又は三酸化体である 6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）は *in vitro* の酵素アッセイではダプロデュスタットと同程度の作用を示したが、本試験の *in vitro* 細胞アッセイでは作用を示さなかった。



平均±標準偏差、Veh：媒体処理、\*\*\*： $p<0.001$  vs Veh（one-way ANOVA, Tukey's post-hoc 解析）  
 GSK2212842A：陽性対照の PHD 阻害薬、GSK1278863A：ダプロデュスタット  
 Data source: 2012N134715 Figure 1

図 2.6.2-5 Hep3B 細胞株を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）で処理したときの培養液中の EPO 量（コンフルエント）



平均±標準偏差、Veh：媒体処理、\*、\*\*\*：p<0.05、p<0.001 vs Veh (one-way ANOVA、Tukey's post-hoc 解析)  
Data source: 2012N134715 Figure 2

図 2.6.2-6 Hep3B 細胞株を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）で処理したときの培養液中の EPO 量（サブコンフルエント）

### 2.6.2.2.3. In vivo 試験

マウス及びラットを用いた効力を裏付ける試験では、ダプロデュスタットは特記しない限り 1%メチルセルローズに懸濁して経口投与した。別の適応症に関連する試験ではダプロデュスタットを経口又は局所投与した。これらの試験について以下に要約する。

#### 2.6.2.2.3.1. EPO 及び HIF 応答性遺伝子の発現に対する作用

##### 2.6.2.2.3.1.1. マウスの EPO 濃度並びに EPO 及び PGK-1 mRNA 量に対する作用

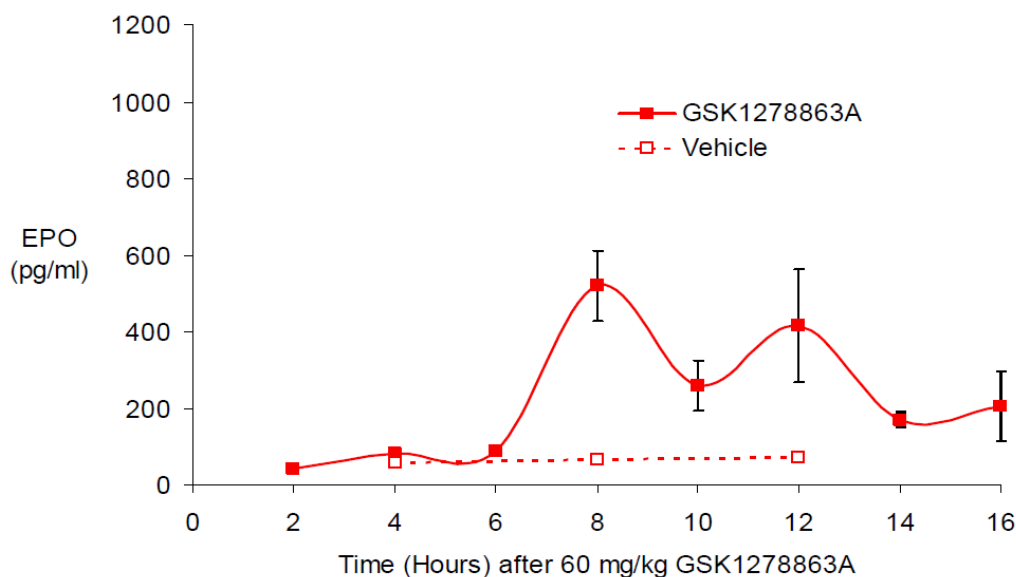
雌 B6D2F1 マウス（ダプロデュスタット群 5 匹/時点、媒体群 6 匹/時点）にダプロデュスタットの 60 mg/kg を単回経口投与し、投与 2、4、6、8、10、12、14 及び 16 時間後に心臓穿刺により採血した（媒体群は投与 4、8 及び 12 時間後に採血）（UH2008/00022）。乏血小板血漿中の EPO 濃度は MSD ELISA を用いて測定した。また、投与 2、4、6、8、10 及び 12 時間後の時点で、各マウスから肝臓及び腎臓を採取し、遺伝子発現解析を行った。総 RNA を単離した後に qRT-PCR 法を用いて EPO 及び PGK-1 mRNA を定量し、グリセルアルデヒド-3-P-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) mRNA 量の値で標準化して相対値を算出した。検量線を用いて血漿中 EPO 濃度及び EPO mRNA 量を算出し、平均及び標準誤差を求めた。

乏血小板血漿中の EPO 濃度はダプロデュスタットの投与 6 時間後まで明らかな上昇はみられなかったが、投与 8 及び 12 時間後では媒体群と比較してそれぞれ 8 倍 (519 pg/mL) 及び 6 倍 (415 pg/mL) に上昇し、二つのピークが認められた（図 2.6.2-7）。肝臓の EPO mRNA 量は媒体群の平均と比較して投与 2 時間後に 279 倍に上昇し、投与 6 時間後には 449

倍と最高レベルに到達し、投与 8 時間後は 31 倍に低下したが、投与 12 時間後では 261 倍と再び上昇がみられた (図 2.6.2-8)。腎臓の EPO mRNA 量は媒体群の平均と比較して投与 8 時間後に 56 倍に上昇し、投与 12 時間後では 35 倍に維持されていた (図 2.6.2-9)。肝臓及び腎臓の HIF1 $\alpha$  特異的 PGK-1 mRNA 量には、ダプロデュスタットの投与による変化はほとんどみられなかった (2 倍未満)。

本試験において、マウスへのダプロデュスタットの投与により肝臓及び腎臓の EPO mRNA 量はそれぞれ投与 6 及び 8 時間後に上昇し、血漿中 EPO 濃度は投与 8~12 時間後に高値を示した。

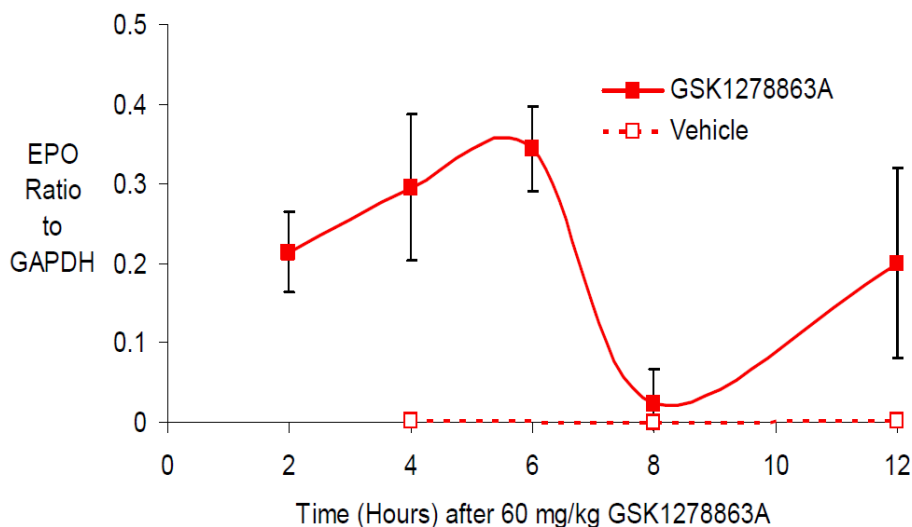
ダプロデュスタット投与後の血漿中 EPO 濃度に高さの異なる二つのピークがみられたが、これは肝臓及び腎臓での EPO 遺伝子発現のタイミングが異なっていたことと関連している可能性が考えられる。しかし、これらの組織においてダプロデュスタット投与により EPO 遺伝子発現が一過性に上昇するという点は一致していた。



平均±標準誤差 (GSK1278863A : n=5、媒体 : n=6)

Data source: UH2008/00022 Figure 1

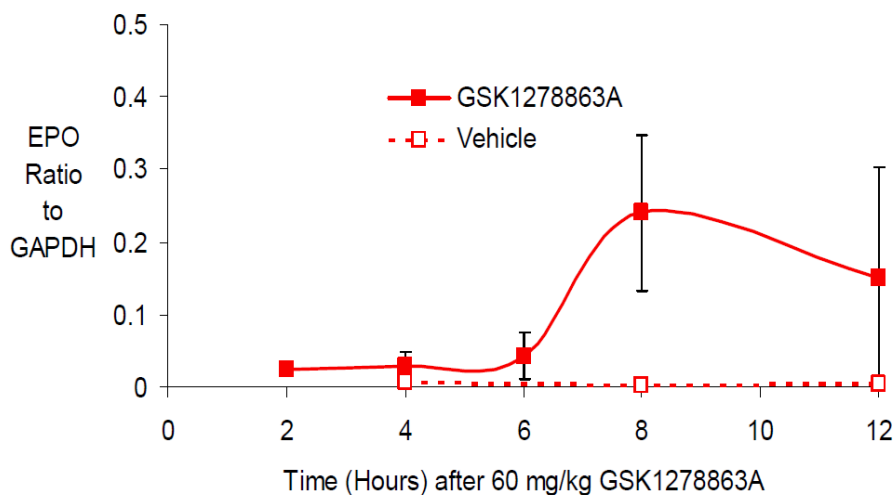
**図 2.6.2-7** 正常雌 B6D2F1 マウスにダプロデュスタットの 60 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中 EPO 濃度の推移



平均±標準誤差 (GSK1278863A : n=5、媒体 : n=6)

Data source: UH2008/00022 Figure 2

**図 2.6.2-8 正常雌 B6D2F1 マウスにダプロデュスタットの 60 mg/kg を単回経口投与したときの肝臓の EPO mRNA 量の推移**



平均±標準誤差 (GSK1278863A : n=5、媒体 : n=6)

Data source: UH2008/00022 Figure 3

**図 2.6.2-9 正常雌 B6D2F1 マウスにダプロデュスタットの 60 mg/kg を単回経口投与したときの腎臓の EPO mRNA 量の推移**

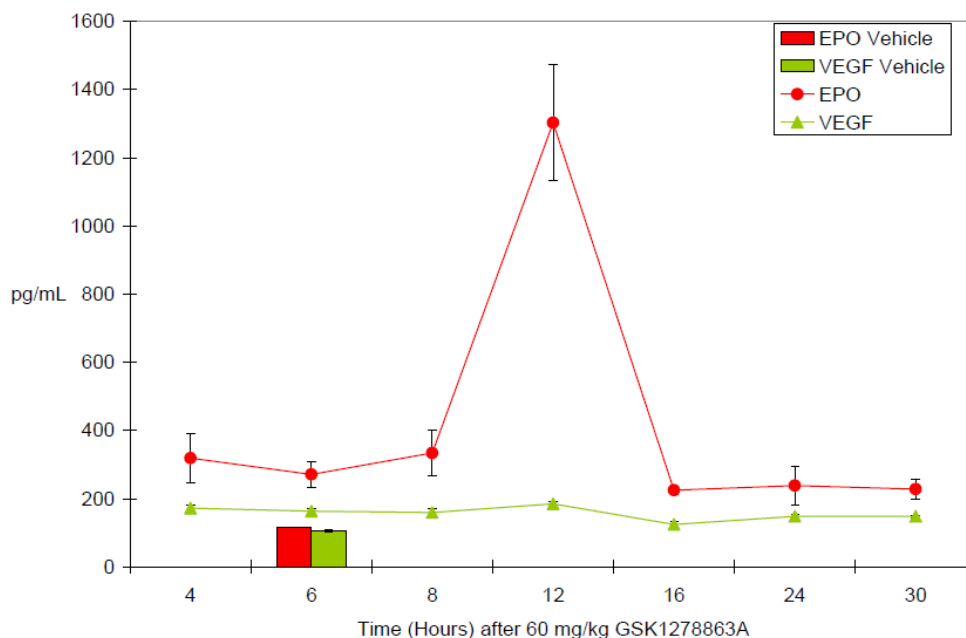
#### 2.6.2.2.3.1.2. マウスの血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度に対する作用

雌 B6D2F1 マウス (6 匹/時点) にダプロデュスタットの 60 mg/kg を単回経口投与し、投与 4、6、8、12、16、24 及び 30 時間後に心臓穿刺により採血した (媒体群は投与 6 時間後にのみ採血) (UH2008/00023)。乏血小板血漿中の EPO 及び VEGF-A 濃度を、MSD マウス EPO/VEGF-A duplex ELISA を用いて測定した。

血漿中 EPO 濃度はダプロデュスタットの投与 12 時間後にピークに到達した。このときの平均は 1303 pg/mL であり、媒体群と比較して 11.2 倍の濃度であった (図 2.6.2-10)。また、

それ以外のすべての採血時点での血漿中 EPO 濃度は、媒体群と比較していずれも 1.9～2.9 倍の濃度であった。血漿中 VEGF-A 濃度は媒体群と比較して 1.2～1.8 倍の濃度であり、測定期間をとおしておおむね一定であった。

本試験において、マウスにダプロデュスタットの 60mg/kg を単回投与することにより、VEGF-A のわずかな上昇を伴う血漿中 EPO 濃度の一過性の上昇がみられた。



平均±標準誤差 (n=6)

Data source: UH2008/00023 Figure 1

**図 2.6.2-10 正常マウスにダプロデュスタットの 60 mg/kg を単回経口投与したときの 30 時間後までの血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度**

### 2.6.2.2.3.1.3. ラットの EPO 及び HIF 応答性遺伝子の発現に対する作用

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薬理試験 (2.6.2.4.3.3.1.) の用量設定のため、薬理作用を示す用量を検討した

(2011N126015)。雄 Sprague Dawley ラット (3 又は 5 匹/群) にダプロデュスタットの 1、3、10 及び 30 mg/kg を単回又は 1、3 及び 10 mg/kg/日を 1 日 1 回 3 日間経口投与した。血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度の推移及び qRT-PCR を用いて肝臓の HIF 応答性遺伝子 (EPO、VEGF-A、HO-1、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 1 (PDK1)、グルコーストランスporter1 (Glut-1)) の発現を測定し、用量反応性を評価した。

ダプロデュスタットは 10 mg/kg/日までの単回及び 3 日間反復投与により血漿中 EPO 及び VEGF 濃度をいずれも上昇させなかった。しかし、より高感度な測定法では 10 及び 30 mg/kg の単回投与 6 時間後において肝臓 EPO mRNA 量の用量依存的な増加がみられた。肝臓での HO-1 mRNA 量も 30 mg/kg の単回投与 6 時間後で増加がみられたが、10 mg/kg では増加はみられなかった。肝臓の HIF 応答性遺伝子 (VEGF-A、PDK1、Glut-1) の mRNA 量は 10 及び 30 mg/kg の単回経口投与では変化はみられなかった。

### 2.6.2.2.3.2. マウスの赤血球産生に対する作用

雌 B6D2F1 マウス (5 匹/群) にダプロデュスタットの 3、10 及び 30 mg/kg/日を 8 日間反復経口投与した (UH2008/00028)。最終投与の 24 時間後に心臓穿刺により採血し、血液学的パラメータ (Hb、Hct、赤血球数、網状赤血球数、血小板数、白血球数) を測定した。平均及び標準誤差を算出し、測定値を平方根変換して Student's t 検定により p 値を求めた。

ダプロデュスタットの 8 日間反復経口投与によりすべての用量で Hb、Hct、赤血球数及び網状赤血球数の有意な高値がみられ、増加率はそれぞれ最高 17、25、17 及び 673%であった (表 2.6.2-10)。また、すべての用量で有意な血小板数の低値 (最高 51%減少) がみられ、10 及び 30 mg/kg/日で有意な白血球数の低値 (最高 34%減少) がみられた (表 2.6.2-10)。

表 2.6.2-10 雌 B6D2F1 マウスにダプロデュスタットの 30 mg/kg/日までを 8 日間反復経口投与したときの血液学的パラメータの変化

用量 (mg/kg/日)	平均±標準誤差 (n=5)	媒体の平均から の絶対変化量	媒体の平均に 対する変化率	p 値 (媒体との比較)
Hb	(g/dL)	(g/dL)	(%)	
0 (媒体)	16.00 ± 0.13			
3	17.86 ± 0.24	1.86	12	0.00012
10	18.76 ± 0.38	2.76	17	0.00011
30	18.12 ± 0.44	2.12	13	0.001
Hct	(%)	(%)	(%)	
0 (媒体)	54.48 ± 0.65			
3	62.48 ± 1.05	8.00	15	0.00018
10	67.88 ± 1.47	13.40	25	0.00003
30	67.52 ± 1.61	13.04	24	0.00005
赤血球数	(×10 <sup>6</sup> cells/μL)	(×10 <sup>6</sup> cells/μL)	(%)	
0 (媒体)	11.00 ± 0.17			
3	12.61 ± 0.21	1.61	15	0.0003
10	12.90 ± 0.20	1.90	17	0.00008
30	12.81 ± 0.39	1.81	16	0.002
網状赤血球数			(%)	
0 (媒体)	198 ± 16			
3	614 ± 44	416	210	0.000006
10	1273 ± 26	1075	544	0.000000001
30	1527 ± 70	1329	673	0.00000001
血小板数	(×10 <sup>3</sup> cells/μL)	(×10 <sup>3</sup> cells/μL)	(%)	
0 (媒体)	894 ± 156			
3	620 ± 38	-274	-31	0.00026
10	440 ± 55	-454	-51	0.00019
30	464 ± 53	-430	-48	0.00018
白血球数	(×10 <sup>3</sup> cells/μL)	(×10 <sup>3</sup> cells/μL)	(%)	
0 (媒体)	15.93 ± 1.34			
3	13.27 ± 0.41	-2.65	-17	0.102
10	10.78 ± 0.70	-5.14	-32	0.009
30	10.54 ± 0.37	-5.38	-34	0.004

Data source: UH2008/00028 Table 1

### 2.6.2.2.3.3. ラットの赤血球産生に対する作用

雄 Sprague Dawley ラット (5 匹/群) にダプロデュスタットの 0.3、1、3 及び 10 mg/kg/日 を 21 日間反復経口投与した (UH2008/00025)。試験 8、15 及び 22 日に尾静脈から採血し、血液学的パラメータ (Hb、Hct、赤血球数、白血球数) を測定した。平均及び標準誤差を算出し、測定値を平方根変換して Student's t 検定により p 値を求めた。

Hb は試験 15 日以降に 3 及び 10 mg/kg/日 で有意な高値を示し、それぞれの増加率は試験 15 日では媒体 (17.68 g/dL) と比較して 13% (19.92 g/dL) 及び 19% (21.00 g/dL)、試験 22 日では媒体 (17.78 g/dL) と比較して 8.8% (19.34 g/dL) 及び 22% (21.75 g/dL) であった (表 2.6.2-11)。Hct は試験 15 日に 3 mg/kg/日以上で媒体 (49.18%) と比較して最高 21% 増加 (59.38%) し、試験 22 日に 0.3 mg/kg/日以上で媒体 (48.98%) と比較して最高 26% 増加 (61.93%) し、いずれも有意な高値を示した。赤血球数は試験 8 日に 0.3 及び 1 mg/kg/日 で媒体 ( $9.3 \times 10^6$  cells/ $\mu$ L) と比較して最高 10.4% 増加 ( $10.27 \times 10^6$  cells/ $\mu$ L) し、試験 15 及び 22 日に 0.3 mg/kg/日以上で媒体 (9.51~9.59 g/dL) と比較して最高 18% 増加 ( $11.32 \times 10^6$  cells/ $\mu$ L) し、いずれも有意な高値を示した (試験 15 日の 1 mg/kg/日を除く)。また、いずれの用量でも白血球数の有意な変化はみられなかった (表 2.6.2-11)。

表 2.6.2-11 雄 Sprague Dawley ラットにダプロデュスタットの 10 mg/kg/日までを 21 日間反復経口投与したときの血液学的パラメータの変化

用量 (mg/kg/日)	試験 8 日		試験 15 日		試験 22 日	
	平均±標準誤差 (n=5)	p 値 (媒体と比 較)	平均±標準誤差 (n=5)	p 値 (媒体と比 較)	平均±標準誤差 (n=5)	p 値 (媒体と比 較)
Hb	(g/dL)		(g/dL)		(g/dL)	
0 (媒体)	17.48 ± 0.42	-	17.68 ± 0.41	-	17.78 ± 0.37	-
0.3	17.65 ± 0.18	0.74	18.04 ± 0.44	0.56	18.76 ± 0.55	0.18
1	18.35 ± 0.60	0.26	17.92 ± 0.66	0.77	18.84 ± 0.40	0.089
3	18.30 ± 0.38	0.18	19.92 ± 0.43	0.0053	19.34 ± 0.29	0.011
10	18.43 ± 0.22	0.15	21.00 ± 0.62	0.0023	21.75 ± 0.40	0.00018
Hct	(%)		(%)		(%)	
0 (媒体)	49.20 ± 0.92	-	49.18 ± 1.08	-	48.98 ± 0.90	-
0.3	50.88 ± 1.09	0.28	50.50 ± 1.52	0.50	53.06 ± 1.46	0.044
1	52.98 ± 2.05	0.11	50.20 ± 1.77	0.64	52.94 ± 1.16	0.027
3	51.86 ± 1.24	0.12	55.24 ± 1.15	0.005	54.76 ± 1.12	0.0038
10	52.67 ± 0.98	0.05	59.38 ± 1.46	0.0007	61.93 ± 1.65	0.00016
赤血球数	( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)		( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)		( $\times 10^6$ cells/ $\mu$ L)	
0 (媒体)	9.30 ± 0.17	-	9.51 ± 0.16	-	9.59 ± 0.20	-
0.3	9.97 ± 0.19	0.032	10.14 ± 0.21	0.045	10.76 ± 0.30	0.012
1	10.27 ± 0.28	0.016	9.94 ± 0.34	0.28	10.57 ± 0.21	0.0095
3	9.74 ± 0.21	0.14	10.55 ± 0.24	0.0075	10.60 ± 0.14	0.0032
10	9.59 ± 0.42	0.47	10.77 ± 0.18	0.0013	11.32 ± 0.41	0.0047
白血球数	( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)		( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)		( $\times 10^3$ cells/ $\mu$ L)	
0 (媒体)	25.77 ± 5.22	-	20.38 ± 3.35	-	21.85 ± 5.02	-
0.3	26.77 ± 1.49	0.86	24.90 ± 2.18	0.28	24.30 ± 1.34	0.62
1	23.20 ± 3.23	0.68	29.67 ± 1.62	0.077	23.60 ± 2.80	0.76
3	18.10 ± 1.83	0.18	19.80 ± 4.30	0.92	18.72 ± 1.99	0.55
10	19.00 ± 4.19	0.37	16.80	ND	21.50 ± 1.59	0.95

ND: 算出せず (標準誤差の算出及び統計解析を実施せず)、-: 該当なし

Data source: UH2008/00025 Table 1

以上のマウス及びラットを用いた試験において、ダプロデュスタットの反復経口投与により Hb、Hct、赤血球数及び網状赤血球数（マウスでのみ測定）が増加することが示された。

#### 2.6.2.2.4. 代謝物の in vivo 試験

##### 2.6.2.2.4.1. 静脈内投与

###### 2.6.2.2.4.1.1. M13 の評価

薬物動態試験の一環として、雄 CD-1 マウス（2～3 匹/時点）に主なヒト代謝物の一つである M13（GSK2531401）の 40 及び 100 mg/kg（生理食塩液で調製）を単回静脈内投与したときの血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度に対する作用を評価した（2012N156583）。また、雄 CD-1 マウス（3 匹/時点）にダプロデュスタットの 20 mg/kg（10% Captisol 含有 25 mM Tris 緩衝液で調製、pH 9）を単回静脈内投与したときの血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度を評価した。投与 0.083、1、4、8 及び 24 時間後、M13 ではこれらの時点に加えて 0.25、0.5 及び 2 時間後に採血した（2～3 匹/時点）。血漿中 EPO 及び VEGF-A 濃度は、MSD マウス EPO/VEGF-A dulpex ELISA を用いて測定した。統計解析には ANOVA を用いた。

M13 の 40 及び 100 mg/kg を静脈内投与したときに、血漿中 EPO 及び VEGF 濃度の有意な上昇はみられなかった。データを詳細に評価したところ、M13（40 及び 100 mg/kg）の投与 4 時間後に血漿中 EPO 濃度のわずかな上昇傾向がみられたが、媒体投与 4 時間後の採血を実施していなかったため、EPO 濃度の上昇が M13 の投与によるものか否かを断定することはできなかった。ダプロデュスタットでは投与 4 及び 8 時間後に血漿中 EPO 濃度の上昇がみられた。

##### 2.6.2.2.4.2. 皮下投与

###### 2.6.2.2.4.2.1. M2、M3 及び M13 の評価

ダプロデュスタットの 3 種類の主なヒト代謝物の薬理活性を評価するため、雌 CD-1 マウス（10 匹/群）に M2、M3（GSK2506104）及び M13（GSK2531401）のそれぞれ 2.0、2.5 及び 1.3 mg/kg/日（25 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）で混合液として調製）を 28 日間反復皮下投与し、一般状態、体重及び血液学的パラメータの評価を行った（2014N208198）。また、1 群当たり 15 匹（3 匹/時点）の動物を追加して投与し、試験 14 日に採血してトキシコキネティクス解析を行った。

代謝物混合液の投与により、Hb、Hct 及び総赤血球数の平均は試験 29 日にわずかに増加した（媒体の平均と比較してそれぞれ 1.10、1.10 及び 1.09 倍）ことから、これらの代謝物混合液はマウスでわずかに薬理活性を有することが示唆された。また、試験 14 日に M2、M3 及び M13 の血漿中濃度を測定した結果、投与 8 時間後まで定量可能であった。一般状態観察及び体重測定の結果、特記すべき所見は認められなかった。



### 2.6.2.2.5. 他の適応症に関連する効力試験

#### 2.6.2.2.5.1. 経口投与

##### 2.6.2.2.5.1.1. 筋損傷後の後肢機能に対する作用

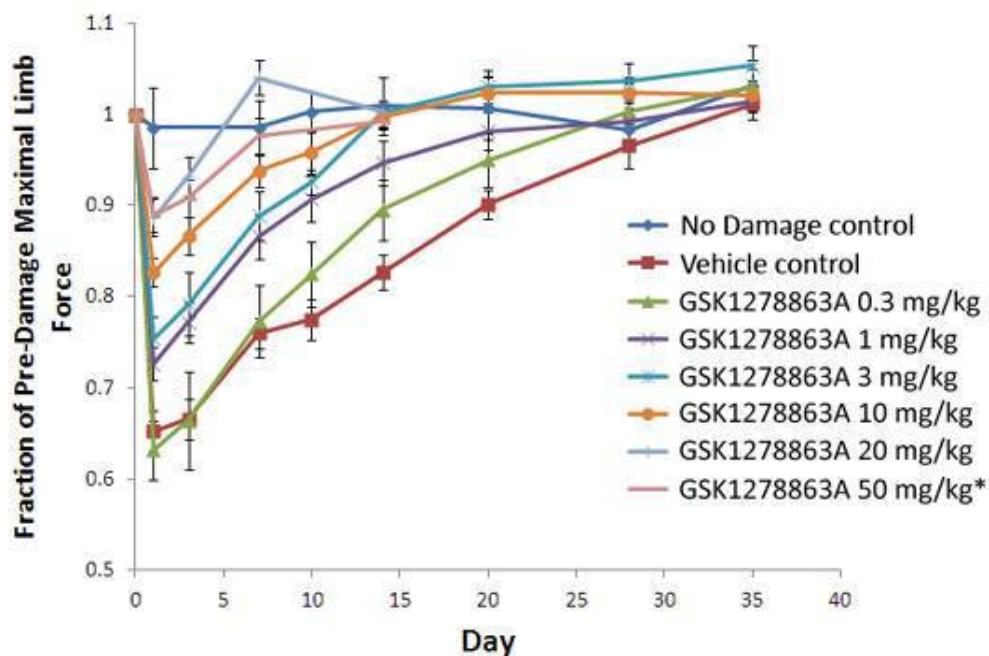
マウスでの運動負荷による筋損傷からの回復に対するダプロデュスタットの作用を検討した(2014N197528)。マウスの筋肉機能は筋損傷と生理学的に関連する遠心性収縮(ECC)モデルを用いて測定できることから、試験0日に雄C57BL/6NCrlマウス(8~10週齢)の腓腹筋をECCで伸長させて筋線維を構造的に損傷させ、この過程を60回繰り返した。その後、試験1、3、7、14、28及び35日に筋損傷を起こさない等尺性収縮を誘発し、坐骨神経を刺激したときに発生した力を記録して強縮張力を測定した。

試験1では試験0日のECCの10分前に媒体群2群(等尺性収縮媒体群(筋損傷なし、5匹)、ECC媒体群(筋損傷あり、9匹))及びダプロデュスタット群4群(0.3、1、3、10 mg/kg/日、0.1%Tween含有0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)で調製、9匹/群)に経口投与し、その後の試験35日まで1日1回連日投与した。試験1、3、7、14、28及び35日の投与は強縮張力測定の前2時間前に行った。試験35日の強縮張力測定後に心臓穿刺により採血し、血液学的パラメータ(Hb、Htc、赤血球数)及びMSDアッセイにより血清中EPO濃度を測定した。標準誤差を算出して統計解析を行い、Student's t検定( $p < 0.05$ )を用いて有意差の検定を行った。

試験2ではECC媒体群(筋損傷あり、7匹)及びダプロデュスタット群3群(10、20、50 mg/kg/日、7匹/群)を設定して試験1と同様の方法でECCモデルを作製し、14日間投与して強縮張力を測定した。試験1及び2の結果を統合して図2.6.2-11に示した。

媒体群では、ECCの24時間後に最大脚力(強縮張力)が30~37%低下し、その後、徐々に回復して35日後にはECC前の脚力に戻った。ダプロデュスタットの1 mg/kg/日以上群では、媒体群と比較してECCの24時間後の最大脚力の低下が有意に小さかった。最大作用は20 mg/kg/日群で認められ、ECCの24時間後の最大脚力の低下は11%であった。20 mg/kg/日群ではECCの7日後までに脚力が完全に回復した。脚力の回復時間はダプロデュスタットの用量の増加に伴って短縮する傾向がみられた。試験1の10 mg/kg/日群を除き、血液学的パラメータ及び血清中EPO濃度に有意な上昇はみられなかった。

これらの成績から、ダプロデュスタットを運動負荷による筋損傷時又は筋損傷後に投与することにより、血液学的パラメータに影響を及ぼさない低用量では後肢機能の低下を抑制して非損傷時の脚力に回復するまでの時間を短縮し、高用量では最初の強縮張力の低下を顕著に減少させて脚力の回復を早めることが示唆された。



平均±標準誤差 (n=7~16)、1、3、10、20 及び 50 mg/kg/日群の最大脚力の低下は試験 35 日を除いて各時点の媒体群と比較して有意に小さかった (p<0.05、Student's t 検定)、\* : 50 mg/kg/日群は初回投与時に 100 mg/kg を経口投与し、その後に 50 mg/kg/日を 4 日間経口投与した

Data source: 2014N197528 Figure 6

図 2.6.2-11 マウスの 60 回 ECC による筋損傷後の筋力に対するダプロデュスタットの 1 日 1 回経口投与による作用

## 2.6.2.2.5.2. 塗布

### 2.6.2.2.5.2.1. マウスの皮膚での HIF 応答性遺伝子の発現及び全身曝露量

ダプロデュスタットのワセリン基剤ゲルをマウスの非創傷皮膚及び創傷皮膚に塗布する 3 試験を実施した (2011N118983)。雄 C57/BL6 マウス (5 匹/群) の背部に作製した創傷に基剤又はダプロデュスタット 2% を 200 µL 塗布して滅菌包帯で覆い、48 時間後まで評価を行った。試験終了時に動物をと殺して血漿及び組織を採取した。血漿中 EPO 及び VEGF 濃度を MSD アッセイにより測定した。組織から RNA を抽出し、目的遺伝子 (HO-1、Glut-1、PDK-1、VEGF-A、CXC モチーフケモカイン 5 (CXCL5)、PHD2、PHD3、β-アクチン) の配列特異的プローブを用いた qRT-PCR により遺伝子発現を解析した。各遺伝子の発現量は、プールしたマウス皮膚での発現量で作成した標準曲線から外挿して定量し、β-アクチンの発現量に対する比として表した。ダプロデュスタット塗布による遺伝子発現に対する作用について、one-way ANOVA 及び Tukey の多重比較検定 (p<0.05) 又は Student の t 検定 (p<0.05) を用いて基剤塗布と比較した。血漿中 EPO 及び VEGF 濃度についての統計解析には Student の t 検定を用いた。

試験 1 では、ダプロデュスタット 2% の塗布 8、24 及び 48 時間後における皮膚の遺伝子発現の経時変化を qRT-PCR を用いて検討し、血漿中ダプロデュスタット濃度を定量した。創傷により皮膚組織に HIF 応答性遺伝子の発現誘導がみられ、ダプロデュスタットはこの誘導を増大させた。創傷皮膚において、ダプロデュスタットの塗布 8 時間後に HO-1、Glut-1、

PDK-1、CXCL5 及び VEGF-A 遺伝子の発現誘導がみられたが、48 時間後の PDK-1 を除いて 24 及び 48 時間後にこれらの遺伝子の発現誘導はみられなかった。正常の非創傷皮膚では、ダプロデュスタットの塗布 24 時間後に PDK-1、VEGF-A 及び PHD2 遺伝子の発現誘導がみられた。創傷皮膚及び非創傷皮膚のいずれにおいてもダプロデュスタットの塗布 24 時間後に血漿中 EPO 濃度の上昇がみられたが、血漿中 VEGF-A 濃度の上昇はダプロデュスタットの塗布 8 及び 24 時間後に創傷皮膚でのみみられた。創傷皮膚に塗布したときの血漿中ダプロデュスタット濃度は塗布 24 時間後に 16.26 µg/mL の最高濃度に到達し、48 時間後には約 5.60 µg/mL に低下した（表 2.6.2-12）。創傷皮膚及び非創傷皮膚のいずれに塗布した場合でも、24 時間後の血漿中ダプロデュスタット濃度は類似していた。

試験 2 では、ダプロデュスタット 0.01、0.1 及び 0.5% の塗布 8 時間後における皮膚の遺伝子発現及び血漿中ダプロデュスタット濃度について用量反応性を検討した。ダプロデュスタットの投与により創傷皮膚の VEGF-A、PDK-1、Glut-1 及び PHD3 等の HIF 応答性遺伝子の発現が有意に上昇したが、明確な用量反応性はみられなかった。HO-1 遺伝子発現の軽度低下はみられたが、PHD2 及び CXCL5 遺伝子の発現に影響はみられなかった。本試験で血漿中ダプロデュスタット濃度は用量の増加に伴って増加した（表 2.6.2-12）。

試験 3 ではダプロデュスタット 2% を塗布 8 時間後に拭取りし、その 40 時間後に再度塗布して 8 時間処置したとき及び塗布 48 時間後に拭取りし、直ちに再度塗布して 8 時間処置したときの HIF 応答を比較することにより、反復塗布したときの脱感受性を検討した。塗布 48 時間後に拭取りして直ちに再度 8 時間塗布したときは HO-1、VEGF-A 及び PDK1 等の HIF 応答性遺伝子の発現誘導がみられ、血漿中 EPO 濃度の顕著な上昇がみられた。一方、拭取りの 40 時間後に再度塗布したときは HO-1 でのみ遺伝子発現の誘導がみられ、血漿中 EPO 濃度の上昇はみられなかった。これらのことから、ダプロデュスタットの塗布後、拭取りして直ちに再度塗布することで HIF 応答性遺伝子の発現が誘導されることが示唆された。

**表 2.6.2-12 雄 C57/BI6 マウスの創傷皮膚にダプロデュスタットを塗布したときの血漿中ダプロデュスタット濃度**

試験	用量 (%)	測定時点 (h)	血漿中ダプロデュスタット濃度 (µg/mL)
1	2	8	11.95
	2	24	16.26 <sup>a</sup>
	2	48	5.60
2	0.01	8	0.16
	0.1	8	1.23
	0.5	8	3.68
3 (脱感受性)	2 (直ちに再度塗布)	24	10.01
	2 (拭取りの 40 時間後に再度塗布)	24	6.94

a : 非創傷皮膚に塗布したときの血漿中ダプロデュスタット濃度 (17.65 µg/mL) と同程度

Data source: 2011N118983\_00

### 2.6.2.2.5.2.2. マウスの皮膚における外用剤の評価

マウスの創傷皮膚モデルを用いた2試験を実施し、3種類のダプロデュスタット外用剤（クリーム（基剤：パラフィンワックス、セタノール、アジピン酸ジイソプロピル、Diethyl Separate、キサントガム、安息香酸、ソルビン酸、セテアレス-20（オイムルギン B2）、クエン酸、クエン酸三ナトリウム二水和物）、水混和クリーム（基剤：PEG400、PEG3350、安息香酸、ソルビン酸）及び軟膏（基剤：白色ワセリン））の PK/PD 反応性を比較検討した（2012N155204）。雄 C57/BL6 マウス（4匹/群）の背部に作製した創傷に各外用剤を 200  $\mu$ L 塗布し、試験終了時に動物をと殺して血漿及び組織を採取した。血漿中 EPO 及び VEGF 濃度を MSD アッセイにより測定した。組織から RNA を抽出し、目的遺伝子（HO-1、Glut-1、PDK-1、VEGF、CXCL5、PHD2、PHD3、18S rRNA、GAPDH、 $\beta$ -アクチン）の配列特異的プローブを用いた qRT-PCR により遺伝子発現を解析した。各遺伝子の発現量は、プールしたマウス皮膚での発現量で作成した標準曲線から外挿して定量し、 $\beta$ -アクチンの発現量に対する比として表した。ダプロデュスタット塗布による遺伝子発現に対する作用について、one-way ANOVA 及び Tukey の多重比較検定 ( $p < 0.05$ ) 又は Student の t 検定 ( $p < 0.05$ ) を用いて基剤塗布と比較した。血漿中 EPO 及び VEGF 濃度についての統計解析には Student の t 検定を用いた。

試験1では、ダプロデュスタットの3種類の2%外用剤を創傷皮膚に塗布し、1、4、8又は24時間後に皮膚を採取して遺伝子発現を解析し、採血して血漿中 EPO 及び VEGF 濃度測定並びに PK 解析を行った。

試験2では、ダプロデュスタットの含有量（0（基剤のみ）、0.1、1%）が異なる3種類の外用剤を創傷皮膚に塗布し、8時間後に皮膚を採取して遺伝子発現を解析し、採血して血漿中 EPO 及び VEGF 濃度測定並びに PK 解析を行った。

試験1はダプロデュスタットの3種類の2%外用剤を塗布したときの HIF 応答性遺伝子の発現誘導が最大となる時間を決定するために実施した。3種類すべての製剤で HIF 応答性遺伝子の中等度の発現誘導がみられ、ほとんどの HIF 応答性遺伝子で塗布約8時間後に発現誘導が最大に到達した。製剤間の遺伝子発現誘導の差はわずかであったが、血漿中 EPO 濃度は軟膏でより強い誘導がみられた。

試験2はダプロデュスタットの低用量（0.1及び1%）を塗布したときの遺伝子発現誘導作用について製剤間の違いの有無を判定するために実施した。塗布後の遺伝子発現誘導の時間経過は3種類すべての製剤で類似していた。塗布8時間後において用量反応性を検討したところ、クリーム及び軟膏は低用量（0.1及び1%）でも HIF 応答性遺伝子の発現を誘導したが、水混和クリームは低用量では発現誘導はみられなかった。いずれの製剤も用量反応性はみられず、遺伝子発現の誘導は特定の遺伝子でのみ認められた。また、血漿中 EPO 濃度は2%のクリーム及び軟膏の塗布24時間後に上昇したが、低用量では上昇はみられなかった。ダプロデュスタットの水混和クリームでは、検討したすべての用量で血漿中 EPO 濃度の上昇はみられなかった。PK 解析において、3種類いずれの製剤でも用量の増加に伴って血漿中ダプロデュスタット濃度の増加がみられた。

これらのことから、ダプロデュスタットの軟膏及びクリームをマウスの損傷皮膚に塗布したときに、検討したすべての用量で皮膚の HIF 応答性遺伝子の発現を誘導し、全身性に曝露することが示された。

#### 2.6.2.2.6. 作用機序のまとめ

ダプロデュスタットは強力な PHD 阻害薬である。PHD 阻害により HIF $\alpha$  が安定化し、低酸素に応答する遺伝子産物のうち EPO の産生が誘導される。そのため、EPO 産生を検討することによって細胞での PHD 阻害作用を評価できる。

ダプロデュスタットは経口投与により PHD1~3 に対して選択的な阻害作用を示す。ダプロデュスタットはこれらの PHD を阻害することによって HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  の水酸化を阻害し、転写因子である HIF $\alpha$  を安定化して EPO 及び他の HIF 応答性遺伝子（鉄輸送、酸素利用に関与（トランスフェリン、HO-1）の転写を活性化させると考えられる。HIF によって調節される他の細胞機能には、鉄代謝／輸送（ヘモジュベリン、フェロポルチン）、血管新生、細胞外マトリックス代謝、アポトーシス、エネルギー及び糖の代謝、血管緊張、細胞接着並びに運動性が含まれる[Epstein, 2001; Ivan, 2001; Jaakkola, 2001; Semenza, 2003; Yu, 2001]。これらのことから、ダプロデュスタットは赤血球産生を促進させ、鉄の吸収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。

#### 2.6.2.3. 副次的薬理試験

種々の組織及び器官系に対するダプロデュスタットの作用を *in vitro* で検討した。また、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）の種々の結合／取込み部位に対する親和性を検討した。これらの試験は、効力を裏付ける試験の項で述べたような既に明らかにされている作用機序以外のダプロデュスタットが有する潜在的な作用を明らかにすることを目的として実施した。実施した試験の一覧及び最終報告書の CTD における添付場所を表 2.6.2-13 に記載した。

表 2.6.2-13 ダプロデュスタット及び代謝物の副次的薬理試験

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Radioligand binding assays	Receptor, ion channel and transporter assays	In vitro	A	No	██████	UH2008/00031	4.2.1.2.
Receptor binding and enzyme activity of daprodustat and metabolites <sup>a</sup>	Receptors, ion channel and, enzymes assays	In vitro	A	No	GSK	2011N121507	4.2.1.2.
Selectivity against protein kinases	Human CDK 2, DYRK3, p70S6K, PLK1, RSK1, SRC1, VEGFR-2 kinase assays	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036	4.2.1.2.
Activity against COX1 & COX2	Rat blood/ELISA	In vitro	A	No	GSK	CH2008/00030	4.2.1.2.

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Gamma-hemoglobin expression	Human bone marrow CD34+ cells	In vitro	A	No	GSK	2012N145308	4.2.1.2.

**Key:**

a = GSK2391220A (M2), GSK2531403A and GSK2506104A (M3 stereoisomers), GSK2487818A (M4), GSK2531399A and GSK2506102A (M5 stereoisomers), GSK2531398A and GSK2531407A (M6 stereoisomers) and GSK2531401A (M13).

A = GSK1278863A, the parent form.

CDK 2 = Human-cell division kinase-2. COX = Cyclooxygenase. CP4H = Collagen prolyl hydroxylase.

DYRK3 = Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (also known as YAK3).

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay.

Hep3B = Human hepatocellular carcinoma cell line.

p70S6K = 70 kDa ribosomal protein S6 kinase.

PLK1 = Polio-like kinase 1.

RSK1 = Ribosomal s6 kinase-1.

SRC1 = Steroid receptor co-activator 1.

VEGFR-2 = Vascular endothelial growth factor receptor-2.

**Testing Facility:**

██████ = ██████  
GSK = GlaxoSmithKline.

### 2.6.2.3.1. In vitro 試験

#### 2.6.2.3.1.1. 標識リガンド結合アッセイ及び酵素アッセイ

##### 2.6.2.3.1.1.1. 選択性スクリーニング（ダプロデュスタット）

PHD 阻害作用と直接関連しない 50 種類の受容体、イオンチャネル及びトランスポーターのリガンド結合アッセイを行い、ダプロデュスタット（10  $\mu\text{M}$ , n=2）の選択性を検討した（UH2008/00031）。媒体と比較したときの被験物質の阻害／刺激率が 50%超であるときに有意な潜在的作用を有し、20～50%のときは弱～中等度の潜在的作用を有すると判定した。複数のアッセイで実験間のばらつきが大きかったため、追加の検討を行って作用の有無を確認した。アッセイの結果、20～50%未満の阻害／刺激率は主にコントロールレベルでのシグナル変動に起因するものであり、意義のあるものではないと判断した。ダプロデュスタットは 50 種類のリガンド結合アッセイにおいて 20%超の明らかな作用を示さなかった。

##### 2.6.2.3.1.1.2. 選択性スクリーニング（ダプロデュスタット及び代謝物）

ダプロデュスタット（最高 30  $\mu\text{M}$ , n=1～3）及び 6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む、最高 200  $\mu\text{M}$ , n=1～12）について、6 種類の標的クラス（G 蛋白質共役型受容体（7 回膜貫通型受容体）、イオンチャネル、膜トランスポーター、核内受容体、プロテインキナーゼ、酵素）に属する 34 種類の分子について 46 種類の機能アッセイ及び結合アッセイを実施した（2011N121507）。ダプロデュスタット及び 6 種類のヒト代謝物は、検討したいずれの標的分子に対しても明らかな作用（50%阻害／活性化濃度の平均が 1  $\mu\text{M}$  未満のとき）を示さなかった。その他、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）については細胞表面の状態を評価するアッセイ（細胞傷害の初期影響である細胞構造の変化を測定）、遺伝毒性アッセイ及びリン脂質症スクリーニングを実施したが、いずれも影響を示さなかった。これらはそれぞれ *in vivo* 毒性、遺伝毒性及びリン脂質症を示す可能性を評価する代替法である。

##### 2.6.2.3.1.2. プロテインキナーゼに対するダプロデュスタットの選択性

一連のプロテインキナーゼアッセイにおいてダプロデュスタット（最高 10  $\mu\text{M}$ , n=1～2）の阻害作用を測定し、PHD 阻害作用と比較した（UH2008/00036）。7 種類のプロテインキナーゼ（ヒト細胞分裂キナーゼ 2/サイクリン A、ポロ様キナーゼ 1、70 kDa リボソームプロテイン S6 キナーゼ、ステロイド受容体コアクチベーター 1、二重特異性チロシンリン酸化調節キナーゼ 3、血管内皮増殖因子受容体 2、ラットリボソーム S6 キナーゼ 1）に対するダプロデュスタットの IC<sub>50</sub> はいずれも 10  $\mu\text{M}$  超であった。ダプロデュスタットはこれらのプロテインキナーゼと比較して PHD（IC<sub>50</sub> は 3.3～22.2 nM）に対して選択的な阻害作用を示すことが示唆された。

##### 2.6.2.3.1.3. COX1 及び COX2 に対する作用

Sprague Dawley ラットのヘパリン化全血中の COX1 及び COX2 に対するダプロデュスタット（最大 100  $\mu\text{M}$ , n=3）の阻害作用を検討した（CH2008/00030）。ダプロデュスタットは



ラット COX1 を濃度依存的に阻害し、その IC50 は 65.9  $\mu\text{M}$  であったが、ラット COX2 に対しては阻害作用を示さなかった (IC50 は 100  $\mu\text{M}$  超)。非選択的 COX 阻害薬であるインドメタシンのラット COX1 及び COX2 に対する IC50 はそれぞれ 2.2 及び 2.0  $\mu\text{M}$  であった。ダプロデュスタットのラット COX1 に対する阻害作用はインドメタシンと比較して約 1/30 の強さであった。また、選択性スクリーニング (2011N121507) において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) のヒト COX2 に対する阻害作用を検討した結果、いずれも阻害作用を示さず IC50 は 100  $\mu\text{M}$  超であった。

#### 2.6.2.3.1.4. Hb $\gamma$ 鎖発現に対するダプロデュスタットの作用

ヒト Hb $\gamma$  鎖は PHD の阻害によって誘導される関連蛋白質であることから、鎌状赤血球貧血及び  $\beta$  サラセミアの治療に関連する可能性が考えられている [Hsieh, 2007]。ダプロデュスタットの処理による赤血球系前駆細胞の Hb $\gamma$  鎖量及びヒト白血病細胞株 (KU812 細胞株) の細胞生存能の変化を検討した (2012N145308)。骨髓の CD34 陽性細胞から分化した赤芽球前駆細胞をダプロデュスタット (0.0005~33  $\mu\text{M}$ , n=1) で 72 時間処理した後に溶解し、サンドイッチ ELISA アッセイにより Hb $\gamma$  鎖量を測定した。DMSO 処理細胞の Hb $\gamma$  鎖量を 100%として、ダプロデュスタット処理細胞の Hb $\gamma$  鎖量の相対値を算出した。KU812 細胞株をダプロデュスタット (0.0005~33  $\mu\text{M}$ , n=1) で 48 時間処理し、CellTiter-Glo ルミネセンスアッセイにより細胞生存率を算出した。CD34 陽性細胞由来赤芽球前駆細胞のヒト Hb $\gamma$  鎖量及び KU812 細胞株の生存率にダプロデュスタットの処理による変化はみられなかった。

#### 2.6.2.4. 安全性薬理試験

ダプロデュスタットの主要臓器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検討するために種々の安全性薬理試験を実施した。ダプロデュスタットの安全性薬理作用について、Sprague Dawley ラットを用いた *in vivo* での神経行動学的試験 (中枢及び末梢神経系に及ぼす影響) 及び呼吸系試験、並びにビーグル犬を用いた心血管系試験により評価した。また、イヌの 13 週間並びにサル 13 及び 39 週間の反復経口投与毒性試験において ECG 波形の評価を行った (2.6.6.3.5.、2.6.6.3.7.)。ダプロデュスタットの主なヒト代謝物にはラット及びイヌでは生成されないヒト代謝物があるが、サルに投与したときにはすべての主なヒト代謝物が生成されることから、サルは *in vivo* で心血管系機能を評価するのにより適切な動物種と考えられる。ダプロデュスタットの心血管系に及ぼす影響を評価する試験として、*in vitro* の hERG アッセイ、*ex vivo* のウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本アッセイを実施し、急性低酸素曝露ラットの心血管系パラメータに及ぼす影響を評価する補足的試験を実施した。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 hERG アッセイを実施した。

実施した安全性薬理試験、GLP 適用状況及び最終報告書の添付場所の一覧を表 2.6.2-14 に示す。ダプロデュスタットの安全性薬理試験に用いた原薬のバッチ情報及び被験物質調製法の一覧を表 2.6.2-15 に示す。安全性薬理試験の概要表は 2.6.3.4. に示した。

Sprague Dawley ラット及びビーグル犬を用いた *in vivo* の安全性薬理試験において、ダプロデュスタットは特記しない限り 1%メチルセルロースに懸濁して経口投与した。

表 2.6.2-14 ダプロデュスタット及び代謝物の安全性薬理試験

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Form	Dose (mg/kg) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Neurobehavioral study	Rat (Sprague Dawley)	8M	Oral (gavage)	A	2, 7, 20	Single	Yes	██████	VD2007/00703 (R61028)	4.2.1.3.
Respiratory study	Rat (Sprague Dawley)	4M	Oral (gavage)	A	2, 7, 20	Single	Yes	GSK	CD2007/01077 (G07333)	4.2.1.3.
hERG assay	HEK293 cells	NA	In vitro	A	47.66 $\mu$ M	NA	Yes	██████	FD2007/00403 (V27962)	4.2.1.3.
hERG and hNav1.5 assays	HEK293 cells	NA	In vitro	A	Up to 75 $\mu$ M (metabolites at up to 30 $\mu$ M) <sup>a</sup>	NA	No	GSK	2011N121507	4.2.1.3.
Rabbit left ventricular wedge assay	Rabbit (New Zealand White)	NA	Ex-vivo	A	3, 10, 30, 100 $\mu$ M	NA	No	██████	UH2008/00039	4.2.1.3.

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Form	Dose (mg/kg) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Cardiovascular effects after exposure to acute hypoxia	Rat (Sprague Dawley)	10M	Oral (gavage)	A	10, 30	5 days	No	GSK	2012N135938 (I11195)	4.2.1.3.
Cardiovascular study	Dog (beagle)	4M	Oral (capsule)	A	3, 30, 90	Single	Yes	GSK	CD2007/01078 (G07334)	4.2.1.3.

**Key:**

A = GSK1278863A.

HEK293 = Human embryonic kidney cell line.

NA = Not applicable.

a = GSK2391220A (M2), GSK2531403A and GSK2506104A (M3 stereoisomers), GSK2487818A (M4), GSK2531399A and GSK2506102A (M5 stereoisomers), GSK2531398A and GSK2531407A (M6 stereoisomers) and GSK2531401A (M13).

**Testing Facility:**

[REDACTED] = [REDACTED]

[REDACTED] = [REDACTED]

[REDACTED]

GSK = GlaxoSmithKline.

[REDACTED] = [REDACTED]

### 2.6.2.4.1. 中枢及び末梢神経系に及ぼす影響

#### 2.6.2.4.1.1. ラット

覚醒雄 Sprague Dawley ラット (8 匹/群) にダプロデュスタットの 2, 7 及び 20 mg/kg を単回経口投与した (VD2007/00703)。コントロール群には媒体を投与した。体温、末梢神経系 (呼吸数、胃腸管系、自律神経系 (瞳孔サイズ、流涙、流涎)、心血管系、腎 (尿量)) 及び中枢神経系活動 (行動変化、痙攣、運動協調性、骨格筋緊張、反射、他の神経学的変化) を投与 144 時間後までモニターした。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

ダプロデュスタットの 20 mg/kg までの用量で、投与に関連する神経行動学的及び薬理的な影響はみられなかった。

### 2.6.2.4.2. 呼吸系に及ぼす影響

#### 2.6.2.4.2.1. ラット

雄 Sprague Dawley ラット (4 匹/群、ラテン方格クロスオーバー試験デザイン) にダプロデュスタットの 2, 7 及び 20 mg/kg を少なくとも 7 日間の投与間隔を設けて各用量を単回経口投与した (CD2007/01077)。換気機能 (呼吸数、一回換気量、分時換気量)、気道抵抗 (総肺抵抗) 及び体温を投与約 168 時間後までモニターした。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

ダプロデュスタットの 20 mg/kg までの用量で、換気機能、気道抵抗及び体温に影響はみられなかった。

### 2.6.2.4.3. 心血管系に及ぼす影響

#### 2.6.2.4.3.1. In vitro 試験

##### 2.6.2.4.3.1.1. hERG アッセイ

hERG (急速活性型遅延整流性カリウムチャネルを形成するカリウムチャネルサブユニット分子) テール電流を阻害する化合物は心筋活動電位を延長させるため、ヒトで ECG 波形の Q 波の開始から T 波の終わりまで (QT) の間隔時間を延長させることが知られている。hERG cDNA を安定導入したヒト胎児由来腎細胞株 (HEK293 細胞株) を用いたホールセルパッチクランプ法により、ダプロデュスタットの hERG テール電流に対する阻害作用を検討した (FD2007/00403)。ダプロデュスタットの最高溶解濃度である 47.66  $\mu$ M (18.75  $\mu$ g/mL に相当)、媒体 (0.3% DMSO 水溶液) 又は E-4031 (hERG テール電流を阻害する陽性対照) を 1 濃度当たり 4 個の細胞に添加し、添加前後の hERG テール電流を測定した。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

ダプロデュスタットは最高溶解濃度である 47.66  $\mu$ M において、hERG テール電流に対して媒体と比較して統計学的に有意な阻害作用を示さなかった ( $p > 0.05$ , 両側検定、対応のない Student's t-test)。最高臨床用量の 24 mg を投与したときの定常状態におけるダプロデュスタットの推定最高血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) は 0.485  $\mu$ g/mL であり [2019N405983]、ヒト血漿蛋白結合は 99% であることから、このときの非結合型ダプロデュスタットの推定濃度は 0.00485  $\mu$ g/mL

である。本試験で検討した最高濃度（47.66  $\mu\text{M}$ 、18.75  $\mu\text{g/mL}$  に相当）はこの濃度の 3800 倍超に相当する。

#### 2.6.2.4.3.1.2. ダプロデュスタット及びヒト代謝物の hERG 及び hNav<sub>v</sub>1.5 チャンネルのスクリーニングアッセイ

hERG 又は hNav<sub>v</sub>1.5 を安定導入した HEK293 細胞株にダプロデュスタット（約 1~75  $\mu\text{M}$ ）、6 種類のヒト代謝物（関連する立体異性体を含む、最高濃度 30  $\mu\text{M}$ ）又は媒体（DMSO）をそれぞれ添加し、添加前後の hERG 又は hNav<sub>v</sub>1.5 テール電流を測定した（n=3~5）

（2011N121507）。陽性対照のチャンネル阻害薬として、キニジン、ドフェチリド又はチサプリドを使用した。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

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）は hERG テール電流に対していずれも作用を示さなかった。6 種類のヒト代謝物はいずれも hNav<sub>v</sub>1.5 チャンネル電流に対して作用を示さなかったが、ダプロデュスタットはわずかに作用を示し、その IC<sub>50</sub> は 158  $\mu\text{M}$ （62.16  $\mu\text{g/mL}$  に相当）であった。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 C<sub>max</sub>（0.00485  $\mu\text{g/mL}$ ）の 12000 倍超の濃度である。

#### 2.6.2.4.3.2. Ex vivo 試験

##### 2.6.2.4.3.2.1. ウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本アッセイ

ウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本を用いてダプロデュスタットの QT 間隔、T 波の頂点から終末までの時間（Tp-e）及び QRS 間隔に及ぼす影響を検討した（UH2008/00039）。QT 間隔は心室再分極時間を示し、QRS 間隔はナトリウムチャンネル電流によって決定される伝導時間を示す。雌ニュージーランド白ウサギの心臓（n=4）を摘出し、左心室壁の全層切片を切り出してカニューレを装着した後に Tyrode 液を灌流した。各標本の灌流液にダプロデュスタット（3、10、30、100  $\mu\text{M}$ 、0.1%DMSO 含有）を低濃度から添加し、各処理の後に washout を行った。1000 及び 2000 msec の周期で標本を刺激し、貫壁性 ECG を記録した。解析には反復測定分散分析を用い、有意差の検定は Dunnett の方法で行った。有意水準は p 値が 0.05 未満であることとした。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

ダプロデュスタットは 3~30  $\mu\text{M}$  で軽度であるものの濃度依存的な QT 間隔及び 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  $\mu\text{M}$  では作用を示さなかった。また、100  $\mu\text{M}$  で QRS 間隔のわずかな延長（9.1%）がみられ、3~30  $\mu\text{M}$  で等尺性収縮力の上昇（最高 9.7%）がみられたが、100  $\mu\text{M}$  までの濃度で TdP の誘発はみられなかった（TdP スコア  $\leq 0$ ）。

#### 2.6.2.4.3.3. In vivo 試験

##### 2.6.2.4.3.3.1. ラット

##### 急性低酸素応答時の心血管系パラメータに及ぼす影響

肺動脈性肺高血圧症患者において自然突然変異（HIF2 $\alpha$  の新たな機能を獲得する変異、VHL 変異）による HIF 分解の低下がみられることから、HIF 調節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]。そこで、ラットの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検討した

(2012N135938)。雄 Sprague Dawley ラット (10 匹/群) に媒体又はダプロデュスタット (10, 30 mg/kg/日) を 5 日間反復経口投与した。最終投与後に麻酔下でラットを低酸素環境 (10%O<sub>2</sub>, 90%N<sub>2</sub>) に急性曝露し、低酸素曝露の前後及び曝露時に右室収縮期圧 (PRVP)、動脈圧及び心拍数等の心血管系パラメータを約 15~20 分間測定した。心血管系パラメータ測定の直後に採血して赤血球パラメータを測定した。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

急性低酸素曝露によって起こる心拍数又は平均動脈圧の変化に対してダプロデュスタットは影響を示さなかった。30 mg/kg/日では薬理作用による末梢血の赤血球パラメータの上昇 (Hb、Hct、網状赤血球数がそれぞれ 1.19 g/dL、4.56 L/L、534.2×10<sup>9</sup> cells/L 上昇) がみられたが、10 mg/kg/日では赤血球パラメータの上昇はわずかであった。急性低酸素曝露時の PRVP の上昇に対して、10 及び 30 mg/kg/日 (それぞれ 3.8 及び 5.0 mmHg) では媒体 (2.3 mmHg) と比較してわずかな上昇がみられた。この PRVP の上昇に関して、トレンド分析では統計学的に有意 (p=0.0441) かつ用量依存的な変化であることが示されたが、ANOVA ではダプロデュスタット群と媒体群で PRVP に統計学的な有意差は認められなかった。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、媒体群でみられた PRVP の上昇範囲内の変化であった。

#### 2.6.2.4.3.3.2. イヌ

雄ビーグル犬 (4 匹/群、投与間隔を 7 日間とするラテン方格クロスオーバーデザイン) にコントロール (空のゼラチンカプセル)、ダプロデュスタットの 3, 30 及び 90 mg/kg (カプセルに封入) を単回経口投与した (CD2007/01078)。動脈圧、心拍数、ECG 及び体温を投与約 76 時間後まで継続してモニターした。試験の概要及び所見を 2.6.3.4. に示した。

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。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 72 時間後までにおいて、QTc に対する影響はみられず、ECG 波形異常及び不整脈の誘発も認められなかった。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 (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 ECG 波形に影響はみられなかった (2.6.6.3.5.、2.6.6.3.7.)。



表 2.6.2-15 安全性薬理試験のバッチ一覧

Batch or Lot Number(s)	Study Type	Species (Strain) or Test System	Form	Duration of Dosing	Report No. (Study No.)	Formulation	Concentration (mg/mL)
KD207077-049A1	Left ventricular wedge	Rabbit (New Zealand White)	A	NA	UH2008/00039	DMSO	3, 10, 30, 100 $\mu$ M
NE-021129-Batch-01-2007	hERG assay	HEK293 cells	A	NA	FD2007/00403 (V27962)	0.3% DMSO:bath solution	18.75 $\mu$ g/mL (47.66 $\mu$ M)
NE-021129-Batch-01-2007	Neurobehavioral study	Rat (Sprague Dawley)	A	Single dose	VD2007/00703 (R61028)	1	0.2, 0.7, 2
NE-021129-Batch-01-2007	Respiratory study	Rat (Sprague Dawley)	A	Single dose	CD2007/01077 (G07333)	1	0.2, 0.7, 2
NE-021129-Batch-01-2007	Cardiovascular study	Dog (beagle)	A	Single dose	CD2007/01078 (G07334)	Gelatin capsule	NA
NE-021129-Batch-01-2009	Cardiovascular effects after exposure to acute hypoxia	Rat (Sprague Dawley)	A	5 days	2012N135938 (I11195)	1	1, 3
ST84185-161T9	hERG assay and hNav1.5 assay	HEK293 cells	A	NA	2011N121507	DMSO	25 mM

Note: All studies were conducted with GSK1278863A, the parent form of daprodustat. The nonclinical safety pharmacology study batches were manufactured by a slightly different synthetic route (Route A, see 2.3.S.4.4.) than the Phase III clinical batches (Route B1) or the proposed commercial route (B3). Refer to 2.3.S.2.6.3. for further details. Specified impurities in the batches manufactured using the proposed commercial route of synthesis are qualified according to ICH Q3A (see 2.3.S.2.6. and 2.3.S.4.5.).

**Key:**

A = GSK1278863A. DMSO = Dimethyl sulfoxide. HEK293 = Human embryonic kidney cell line. NA = Not applicable.

**Formulation Code:**

1 = Aqueous 1% w/v methylcellulose.

### 2.6.2.5. 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 に対する強力な選択的な阻害薬であることが示されており (2.6.2.2.)、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有意な結合性を示さなかった

(2.6.2.3.)。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。

### 2.6.2.6. 考察及び結論

#### 2.6.2.6.1. 効力を裏付ける試験

PHD1~3 の酵素活性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ヒト PHD1~3、ラット PHD2 及び PHD3、並びにイヌ PHD3 に対しておおむね同程度の阻害作用を示し、みかけの  $K_i$  は 1.2~7.3 nM であった。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、 $\alpha$ -KG に競合的な阻害様式であることが示唆された。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。

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、HIF を介した EPO 及び VEGF の発現制御を評価するサロゲート細胞株として Hep3B 細胞株を用いた。Hep3B 細胞株において、ダプロデュスタットの処理により HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  の蓄積がみられた。この蓄積はダプロデュスタットが PHD を阻害することで生じた HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  の安定化によるものと考えられる。ダプロデュスタットは Hep3B 細胞株の EPO mRNA 量及び EPO 量を濃度依存的に増加させ、PGK-1 mRNA 量及び VEGF-A 量をわずかに増加させた。EPO 及び VEGF-A 量に対するダプロデュスタットの EC50 はそれぞれ 3.3 及び 2.2  $\mu$ M であり、媒体と比較してそれぞれ最大で 5.8 及び 2.2 倍に増加させた。これらの成績から、ダプロデュスタットは HIF1 $\alpha$  及び HIF2 $\alpha$  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。

HIF 応答性遺伝子の発現に対するダプロデュスタットの作用について包括的な解析は行っていないが、ダプロデュスタットの主な薬理的ターゲットである EPO の周辺の機序を考慮し、VEGF は理論的に様々な病理 (例えば腫瘍) と関連することから EPO 及び VEGF に対する作用の選択性に注目した。げっ歯類及び非げっ歯類の毒性試験において、VEGF の活性化によるものと考えられる血管新生等の所見はみられていない (2.6.6.3.)。また、ダプロデュスタットのマウス及びラットにおける 2 年間のがん原性試験で投与に関連する腫瘍所見はみられなかった。このマウスのがん原性試験では、げっ歯類では産生されない 3 種類の主なヒト代謝物 (M2、M3、M13) も 1 日 1 回投与している (2.6.6.5.)。

Hep3B 細胞株において、ダプロデュスタットは 12.5  $\mu$ M で BMP-6 誘導ヘンジン mRNA 発現を減少させたことから鉄輸送/利用を改善する可能性が示唆されたが、rhEPO では作用はみられなかった。このことから、本試験条件下においてダプロデュスタットの作用を介する



HIF 応答の誘導は、間接的な EPO の作用によるものではなく直接的にヘプシジン mRNA を減少させることが示唆された。

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 量が増加し、それに伴って血漿中 EPO 濃度が上昇した。ラットにダプロデュスタットの 10 mg/kg を単回経口投与したときには肝臓の EPO mRNA 量は増加したが、血漿中 EPO 濃度の上昇はみられなかった。このラットの試験で血漿中 EPO 濃度の上昇がみられなかったことは、ダプロデュスタットの用量がマウスの試験での用量と比較して低かったことによると考えられる。マウスにダプロデュスタットの 3、10 及び 30 mg/kg/日を 8 日間反復経口投与することによりすべての用量で Hb 及び Hct の有意な上昇がみられ、それぞれ最高 17 及び 25% 上昇した。また、すべての用量で赤血球数及び網状赤血球数の有意な増加もみられ、それぞれ最高 17 及び 673% 増加した。血小板数についてはすべての用量で最高 51% の有意な減少がみられ、白血球数は 10 及び 30 mg/kg/日で最高 34% の有意な減少がみられた。マウス、ラット、イヌ及びサル反復経口投与毒性試験において、ダプロデュスタットの投与によりおおむね用量依存的な赤血球系パラメータの上昇が認められた (2.6.6.3.)。

これらの試験において、ダプロデュスタットは PHD に対する阻害作用を示し、げっ歯類への反復投与により 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した。rhEPO 療法では EPO 濃度が生理的範囲を大きく超えるのに対して、ダプロデュスタットは PHD 阻害を介して赤血球産生を刺激するという作用機序から、生理的範囲の内因性 EPO 濃度で Hb を上昇させると考えられる。したがって、ダプロデュスタットによる治療では高濃度の EPO 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。

ヒト血中代謝物の予備的な定量試験において、ダプロデュスタットはヒトで広範に代謝され、これらのヒト代謝物について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）の活性をダプロデュスタットと比較した結果、PHD に対する活性、CP4H 及び FIH に対する選択性はいずれもダプロデュスタットと類似し、副次的薬理試験でのプロファイルもいずれも類似していた。Hep3B 細胞アッセイにおいて、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。このことから、ダプロデュスタットのヒト代謝物（関連する立体異性体を含む）は細胞膜の透過性が低いことが示唆される。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試験では、血液学的パラメータのわずかな上昇がみられた。

#### 2.6.2.6.2. 副次的薬理試験

ダプロデュスタットの副次的薬理作用を評価したところ、57 種類の受容体、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。ラットの全血において、ダプロデュスタットは COX1 に対して軽度ではあるものの濃度依存的な阻害作用を示した (IC<sub>50</sub> は 65.9 µM、25.93 µg/mL に相当) が、COX2 に対しては作用を示さなかった (IC<sub>50</sub> は 100 µM 超)。ラットの COX1 に対するダプロデュスタットの IC<sub>50</sub> 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 (C<sub>max</sub> : 0.485 µg/mL) の 53 倍以上の濃度に相当する。

### 2.6.2.6.3. 安全性薬理試験

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、神経行動学的影響及び呼吸系への影響はみられなかった。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。

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 テーラー電流を阻害しなかった。ウサギ摘出左心室冠動脈灌流標本アッセイにおいて、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 Tp-e の延長作用を示したが、100 µM では作用を示さなかった。また、ダプロデュスタットの 100 µM で QRS 間隔のわずかな延長がみられ、3~30 µM で等尺性収縮力の上昇がみられたが、100 µM までの濃度で TdP の誘発はみられなかった。

イヌにダプロデュスタットの 30 及び 90 mg/kg を単回経口投与したときに、投与 24 時間後まで動脈圧の変化を伴わない心拍数の上昇 (最高で 33% 上昇) がみられた。イヌにおいて心機能不全を誘発するには約 150 回/分の心拍数上昇を約 3 週間持続させる必要がある [Wilson, 1987] ことから、この急性の心拍数変化は軽度と考えられる。最高用量の 90 mg/kg では QTc 及びその他の ECG パラメータに対する影響はみられなかった。ダプロデュスタットの 90 mg/kg をイヌに経口投与したときの 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 週間反復経口投与毒性試験、並びにダプロデュスタットの投与により 3 種類の主なヒト代謝物を生成するサルを用いた 13 及び 39 週間の反復経口投与毒性試験において ECG 波形に影響はみられなかった (2.6.6.3.5.、2.6.6.3.7.)。これらの成績から、ダプロデュスタットの投与により QTc 延長又は TdP が誘発される可能性は低いと考えられる。

### 2.6.2.6.4. 結論

ダプロデュスタットは PHD1~3 に対する強力かつ選択的な阻害薬であり、腎性貧血患者への経口投与により赤血球産生を改善することが期待される。ダプロデュスタットは PHD を阻害することにより、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 HO-1 のような鉄代謝/輸送及び酸素利用を促進する因子等の HIF 応答性遺伝子の転写が促進されると考えられる。

### 2.6.2.7. 図表

図表は本文中に記載した。

### 2.6.2.8. 参考文献

Ariazi JL, Duffy KJ, Adams DF, et al. Discovery and preclinical characterization of GSK1278863 (Daprodustat), a small molecule hypoxia inducible factor–prolyl hydroxylase inhibitor for anemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017;363:336-47.

Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of

hypoxic responses. *Cell Mol Life Sci.* 2003;60:1376-93.

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.

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-2 $\alpha$  gain-of-function mutation. *FASEB J.* 2011;25:2001-11.

Ganz T. Heparin, 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.

Hsieh MM, Linde NS, Wynter A. HIF-prolyl hydroxylase inhibition results in endogenous erythropoietin induction, erythrocytosis, and modest fetal hemoglobin expression in rhesus macaques. *Blood.* 2007;110:2140-7.

Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 2001;292:464-8.

Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 2001;292:468-72.

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

Maxwell PH, Eckardt KU. HIF prolyl hydroxylase inhibitors for the treatment of renal anaemia and beyond. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12:157-68.

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.

Minervini G, Quaglia F, Tosatto SC. Insights into the proline hydroxylase (PHD) family, molecular evolution and its impact on human health. *Biochimie.* 2015;116:114-24.

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

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

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.

Yu F, White SB, Zhao Q, et al. HIF-1 $\alpha$  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.

## 1. PHARMACOLOGY: OVERVIEW FOR DAPRODUSTAT

**Table 1.1 List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed with Daprodustat**

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
<b>In vitro studies with Daprodustat</b>							
Inhibition of PHD1, PHD2 and PHD3 enzymatic activities	Rat PHD2 and PHD3, Dog PHD3, Human PHD1, PHD2 and PHD3 / LANCE assays <sup>a</sup>	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036 2011N121507	4.2.1.1.
Mode of inhibition	PHD1 and PHD3 LANCE assays <sup>a</sup>	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036	4.2.1.1.
Selectivity against other $\alpha$ -KG-dependent iron di-oxygenases	CP4H and FIH enzyme assays	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036	4.2.1.1.
HIF stabilization	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00026	4.2.1.1.
Effect on EPO and VEGF-A production	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00024	4.2.1.1.
Effects on mRNA levels and protein secretion of selected HIF responsive genes	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00027	4.2.1.1.
Effects on hepcidin expression	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	UH2009/00011	4.2.1.1.
<b>In vitro studies with metabolites of Daprodustat</b>							
Inhibition of PHD1, PHD2 and PHD3 enzymatic activities	Rat PHD2 and PHD3, Dog PHD3, Human PHD1, PHD2 and PHD3 enzyme assays	In vitro	A	No	GSK	2011N121507	4.2.1.1.

## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

**List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed with Daprodustat (Continued)**

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Selectivity against other $\alpha$ -KG-dependent iron di-oxygenases	CP4H and FIH enzyme assays	In vitro	A	No	GSK	2011N121507	4.2.1.1.
Effect on EPO production	Hep3B cells	In vitro	A	No	GSK	2012N134715	4.2.1.1.
<b>In vivo studies with Daprodustat supporting anemia</b>							
Effect on EPO and PGK-1 mRNA and EPO protein levels	Mouse (B6D2F1)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00022	4.2.1.1.
Effect on EPO and VEGF-A levels in plasma	Mouse (B6D2F1)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00023	4.2.1.1.
EPO and HIF-related gene expression	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	A	No	GSK	2011N126015 (I11211)	4.2.1.1.
Effect on erythropoiesis	Mouse (B6D2F1)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00028	4.2.1.1.
Effect on erythropoiesis	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	A	No	GSK	UH2008/00025	4.2.1.1.
<b>In vivo studies with metabolites of Daprodustat</b>							
Evaluation of M13	Mouse (CD-1)	IV (bolus)	A	No	GSK	2012N156583 (12DMM041)	4.2.1.1.
Evaluation of M2, M3 & M13	Mouse (CD-1)	Subcutaneous (Injection)	A	No	GSK	2014N208198 (M70590N)	4.2.1.1.

**CONFIDENTIAL**

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

**List of Primary Pharmacodynamic Studies Performed with Daprodustat (Continued)**

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
<b>In vivo studies for other indications<sup>b</sup></b>							
Effect on limb function after muscle damage	Mouse (C57/BL6)	Oral (gavage)	A	No	GSK	2014N197528	4.2.1.1.
HIF target gene expression and systemic exposure	Mouse (C57/BL6)	Topical	A	No	GSK	2011N118983	4.2.1.1.
Evaluation of topical formulations on mouse skin	Mouse (C57/BL6)	Topical	A	No	GSK [REDACTED]	2012N155204	4.2.1.1.

**Key:**

a = A homogeneous time resolved fluorescence quenching assay based on lanthanide chelates.  
 b = Studies were designed to support indications and/or routes of administration that are no longer being pursued.  
 A = GSK1278863A, the parent form.  
 $\alpha$ -KG =  $\alpha$ -ketoglutarate. CP4H = Collagen prolyl hydroxylase. EPO = Erythropoietin. FIH = Factor inhibiting HIF.  
 Hep3B = Human hepatocellular carcinoma cell line. HIF = Hypoxia-inducible factor. mRNA = Messenger RNA.  
 M2 = M2 metabolite of daprodustat (also known as GSK2391220),  
 M3 = One of two chiral M3 metabolites of daprodustat (also known as GSK2506104)  
 M13 = One of two chiral M13 metabolites of daprodustat (also known as GSK2531401).  
 PGK-1 = Phosphoglycerate kinase-1.  
 PHD1 = Prolyl-4-hydroxylase 1.  
 PHD2 = Prolyl-4-hydroxylase 2.  
 PHD3 = Prolyl-4-hydroxylase 3.  
 VEGF-A = Vascular endothelial growth factor A.

**Testing Facility:**

GSK = GlaxoSmithKline  
 [REDACTED] = [REDACTED]

## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

**Table 1.2 List of Secondary Pharmacodynamic Studies Performed with Daprodustat**

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Radioligand binding assays	Receptor, ion channel and transporter assays	In vitro	A	No	██████	UH2008/00031	4.2.1.2.
Receptor binding and enzyme activity of daprodustat and metabolites <sup>a</sup>	Receptors, ion channel and, enzymes assays	In vitro	A	No	GSK	2011N121507	4.2.1.2.
Selectivity against protein kinases	Human CDK2, DYRK3, p70S6K, PLK1, RSK1, SRC1, VEGFR-2 kinase assays	In vitro	A	No	GSK	UH2008/00036	4.2.1.2.
Activity against COX1 & COX2	Rat blood/ELISA	In vitro	A	No	GSK	CH2008/00030	4.2.1.2.



## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

**List of Secondary Pharmacodynamic Studies Performed with Daprodustat (Continued)**

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	Method of Administration	Form	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Gamma-hemoglobin expression	Human bone marrow CD34 <sup>+</sup> cells	In vitro	A	No	GSK	2012N145308	4.2.1.2.

**Key:**

a = GSK2391220A (M2), GSK2531403A and GSK2506104A (M3 stereoisomers), GSK2487818A (M4), GSK2531399A and GSK2506102A (M5 stereoisomers), GSK2531398A and GSK2531407A (M6 stereoisomers) and GSK2531401A (M13).

A = GSK1278863A, the free acid form.

CDK2 = Human-cell division kinase-2. COX = Cyclooxygenase. CP4H = Collagen prolyl hydroxylase.

DYRK3 = Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 3 (also known as YAK3).

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay. EPO = Erythropoietin. FIH = Factor inhibiting hypoxia inducible factor.

Hep3B = Human hepatocellular carcinoma cell line. p70S6K = 70 kDa ribosomal protein S6 kinase. PLK1 = Polio-like kinase 1.

RSK1 = Ribosomal s6 kinase-1.

SRC1 = Steroid receptor co-activator 1. VEGFR-2 = Vascular endothelial growth factor receptor-2.

**Testing Facility:**

██████ = ██████  
GSK = GlaxoSmithKline

## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

**Table 1.3 List of Safety Pharmacology Studies Performed with Daprodustat**

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Form	Dose (mg/kg) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Neurobehavioral study	Rat (Sprague Dawley)	8M	Oral (gavage)	A	2, 7, 20	Single	Yes	██████	VD2007/00703 (R61028)	4.2.1.3.
Respiratory study	Rat (Sprague Dawley)	4M	Oral (gavage)	A	2, 7, 20	Single	Yes	GSK	CD2007/01077 (G07333)	4.2.1.3.
hERG assay	HEK293 cells	NA	In vitro	A	47.66 $\mu$ M	NA	Yes	██████	FD2007/00403 (V27962)	4.2.1.3.
hERG and hNav1.5 assays	HEK293 cells	NA	In vitro	A	Up to 75 $\mu$ M (metabolites at up to 30 $\mu$ M) <sup>a</sup>	NA	No	GSK	2011N121507	4.2.1.3.
Rabbit left ventricular wedge assay	Rabbit (New Zealand White)	NA	Ex-vivo	A	3, 10, 30, 100 $\mu$ M	NA	No	██████	UH2008/00039	4.2.1.3.

## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

## List of Safety Pharmacology Studies Performed with Daprodustat (Continued)

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Form	Dose (mg/kg) or Concentration	Duration of Dosing	GLP	Testing Facility	Report No. (Study No.)	Location in CTD
Cardiovascular effects after exposure to acute hypoxia	Rat (Sprague Dawley)	10M	Oral (gavage)	A	10, 30	5 days	No	GSK	2012N135938 (I11195)	4.2.1.3.
Cardiovascular study	Dog (beagle)	4M	Oral (capsule)	A	3, 30, 90	Single	Yes	GSK	CD2007/01078 (G07334)	4.2.1.3.

**Key:**

A = GSK1278863A.

HEK293 = Human embryonic kidney 293 cell line.

NA = Not applicable.

a = GSK2391220A (M2), GSK2531403A and GSK2506104A (M3 stereoisomers), GSK2487818A (M4), GSK2531399A and GSK2506102A (M5 stereoisomers), GSK2531398A and GSK2531407A (M6 stereoisomers) and GSK2531401A (M13).

**Testing Facility:**

[REDACTED] = [REDACTED]

[REDACTED] = [REDACTED]

[REDACTED]

GSK = GlaxoSmithKline

[REDACTED] = [REDACTED]

**Table 1.4 List of Pharmacodynamic Drug Interaction Studies Performed with Daprodustat**

No nonclinical pharmacodynamic studies have been performed to specifically evaluate possible interactions of daprodustat with other drugs that may be co-administered.

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

## 2. PRIMARY PHARMACODYNAMICS

Not applicable.

### **3. SECONDARY PHARMACODYNAMICS**

Not applicable.

## 4. SAFETY PHARMACOLOGY

**Table 4.1 Safety Pharmacology Studies with Daprodustat**

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Method of Admin.	Doses <sup>a</sup> (mg/kg)	No. Per Sex Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliant	Report No. (Study No.)
Neurobehavioral	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	0, 2, 7, 20	8M	No noteworthy findings.	Yes	VD2007/00703 (R61028)
Respiratory	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	0, 2, 7, 20	4M	No noteworthy findings.	Yes	CD2007/01077 (G07333)
Cardiovascular (hERG)	HEK-293 cells	In vitro	47.66 $\mu$ M (equivalent to 18.75 $\mu$ g/mL)	NA	The maximum soluble concentration of 47.66 $\mu$ M (equivalent to 18.75 $\mu$ g/mL) produced no inhibition of hERG tail current.	Yes	FD2007/00403 (V27962)
Cardiovascular (hERG and hNav1.5)	HEK-293 cells	In vitro	Up to 75 $\mu$ M (metabolites at up to 30 $\mu$ M) <sup>b</sup>	NA	No significant inhibition of hERG tail current or hNav1.5 channel.	No	2011N121507

## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

## Safety Pharmacology Studies with Daprodustat (Continued)

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Method of Admin.	Doses <sup>a</sup> (mg/kg)	No. Per Sex Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliant	Report No. (Study No.)
Left ventricular wedge assay	Rabbit (New Zealand White)	Ex Vivo	3, 10, 30, 100 $\mu$ M	4F	There was a mild, concentration-dependent QT and Tp-e prolongation at concentrations up to 30 $\mu$ M (that reached 5.5% and 5.6% respectively at 30 $\mu$ M, P<0.05), with prolongation being abolished at 100 $\mu$ M. There was a small but statistically significant increase in QRS duration (9.1%; P value <0.05) at 100 $\mu$ M and an increase in isometric contractile force (up to 9.7%) at $\leq$ 30 $\mu$ M. Daprodustat exerted no torsadogenic potential up to 100 $\mu$ M.	No	UH2008/00039
Cardiovascular (after exposure to acute hypoxia) <sup>e</sup>	Rat (Sprague Dawley)	Oral (gavage)	0 <sup>c</sup>	10M <sup>d</sup>	In the vehicle control group there was an increase in peak right ventricular pressure of 2.3 mmHg, or 6% compared to baseline, in response to hypoxia (10% O <sub>2</sub> ).	No	2012N135938 (I11195)
			10 <sup>c</sup>		At 10 mg/kg there was an increase in peak right ventricular pressure of 3.8 mmHg, or 9% compared to baseline, in response to hypoxia (10% O <sub>2</sub> ) with increases in hemoglobin, hematocrit and reticulocytes of 0.19 g/dL, 0.88 L/L and 201.3 x 10E9/L, respectively, compared to vehicle control.		
			30 <sup>c</sup>		At 30 mg/kg there was an increase in peak right ventricular pressure of 5.0 mmHg, or 12% compared to baseline, in response to hypoxia (10% O <sub>2</sub> ) with increases in hemoglobin, hematocrit and reticulocytes of 1.19 g/dL, 4.56 L/L and 534.2 x 10E9/L, respectively, compared to vehicle control.		



## CONFIDENTIAL

m2.6.3. Pharmacology Tabulated Summary

2018N370464\_00

## Safety Pharmacology Studies with Daprodustat (Continued)

Organ Systems Evaluated	Species (Strain)	Method of Admin.	Doses <sup>a</sup> (mg/kg)	No. Per Sex Per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliant	Report No. (Study No.)
Cardiovascular	Dog (Beagle)	Oral (capsule)	0	4M	No findings	Yes	CD2007/01078 (G07334)
			3		No findings		
			30		A mild, reversible and consistent increase in heart rate of up to 20 beats/minute or up to 28% from 14 to 24 hours post dose.		
			90		A mild, reversible and consistent increase in heart rate of up to 21 beats/minute or up to 33% from 10 to 24 hours post dose.		

**Key:**

hERG = Human ether-a-go-go related gene.

HEK-293 = Human embryonic kidney 293 cell line.

a = Single dose unless specified otherwise.

b = Concentration of metabolites [GSK2391220A (M2), GSK2531403A (M3), GSK2506104A (M3), GSK2487818A (M4), GSK2506102A (M5), GSK2531399A (M5), GSK2531407A (M6), GSK2531398A (M6), GSK2531401A (M13)] tested in the study.

c = Administered once daily for 5 consecutive days and dose is expressed as mg/kg of the parent compound (Batch NE-021129-Batch-01-2009).

d = Study used parallel dosing.

e = blood samples were obtained from each rat to assess changes in RBC parameters.

## 5. PHARMACODYNAMIC DRUG INTERACTIONS

Not applicable.