2.4　非臨床試験の概括評価の目次

2.4.1　非臨床試験計画概略 2
2.4.2　薬理試験 3
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 3
2.4.2.2　副次的薬理試験 4
2.4.2.3　安全性薬理試験 4
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用 4
2.4.3　薬物動態試験 5
2.4.3.1　吸収 5
2.4.3.2　分布 6
2.4.3.3　代謝 6
2.4.3.4　排泄 8
2.4.3.5　トランスポーターに対する阻害作用及び基質特性 8
2.4.4　毒性試験 9
2.4.4.1　全身曝露量 11
2.4.4.2　単回投与毒性 13
2.4.4.3　反復投与毒性 13
2.4.4.4　遺伝毒性 15
2.4.4.5　がん原性 15
2.4.4.6　生殖発生毒性 15
2.4.4.7　局所刺激性 16
2.4.4.8　その他の毒性 16
2.4.5　総括及び結論 17
2.4.6　参考文献一覧 21

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

モリデュスタット（BAY 85-3934）は、低酸素誘導因子－プロリン水酸化酵素（HIF-PH）の選択的阻害薬であり、保存期慢性腎臓病患者及び透析患者における貧血に対する治療薬として開発している。

モリデュスタットの薬理学的特性を評価するため、*in vitro* における活性及び作用機序、並びに正常動物及び腎性貧血モデルを用いた *in vivo* 試験により検討した。副次的薬理試験では、*in vitro* スクリーニング試験によりオフターゲット活性を、*in vivo* では心血管系に対する作用を検討した。安全性薬理試験では、モリデュスタットの生命維持に重要な器官系（心電図所見を含む心血管系、中枢神経系、呼吸器系）及び腎機能に及ぼす影響について、*in vitro* 及びモリデュスタットの単回投与による *in vivo* 試験で検討した。また薬力学的薬物相互作用について、血圧低下作用を有するホスホジエステラーゼ 5（PDE5）阻害薬バルデナフィルとの併用投与により検討した。

非臨床薬物動態試験を *in vivo* 及び *in vitro* にて実施した。*In vivo* では薬理試験及び安全性試験で用いた複数の動物種において、モリデュスタットの吸収、分布、代謝及び排泄を明らかにした。*In vitro* では、タンパク結合、血球移行、代謝の種差、ヒトにおける代謝酵素を明らかにするとともに、トランスポーターに対する基質特性、更に、代謝酵素に対する阻害、誘導作用及びトランスポーターに対する阻害作用に基づき薬物相互作用の可能性を評価した。

非臨床安全性試験の目的は、標的臓器の毒性又は過剰な薬理作用の可能性とその回復性を検討すること、またヒトの治療用量における曝露量と比較可能な成績を得ることであった。したがって毒性試験プログラムには、ラット及びイヌに反復投与したときの全身毒性とその回復性を検討する試験、単回投与毒性、遺伝毒性、がん原性、生殖発生毒性及び光毒性を検討する試験を含めた。

モリデュスタットは患者に経口投与（錠剤）する予定であるため、毒性試験の投与経路は経口投与とした。

すべての重要な非臨床安全性試験は、現行の評価ガイドライン（主に ICH M3）及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）を遵守して実施した。

モリデュスタットは、ナトリウム塩であるモリデュスタットナトリウム（BAY 1053048）の有効成分（遊離塩基）である。非臨床試験では、主としてこれら遊離塩基及びナトリウム塩を用いたが、被験薬の濃度及び投与量については遊離塩基（モリデュスタット）換算で表示又は併記した。

2.4.2 薬理試験

モリデュスタットの作用機序及び特異性を評価するため、*in vitro* 試験を実施した。また *in vivo* では、正常ラット、イヌ及びサル、並びに腎性貧血ラットモデルを用いて、モリデュスタットの効果を検討した（2.6.2 及び 2.6.3）。更に、モリデュスタットナトリウムと遊離塩基との効果を比較検討し、主要な代謝物 M-1 については活性の有無を検討した。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

モリデュスタットは *in vitro* において、3 種類すべての HIF-PH アイソフォームに対し阻害活性を示した。その阻害作用は、酵素の基質である 2-オキソグルタル酸と競合するが、遊離鉄（Fe^{2+}）及びアスコルビン酸の濃度には依存しなかった。また細胞系アッセイにおいて、モリデュスタットは転写因子 HIF の安定化を促し、HIF 標的レポーター遺伝子の発現を誘導した。モリデュスタットの HIF-PH 阻害作用は可逆的であった。

ラット、イヌ及びサルにおいて、モリデュスタットを経口投与後 6 時間までに血漿中 EPO 濃度は最大に達し、その濃度は用量依存的に上昇した。その結果、赤血球産生は用量依存的に促進された（ヘモグロビン濃度の上昇、ヘマトクリット値及び網状赤血球の増加）。

ラットにおける EPO 及び赤血球産生誘導に対するモリデュスタットの最小有効用量は共に 1.25mg/kg であった。またイヌ及びサルではそれぞれ 0.6 及び 0.5mg/kg の用量で、ベースラインを上回る EPO の誘導が認められた。サルにおいて、モリデュスタットを最高用量 1.5mg/kg まで 1 日 1 回 5 日間反復経口投与しても、EPO 誘導に対する反応に順応は認められず、血漿中に EPO の蓄積もみられなかった。

ラットにモリデュスタット 2.5mg/kg を 1 日 1 回 4 週間反復経口投与後、及びサルにモリデュスタット 1.5mg/kg を 1 日 1 回 2 週間反復経口投与後の赤血球産生作用はそれぞれ、遺伝子組換えヒト EPO（rhEPO）100IU/kg の週 2 回 4 週間及び 2 週間反復皮下投与後と同等であった。

ゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにおいて、モリデュスタット 1、2.5、5 及び 10mg/kg を単回経口投与後 4 時間における血漿中 EPO 濃度及び腎臓の EPO mRNA 発現量は、いずれも正常動物と比較すると低かったが、それぞれ用量依存的に上昇及び増加した。肝臓においても、腎臓に比べ量的には少ないものの、EPO mRNA の増加がみられた。血漿中 EPO 濃度の上昇は腎臓及び肝臓の EPO mRNA 発現と相関した。更に、貧血を誘発した当該腎障害ラットモデルにおいて、モリデュスタット 2.5、5 及び 10mg/kg を 1 日 1 回週 5 回 4 週間反復経口投与した結果、ヘマトクリット値の低下に対する抑制及び回復作用がみられ、モリデュスタットの腎性貧血に対する予防及び改善効果が示された。

ペプチドグリカンーポリサッカライド誘発炎症性貧血ラットモデルにおいて、モリデュスタット 2.34 及び 4.67mg/kg を 1 日 1 回 5 週間反復経口投与した結果、ヘマトクリット値の低下に対する抑制作用がみられ、4.67mg/kg 投与群では投与後 34 日に正常レベルにまで回復した。

ラットにモリデュスタット 5mg/kg を単回経口投与後 8 時間まで、腎臓における HIF 標的遺伝子発現に対する影響を調べた結果、EPO mRNA 発現量がベースラインに比し最大 54 倍に達したのに対し、そのほかの HIF 標的遺伝子は誘導されない、又は誘導されてもわずかであった。同様に、ゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにモリデュスタット 10mg/kg までの用量を単回経口投与後 4 時間において、腎臓の EPO mRNA 発現量はベースラインに比し最大 250 倍に達したが、そのほかの HIF 標的遺伝子については腎臓及び肝臓のいずれにおいても誘導されない、又は誘導されてもわずかであった。更に、ラットにモリデュスタット 46.7mg/kg までの用量を単回経口投与後

6 時間において、血漿中 EPO 濃度はベースラインに比し最大 1000 倍に達したのに対し、血漿中 VEGF 濃度は最大でも 2.2 倍に上昇したのみであった。

モリデュスタットのナトリウム塩（モリデュスタットナトリウム）の *in vitro*（HIF-PH1 及び HIF-PH2 に対する阻害作用）及び *in vivo*（マウス及びラットにおける血漿中 EPO 誘導）における薬理作用は遊離塩基（モリデュスタット）と同等であった。

モリデュスタットのげっ歯類、イヌ及びヒトにおける主要な代謝物 M-1 は、HIF-PH1 及び HIF-PH2 に対する阻害作用を示さなかった。

結論として、モリデュスタットは、強力かつ可逆的な HIF-PH 阻害薬であり、内因性 EPO 遺伝子を選択的に誘導するという特性を有することから、EPO 反応性貧血に対する有効性が支持される。

2.4.2.2 副次的薬理試験

モリデュスタットの特異性について、受容体、イオンチャネル及びトランスポーターなどの広範な標的（67 種類）に対する放射性リガンド結合アッセイ、並びに特定酵素〔マトリックスメタロプロテアーゼ及びそのほかのペプチダーゼ（8 種類）、並びにオキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（3 種類）〕の酵素分析アッセイにより検討した結果、モリデュスタット 10μM で、いずれに対しても有意な（＞50%）影響は認められなかった。

テレメーター装着ラットにモリデュスタットを経口投与後、血圧及び心拍数に対する影響を検討した結果、2.80mg/kg 以上の用量において、一過性かつ用量依存的な平均動脈圧の低下がみられたが、圧受容器反射には影響を及ぼさなかった。0.93mg/kg では血圧に何ら影響はみられなかった。

2.4.2.3 安全性薬理試験

モリデュスタットの生命維持に重要な器官系（心電図所見を含む心血管系、中枢神経系、呼吸器系）及び腎機能に及ぼす影響について、*in vitro* 及びモリデュスタットの単回投与による *in vivo* 試験で検討した。試験はすべて、ICH S7A 及び ICH S7B ガイドラインに従い、GLP に準拠して実施した。モリデュスタットはラットの中枢神経系、呼吸器系及び腎機能（最高用量 30mg/kg）、並びにイヌの心血管系（最高用量 10mg/kg）に対し問題となる影響を及ぼさなかった。またモリデュスタットは hERG カリウム電流、及びイヌの QT 間隔を含む心電図パラメータに対し影響を及ぼさなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

テレメーター装着ラットにモリデュスタットをホスホジエステラーゼ 5（PDE5）阻害薬バルデナフィルとの併用で投与した結果、動脈圧低下に対する相加的な作用はみられたが、増強作用はみられなかった。

2.4.3 薬物動態試験

モリデュスタットの単回投与による非臨床薬物動態試験を Wistar ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いて実施し、血漿中濃度推移、臓器・組織分布、代謝及び排泄について検討した。反復投与による独立した薬物動態試験は実施せず、Wistar ラット及びビーグル犬の反復投与毒性試験において得られた曝露量に基づき、反復投与後の薬物動態を限定的に評価した。*In vitro* においては、モリデュスタット及び主代謝物である N-グルクロン酸抱合体 M-1 について、ヒト及び種々動物の血漿タンパクに対する結合、血球移行、代謝の種差、ヒトにおける代謝酵素、膜透過性、薬物トランスポーターに対する基質特性について検討した。また、モリデュスタット及び M-1 についてヒトの代謝酵素に対する阻害及び誘導作用、トランスポーターに対する阻害作用を検討した。更に、モリデュスタットのグルクロン酸抱合に及ぼす種々被験薬の影響について、*in vitro* にて検討した。試験の概要及び詳細な成績は薬物動態試験の概要文（2.6.4）及び概要表（2.6.5）に示す。

血漿中のモリデュスタット濃度の定量は、フルバリデーションを実施済みの高速液体クロマトグラフィ（HPLC）-タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）を用いた分析法により実施した。標識化合物（[^{14}C]モリデュスタットなど）を用いた試験で得られた生体試料中の放射能濃度の測定は、液体シンチレーション計数法（LSC）を用いて実施した。臓器・組織中放射能の分布は、定量的全身オートラジオグラフィ（ラジオルミノグラフィ）にて測定した。

2.4.3.1 吸収

モリデュスタットは単回経口投与後、すべての動物で速やかに吸収され、ラットでは投与 0.25～0.5 時間後、イヌでは平均で 0.3～1 時間後、サルでは 1 時間後に最高血漿中濃度に到達した。血漿中濃度の消失パターンは二相性であり、第一相における消失半減期はすべての動物で 0.40～1.24 時間と短く、終末相の消失半減期は相対的に長く、ラットで 3.0～3.4 時間、イヌでは平均で 2.2～3.4 時間、サルでは 3.4 時間（3 例中 1 例のデータ）であった。単回静脈内投与後においても血漿中濃度の消失パターンは二相性であり、第一相の消失半減期は短く、ラットで 0.30～0.34 時間、イヌで 0.82～1.0 時間、サルで 0.58 時間、終末相の消失半減期はより長く、ラットで 2.4～3.1 時間、イヌでは平均で 2.7 時間、サルで 6.5 時間（3 例中 1 例のデータ）であった。モリデュスタットの消失半減期は、対応する時間間隔で比較した場合、投与経路によらずすべての動物において同様であった。

[^{14}C]モリデュスタットをラットに経口又は静脈内投与したとき、総放射能濃度は投与経路によらず投与後 3～24 時間又は 3～32 時間の間では半減期 5.8～6.8 時間で消失した。イヌでは総放射能濃度の消失パターンは三相性であった。経口投与後 2～8 時間の第一相の消失半減期は平均 1.4 時間、経口投与後 8～15 時間での第二相の消失半減期は平均 3.6 時間、最長 168 時間までの終末相の消失半減期は平均 117 時間と長かった。同様に静脈内投与後 2～8 時間の第一相の消失半減期は平均 1.3 時間、8～24 時間後の第二相の消失半減期は平均 10.7 時間、最長 672 時間までの終末相の消失半減期は平均 186 時間であった。

モリデュスタット単回投与後の全身曝露は、ラットでは投与経路によらず AUC は用量比をやや上回って増加し、経口投与後の C_{max} は用量比をやや上回って増加した。イヌでは経口投与後の全身曝露は用量比を上回って増加したが、静脈内投与後の全身曝露の増加はやや用量比を下回った。

静脈内投与後の血漿クリアランスは、ラットにおいて 0.78～1.28L/(kg･h)、イヌでは平均で 0.53～0.78L/(kg･h)、サルでは平均で 0.7L/(kg･h)であった。血液／血漿分配比から算出した血液クリアランスは、ラットでは低い～中等度（1.13～1.85L/(kg･h)）、イヌでは中等度（0.72～

1.06L/(kg･h)) であった。分布容積はすべての動物で中等度であり、最小値はサルの 0.52L/kg、最大値はラットの 0.97L/kg であった。

[^{14}C]モリデュスタット 5mg/kg を、胆管カニューレを施した (BDC) ラットに単回経口投与したとき、放射能の吸収率は高く、投与量の約 73%以上と予測された (2.6.4.6.1)。ラットにモリデュスタット 1、5 及び 15mg/kg を単回経口投与したときの絶対的バイオアベイラビリティは、それぞれ 26、34 及び 46%と低い～中等度の範囲であった。これらの値は、*in vivo* における肝血液クリアランスから算出した理論的なバイオアベイラビリティ〔腎クリアランスの寄与を考慮しない場合の理論的なバイオアベイラビリティ (F_{max}) 73%〕よりも低く、不完全な吸収及び／又は初回通過代謝 (肝、小腸) を示唆するものである。モリデュスタットをイヌに 0.3、1.5 及び 5mg/kg の用量で単回経口投与したとき、絶対的バイオアベイラビリティはそれぞれ平均で 46、71 及び 75%であった。F_{max} は 65%であり、これは高用量 5mg/kg におけるバイオアベイラビリティと大きな差はなかったことから、この用量ではほぼ完全な吸収が示唆された。モリデュスタットをサルに 1mg/kg の用量で単回経口投与したときの絶対的バイオアベイラビリティは平均で 61%であり、吸収率は高いことが示唆された。

ラット及びイヌ反復投与毒性試験において、ラットでは全身曝露に反復投与の影響はみられなかったが、イヌでは減少傾向が認められた。全身曝露に性差は認められなかった。

2.4.3.2 分布

モリデュスタット及び M-1 の血漿中における非結合型分率には、検討した濃度範囲で明らかな濃度依存性は認められなかった。したがって、モリデュスタット及び M-1 の非結合型分率はすべての濃度の平均値として示す。モリデュスタットの血漿タンパクに対する結合率には種差が認められ、ヒトで最も高く 79.3%、マウスで最も低く 48.6%であった。M-1 の血漿タンパク結合率はヒトで 16.8%、イヌで 9.7%であり、モリデュスタットと比較すると極めて低かった。モリデュスタットのヒト血漿におけるタンパク結合に pH 依存性 (pH7.0～7.8) は認められなかった。ヒト血漿中におけるモリデュスタットの主要な結合タンパク種はアルブミンであった。α-グロブリン、γ-グロブリン及びα_1-酸性糖タンパクに対する結合率は低かった。血液中のモリデュスタットは主に血漿に分布し、C_b/C_p はヒト、ラット及びイヌにおいてそれぞれ 0.62、0.69 及び 0.73 であった (2.6.4.4.1)。

アルビノラットに単回経口投与後、[^{14}C]モリデュスタットは速やかに吸収され、放射能は全身の臓器・組織に広く速やかに分布し、また速やかに消失した。一部の臓器では、内部での不均一な分布が認められ、例えば、腎臓では、腎乳頭及び髄質周辺部の濃度が高く、副腎では皮質の濃度が高かった。臓器・組織における放射能の不可逆的な結合及び有色ラットのメラニン含有組織に対する特異的親和性は認められなかった。実質的に血液脳関門透過性は認められなかった。妊娠ラットにおいて、放射能の胎盤通過性は中等度であった (2.6.4.4.2)。

2.4.3.3 代謝

ヒト及び動物における *in vitro* 及び *in vivo* 代謝試験に基づく推定代謝経路を図 2.4.3- 1 に示す。

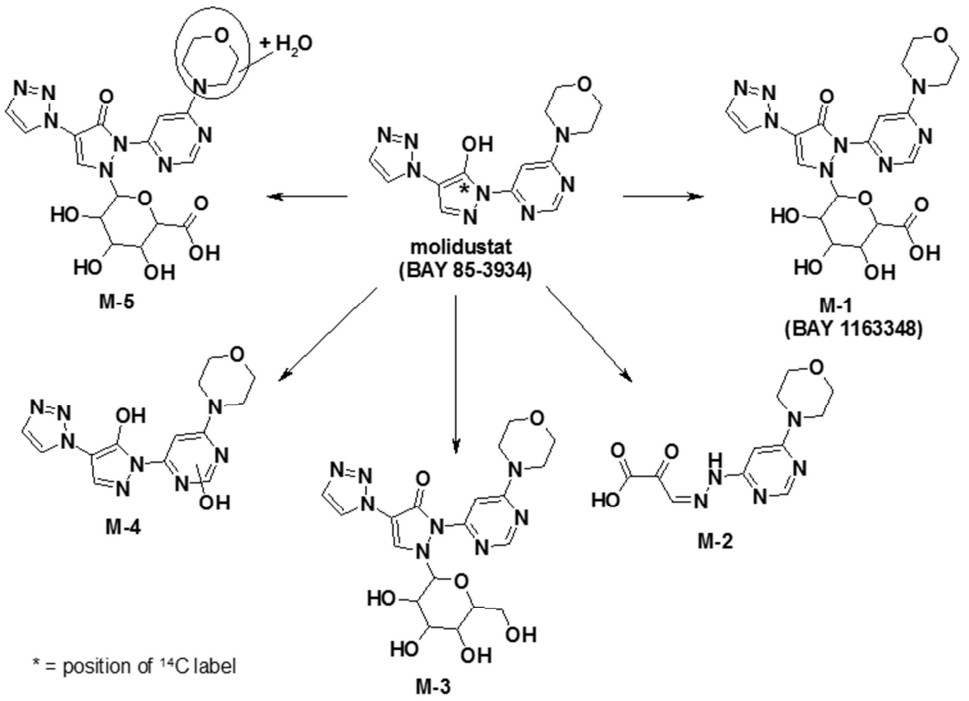


図 2.4.3- 1　ヒト及び動物におけるモリデュスタットの推定代謝経路（*in vitro* 及び *in vivo* 試験に基づく）

ヒト及び動物の肝ミクロソーム及び肝細胞を用いた *in vitro* の検討で、ヒトを含むすべての動物種における主代謝経路は、M-1 を産生する未変化体の N-グルクロン酸抱合であり、酸化的代謝の寄与はほとんどないことが明らかとなった。ヒトにおける M-1 の産生にはウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）1A1 が主に寄与しており、UGT1A9 もわずかに寄与していた。また、モリデュスタットの M-1 産生はチロシンキナーゼ阻害薬及びヒト免疫不全ウィルス（HIV）プロテアーゼ阻害薬、加えてトラニラストによって特に強く阻害された。したがって、これらの薬物を併用すると、臨床的に問題となるモリデュスタットの被相互作用が引き起こされる可能性がある（2.6.4.5.1.1、2.6.4.5.1.2、2.6.4.5.1.3、2.6.4.7.1）。

In vivo 試験においても、ラット、イヌ及びヒトの主要な代謝経路は M-1 を産生する N-グルクロン酸抱合であり、*in vitro* 試験成績と矛盾はみられなかった。モリデュスタット単回経口投与後、血漿中の総放射能 AUC について、ラットでは未変化体が約 40%に対して M-1 が約 60%、イヌ及びヒトでは未変化体が約 20%に対して M-1 が約 80%を占めた。単回経口投与後の尿中放射能の主成分はすべての動物で M-1 であり、ラットでは投与量の約 20%、イヌでは約 70%、ヒトでは約 85%が M-1 として尿中に排泄された。尿中には親化合物も排泄され、ラットでは投与量の約 12%、イヌでは約 5%、ヒトでは約 4%がモリデュスタットとして回収された。そのほかに水酸化代謝物 M-4 がヒト以外の動物種で認められ、グリコシド代謝物 M-3 がイヌで、酸化的代謝に続いてグルクロン酸抱合を受けた代謝物 M-5 がヒトで認められたが、いずれも微量成分であった。一方、糞中に M-1 は認められず、モリデュスタットがラットでは投与量の約 61%、イヌでは約 11%、ヒトでは約 6%にそれぞれ相当する量が排泄された。ラット及びイヌでは M-4 が、イヌでは更に M-3 がそれぞれ微量成分として認められた。BDC ラットの胆汁中に排泄された放射能能の大部分は M-1 であり、親化合物はわずかであったことから、糞中の未変化体の大部分は胆汁排泄された M-1 が腸内細菌により加水分解を受けたものに由来すると考えられる。胆汁中の微量成分として M-3 及び M-4 が認められた（2.6.4.5.2）。

In vitro における検討より、モリデュスタットのチトクローム P450（CYP）1A1 に対する強い阻害作用（IC_{50} 値は 5.0μM）が認められた。消失における寄与が 0.45 以上の CYP1A1 基質を併用するとモリデュスタットの CYP1A1 阻害作用を介して臨床的に問題となる相互作用を引き起こす可能性がある。また、M-1 は CYP2D6 に対して阻害作用を示したが、MSPK モデルを用いた評価から、臨床的に問題となる薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。CYP1A1（モリデュスタット）及び CYP2D6（M-1）を除く主要な CYP 及び UGT 分子種に対しての阻害作用は認められず、また、CYP 分子種に対して誘導作用を示さなかった。モリデュスタット投与後に CYP1A1 を除く主要な CYP 及び UGT に対する阻害作用、CYP に対する誘導作用を介して、臨床的に問題となる薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる（2.6.4.5.1.4、2.6.4.5.1.5、2.6.4.5.1.6）。

2.4.3.4 排泄

ラット、イヌ及びヒトのマスバランス試験において、[^{14}C]モリデュスタットを単回経口投与後、放射能は、ラットでは主に糞中（64.0%）に排泄され、イヌ及びヒトでは主に尿中（イヌ：77.7%、ヒト：90.7%）に排泄された。BDC ラットに経口投与後の胆汁中には、投与した放射能の約 37%が排泄された。胆汁中の放射能のほとんどは M-1 であったのに対して、正常ラット糞中には M-1 は認められず、糞中の放射能のほとんどは親化合物であった。したがって、消化管内での M-1 の脱抱合が示唆され、ラットにおいては薬物動態に腸肝循環の影響が考えられる（2.6.4.6.1、2.6.4.6.2、2.6.4.6.3）。

ラットにおいて、モリデュスタット及び／又は代謝物の乳汁移行が少量認められた（2.6.4.6.4）。

2.4.3.5 トランスポーターに対する阻害作用及び基質特性

モリデュスタットの消化管での吸収過程における、排出トランスポーターの影響を検討するために、P-糖タンパク（P-gp）及び乳癌耐性タンパク（BCRP）に対するモリデュスタットの基質特性を検討したところ、モリデュスタットは BCRP の基質であったが、P-gp の基質ではなく、M-1 は P-gp 及び BCRP いずれの基質でもなかった（2.6.4.8.2）。

モリデュスタットは主に肝において UGT1A1 によってグルクロン酸抱合を受けて消失し（M-1 産生）、その後 M-1 は尿中に排泄される。そこで、モリデュスタットの肝の取込みトランスポーターに対する基質特性及び M-1 の腎取込みトランスポーターに対する基質特性を検討した。その結果、モリデュスタットは肝の取込みトランスポーターである有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3 及び有機カチオントランスポーター（OCT）1 の基質ではなかった。また、M-1 は有機アニオントランスポーター（OAT）3 に対する親和性の低い基質であったが、OAT1 及び OCT2 の基質ではなかった（2.6.4.8.3）。

次に、各トランスポーターに対するモリデュスタット及び／又は M-1 の阻害作用を検討した。

モリデュスタットは *in vitro* で BCRP に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値は 6.39μM であった。また、モリデュスタットは腎取込みトランスポーターである OAT3 に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 16μM であった。一方、モリデュスタットは P-gp、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）、OAT1、OCT2、多剤排出トランスポーター（MATE）1 及び MATE2K に対しては阻害作用を示さなかった（2.6.4.8.4、2.6.4.8.5）。

M-1 は OAT3 に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 1579μM であった。また、M-1 は MATE1 及び MATE2K に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値は 150～200μM と推測された。一方、M-1 は P-gp、BCRP、

OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OAT1、OCT2、BSEP 及び多剤耐性関連タンパク（MRP）2 に対する阻害作用を *in vitro* で示さなかった（2.6.4.8.4、2.6.4.8.5）。

2.4.4 毒性試験

腎性貧血の治療薬としてモリデュスタットナトリウムの販売承認申請を支持するため、ICH M3 ガイドラインに従って毒性学的及びトキシコキネティクスプロファイルを評価した（毒性試験の概要文 2.6.6 及び概要表 2.6.7）。モリデュスタットの毒性試験一覧を表 2.4.4- 1 に示す。主要な試験は医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準（GLP）を遵守して実施した。

臨床適用経路が経口投与であることから、動物試験の投与経路は経口投与とした。ラット及びマウスを用いて単回経口投与毒性試験を実施した。反復投与毒性試験では、雌雄ラット及び雌雄イヌに 1 日 1 回の投与頻度で最長 26 週間（ラット）又は 39 週間（イヌ）反復経口投与した。ラット及びイヌは共にモリデュスタットの薬理作用に反応すること、イヌにおける代謝プロファイルがヒトに類似することから、両動物種を毒性試験の主要な動物種に選択した。

遺伝毒性試験として、ネズミチフス菌を用いた復帰変異原性試験、マウスリンフォーマ $TK^{+/-}$試験及びマウス 2 回投与後の骨髄小核試験（塩酸塩投与）で構成する標準的組合せの遺伝毒性試験を実施した。マウスリンフォーマ $TK^{+/-}$試験及びマウス骨髄小核試験の結果を最終評価するため、モリデュスタット単回投与後のラット肝臓不定期 DNA 合成（UDS）試験及びマウス骨髄細胞の染色体異常試験を、また、ラット 4 週間反復投与試験より採取した肝臓及び骨髄標本より、肝臓の UDS 試験及び骨髄の小核試験並びに骨髄細胞の染色体異常試験をフォローアップ試験として実施した。

マウス及びラットを用い、約 2 年間の長期経口投与によるがん原性試験を実施した。

生殖発生毒性試験として、ラットを用いた受胎能及び初期胚発生に関する試験、ラット及びウサギを用いた胚・胎児発生毒性試験、並びにラットを用いた出生前及び出生後の発育及び母体の機能に関する試験を実施した。

更に、*in vitro* 光毒性試験を実施した。

表 2.4.4- 1 モリデュスタットの毒性試験一覧表

Type of Study/ Study Duration	Species and Strain	Method of Administration	GLP compli.	Location (Report no.)
Single-Dose Toxicity				
Single dose	Mouse, NMRI	Oral, gavage Intravenous	Yes	4.2.3.1.1 (PH-35937)
	Rat, Wistar	Oral, gavage		
Repeated-Dose Toxicity				
2 weeks (TK)	Mice, CD-1	Oral, drinking	No	4.2.3.2.1 (PH-36985)
13 weeks (TK)		Oral, drinking	Yes	4.2.3.2.2 (PH-37097)
4 weeks (TK) + 2-week recovery	Rat, Wistar	Oral, gavage	Yes	4.2.3.2.3 (PH-36369)
13 weeks (TK) + 4-week recovery		Oral, gavage	Yes	4.2.3.2.4 (PH-37056)
26 weeks (TK)		Oral, gavage	Yes	4.2.3.2.5 (PH-37098)
4 weeks (TK) + 2-week recovery	Dog, Beagle	Oral, gavage	Yes	4.2.3.2.6 (PH-36352)
13 weeks (TK) + 4-week recovery		Oral, gavage	Yes	4.2.3.2.7 (PH-36672 & PH-36672A)
39 weeks (TK)		Oral, gavage	Yes	4.2.3.2.8 (PH-37341)
Genotoxicity				
In vitro				
Ames Test	Salmonella strains	*In vitro*	Yes	4.2.3.3.1.1 (PH-35906)
Mouse lymphoma $TK^{+/-}$ assay	Mouse lymphoma L5178Y cell line	*In vitro*	Yes	4.2.3.3.1.2 (A46413)
In vivo				
MNT 1 [b]	Mouse, NMRI	Intraperitoneal (Twice dose)	Yes	4.2.3.3.2.1 (PH-35182)
MNT 2 [a]	Rat, Wistar	Oral, gavage (4-week study)	Yes	4.2.3.2.3 (PH-36369)
Chromosomal aberration 1	Mouse, NMRI	Intraperitoneal (Single dose)	Yes	4.2.3.3.2.2 (PH-36384)
Chromosomal aberration 2 [a]	Rat, Wistar	Oral, gavage (4-week study)	Yes	4.2.3.2.3 (PH-36369)
UDS test 1 in liver	Rat, Wistar	Oral, gavage (Single dose)	Yes	4.2.3.3.2.3 (PH-36222)
UDS test 2 in liver [a]	Rat, Wistar	Oral, gavage (4-week study)	Yes	4.2.3.2.3 (PH-36369)
Carcinogenicity				
2 years bioassay (TK)	Mouse, CD-1	Oral, drinking	Yes	4.2.3.4.1.1 (PH-39298)
2 years bioassay (TK)	Rat, Wistar	Oral, gavage	Yes	4.2.3.4.1.2 (R-13234)

(to be continued)

表 2.4.4- 1 モリデュスタットの毒性試験一覧表（続き）

Type of Study/ Study Duration	Species and Strain	Method of Administration	GLP compli.	Location (Report no.)
Reproductive and Developmental Toxicity				
Fertility & early embryonic development	Rat, Wistar	Oral, gavage	Yes	4.2.3.5.1.1 (PH-37929)
Embryo-fetal toxicity (TK)	Rat, Wistar	Oral, gavage	Yes	4.2.3.5.2.1 (PH-38264)
Embryo-fetal toxicity (TK)	Rabbit, Himalayan	Oral, gavage	Yes	4.2.3.5.2.2 (PH-38267)
Pre- & postnatal development	Rat, Wistar (DRF)	Oral, gavage	No	4.2.3.5.3.1 (R-12718)
	Rat, Wistar	Oral, gavage	Yes	4.2.3.5.3.2 (R-13169)
Local Tolerance				
Local tolerability	Rabbit, NZW	i.v. & paravenous	Yes	4.2.3.6.1 (PH-37928)
Others				
Phototoxicity				
3T3 NRU test	Mouse fibroblasts	*In vitro*	Yes	4.2.3.7.7.1 (PH-36905)

TK: toxicokinetics
[a] included in the 4-week repeat dose toxicity study in rats,
[b] as HCl salt of BAY 85-3934 (BAY 85-3593), [c] as Na-salt of BAY 85-3934 (BAY 1053048)
MNT: micronucleus test, DRF: dose range finding, NZW: New Zealand White
UDS: unscheduled DNA synthesis

2.4.4.1 全身曝露量

モリデュスタットの血漿中濃度を測定し、薬物動態プロファイルを明らかにするため、反復投与毒性試験、がん原性試験及び胚・胎児発生毒性試験において、トキシコキネティクス（TK）を評価した（表 2.4.4- 1）。

予定最大臨床用量は 1 日 1 回 200mg（平均体重を 60kg として約 3.3mg/kg/日）であることから、曝露量比較ではヒトに 200mg を反復投与時の定常状態での曝露量を基に、たん白結合率の種差を考慮し、非結合型曝露量で各々比較した。一連の毒性試験における曝露量及び予定臨床最大用量投与時の曝露量との比（MoE）を表 2.4.4- 2 に示す。

表 2.4.4- 2 毒性試験における定常状態での曝露量及び臨床曝露量との比（MoE）

Daily dose [mg/kg]	Sex	Total exposure				Unbound exposure			
		C_{max}		AUC(0-24)		$C_{max,u}$		$AUC(0-24)_u$	
		[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE	[µg/L]	MoE	[µg·h/L]	MoE
13-week repeated-dose toxicity study in mice									
3.2	M	28.5	0.01	289	0.04	14.6	0.02	149	0.1
10.9	M	105	0.04	988	0.2	54.0	0.1	508	0.4
3.1	F	22.3	0.01	335	0.05	11.5	0.02	172	0.1
10.9	F	69.0	0.02	959	0.1	35.5	0.1	493	0.4
4-week repeated-dose toxicity study in rats									
5	M	546	0.2	3014	0.5	187	0.3	1031	1.0
15	M	1848	1.0	9226	1.4	632	1.1	3155	2.4
50	M	6876	2.4	34269	5.3	2352	4.0	11720	8.8
5	F	519	0.2	3502	0.5	177	0.3	1198	1.0
15	F	1612	1.0	9064	1.4	551	0.9	3100	2.3
50	F	8177	2.9	43864	6.8	2797	4.7	15001	11.2
13-week repeated-dose toxicity study in rats (males and females pooled)									
1.5	M+F	200	0.1	979	0.2	68.4	0.1	335	0.2
5	M+F	574	0.2	3140	0.5	196.3	0.3	1074	1.0
15/10	M+F	1020	0.4	5930	1.0	348.8	0.6	2028	1.5
26-week repeated-dose toxicity study in rats									
0.3	M	37.5	0.01	137	0.02	12.8	0.02	46.9	0.03
1	M	141	0.05	476	0.1	48.2	0.1	162.8	0.1
3	M	342	0.1	1590	0.2	117.0	0.2	543.8	0.4
0.3	F	46.5	0.02	146	0.02	15.9	0.03	49.9	0.04
1	F	167	0.06	695	0.1	57.1	0.1	237.7	0.2
3	F	732	0.3	1830	0.3	250.3	0.4	625.9	0.5
4-week repeated-dose toxicity study in dogs (males and females pooled)									
5	M+F	2445	0.9	3240	0.5	982.9	1.7	1302	1.0
15	M+F	8283	2.9	13695	2.1	3329.8	5.6	5505	4.1
50	M+F	40800	14.2	80680	12.5	16401.6	27.6	32433	24.2
13-week repeated-dose toxicity study in dogs (males and females pooled)									
2.5	M+F	934	0.3	1530	0.2	375.5	0.6	615	0.5
7.5	M+F	4400	1.5	6680	1.0	1768.8	3.0	2685	2.0
25	M+F	16800	5.9	30200	4.7	6753.6	11.4	12140	9.1
39-week repeated-dose toxicity study in dogs (males and females pooled)									
0.5	M+F	146	0.05	285	0.04	58.7	0.1	115	0.1
1.5	M+F	491	0.2	821	0.1	197.4	0.3	330	0.2
5	M+F	2450	0.9	3880	1.0	984.9	1.7	1560	1.2
2 years carcinogenicity toxicity study in mice									
0.5	M	5.85	0.002	73.3	0.01	3.0	0.005	37.7	0.03
1.5	M	15.5	0.01	173	0.03	8.0	0.01	88.9	0.07
5.0	M	32.7	0.01	429	0.1	16.8	0.03	221	0.2
0.5	F	5.85	0.002	87.9	0.01	3.0	0.005	45.2	0.03
1.5	F	16.2	0.01	170	0.03	8.3	0.01	87.4	0.07
5.0	F	64.6	0.02	719	0.1	33.2	0.06	370	0.3
2 years carcinogenicity toxicity study in rats									
0.1	M	20.0	0.01	47.7	0.01	6.8	0.01	16.3	0.01
0.3	M	44.0	0.02	153	0.02	15.0	0.03	52.3	0.04
1	M	225	0.1	508	0.1	77.0	0.1	173.7	0.1
0.1	F	30.6	0.01	71.1	0.01	10.5	0.02	24.3	0.02
0.3	F	78.6	0.03	189	0.03	26.9	0.05	64.6	0.05
1	F	293	0.1	689	0.1	100.2	0.2	235.6	0.2
Human exposure[d] at clinical maximal dose									
200 mg [a]		2866		6470		593		1339	

Tobe continued

表 2.4.4- 2 毒性試験における定常状態での曝露量及び臨床曝露量との比（MoE）

Daily dose [mg/kg]	Sex	Total exposure				Unbound exposure			
		C_{max}		AUC(0-24)		$C_{max,u}$		$AUC(0-24)_u$	
		[μg/L]	MoE	[μg·h/L]	MoE	[μg/L]	MoE	[μg·h/L]	MoE
Fertility and early embryonic developmental study in rats [b]									
2	M	218	0.1	1206	0.2	75	0.1	412	0.3
6	M	655	0.2	3617	0.6	224	0.4	1237	0.9
20	M	2464	0.9	12301	1.9	843	1.4	4207	3.1
2	F	208	0.1	1401	0.2	71	0.1	479	0.4
6	F	623	0.2	4202	0.6	213	0.4	1437	1.1
20	F	2149	0.7	12085	1.9	735	1.2	4133	3.1
Embryo-fetal toxicity study in rats									
3	F	317	0.1	2190	0.3	108	0.2	749	0.6
10	F	1010	0.4	7660	1.2	345	0.6	2620	2.0
30	F	5100	1.8	28700	4.4	1744	2.9	9815	7.3
Embryo-fetal toxicity study in rabbits									
2	F	302	0.1	574	0.1	96	0.2	182	0.1
6	F	1590	0.6	2630	0.4	504	0.8	834	0.6
20	F	10000	3.5	12000	1.9	3170	5.3	3804	2.8
Pre- and postnatal developmental toxicity study in rats [c]									
3.7	F	384	0.1	2591	0.4	131	0.2	886	0.7
7.5	F	806	0.3	4532	0.7	276	0.5	1550	1.2
14.9	F	1612	0.6	9064	1.4	551	0.9	3100	2.3
Human exposure [d] at clinical maximal dose									
200 mg [a]		2866		6470		593		1339	

fu: [%]; human: 20.7, rat: 34.2, mouse: 51.4, dog: 40.2, rabbit: 31.7
NOAELs were shown in bold or underlined.
a : maximal clinical therapeutic dose, MoE: multiple of exposures
b: Exposures in fertility study were extraporated from those obtained from 4-week study in rats (exposure at 2 mg/kg = exposure at 5 mg/kg in 4-week study x 2/5, exposure at 6 mg/kg = exposure at 5 mg/kg in 4-week study x 6/5, exposure at 20 mg/kg = exposure at 15 mg/kg in 4-week study x 20/15).
c: Exposures in PPND study were extraporated from those obtained from 4-week study in rats (exposure at 3.7 mg/kg = exposure at 5 mg/kg in 4-week study x 3.7/5, exposure at 7.5 mg/kg = exposure at 15 mg/kg in 4-week study x 1/2, exposure at 15 mg/kg = exposure at 15 mg/kg in 4-week study in female rats).
d: C_{max} and AUC at 200 mg molidustat were estimated by using mean of the highest C_{max}/D and AUC/D values in 2 or 3 studies in CKD patients.
C_{max}: Study 15557 (dose: 20 mg), 17767 (dose: 75 mg) and 16370 (dose: 80 mg)
AUC: Study 15557 (dose: 20 mg) and 17767 (75 mg)

2.4.4.2 単回投与毒性

単回経口投与後の概略の致死量はラット及びマウスで 2000mg/kg、イヌ（短期反復投与毒性試験より考察）で 50mg/kg より大きく、臨床最大用量 3.3mg/kg（200mg/60kg/日）と比較して十分高かった。

2.4.4.3 反復投与毒性

雌雄ラット及び雌雄イヌに 1 日 1 回の投与頻度で最長 26 週間（ラット）又は 39 週間（イヌ）反復経口投与した。ラット及びイヌは共にモリデュスタットの薬理作用に反応すること、イヌにおける代謝プロファイルがヒトに類似することから、両動物種を毒性試験の主要な動物種に選択した。

ラット 4 週間反復投与試験では、モリデュスタットとして 0、5、15 及び 50mg/kg を反復経口投与し、50mg/kg 群では持続的血液濃縮（高 Ht 高 Hb 血）に関連した毒性所見として、死亡又は切迫殺の出現、摂餌量減少、体重増加抑制（雄）、骨髄線維化、過骨症、肺及び骨髄の血栓が、また、動物の一般状態悪化に二次的に起因して、胸腺・乳腺・甲状腺・膵臓の委縮がみられた。

15mg/kg 以上では心臓の心筋肥大・変性・房室弁の変性・線維化・血栓、腎臓の尿細管変性及び腺胃粘膜の限局性びらん、雄 15mg/kg 以上及び雌 5mg/kg 以上で肺胞出血がみられた。2 週間の休薬後、心臓の房室弁の血栓及び線維化以外の所見には回復性が認められた（2.6.6.3.1.2）。

ラット 13 週間反復投与試験では、モリデュスタットとして 1.5、5 及び 15mg/kg を反復経口投与後、持続的血液濃縮（高 Ht 高 Hb 血）に関連した毒性所見として、15mg/kg 群では一般状態の悪化、及び死亡又は切迫殺がみられ、9 週目より投与量を 10mg/kg に減量して投与を継続した。投与終盤には中間用量の雄 5mg/kg 群においても少数例の死亡がみられた。また、雌雄 15mg/kg 群で大腿骨の骨髄線維化及び過骨症が、雌 15mg/kg 群で腎臓の好塩基性（再生）尿細管及び肝臓で胆管過形成又は肥大がみられた。雌雄 5mg/kg 以上の群で腎臓糸球体の腫大、心筋肥大及び肺の血管中膜肥厚がみられた。雄 5mg/kg 以上及び雌 15mg/kg 群で心臓弁の変性・血栓がみられた。雄 1.5mg/kg 以上及び雌 5mg/kg 以上の群で心臓弁の線維化が認められた（2.6.6.3.1.3）。

ラット 26 週間反復投与試験では、モリデュスタットとして 0、0.3、1.0 及び 3mg/kg を反復経口投与後、持続的血液濃縮（高 Ht 高 Hb 血）に関連した毒性所見として、雌雄 3mg/kg 群に心臓弁の線維化、雄 3mg/kg 群で肺の小血管の鉱質化及び慢性腎症発生頻度増加、雄 1mg/kg 以上及び雌 3mg/kg 群で腎臓糸球体腫大がみられた（2.6.6.3.1.4）。

イヌ 4 週間反復投与試験では、モリデュスタットとして 0、5、15 及び 50mg/kg を反復経口投与したところ、持続的血液濃縮（高 Ht 高 Hb 血）に関連した毒性所見として、雌雄 50mg/kg 群で肺の小静脈変化が、雄 50mg/kg 群で軽度な体重増加抑制、腎臓のリピドーシスと十二指腸粘膜びらんがみられ、雌 50mg/kg 群で肺の顆粒球症、脾臓白脾髄の出血、顎下腺の限局性萎縮及び大腿骨で骨髄線維化がみられた（2.6.6.3.2.1）。

イヌ 13 週間反復投与試験では、モリデュスタットとして 0、2.5、7.5 及び 25mg/kg を反復経口投与後、持続的血液濃縮（高 Ht 高 Hb 血）に関連した毒性所見として、雌高用量 25mg/kg 群で体重増加抑制、雌雄 25mg/kg で肝臓の小葉中心性変性と線維化、脾臓のコラーゲン線維増加及び膵臓の腺房萎縮がみられた。雌雄 7.5mg/kg 以上で骨髄線維化、大腿骨及び胸骨の過骨症、腎糸球体腫大及び胸腺萎縮が、雄又は雌 7.5mg/kg 以上で精巣・前立腺、卵巣・子宮・膣の発育遅延がみられた（2.6.6.3.2.2）。

イヌ 39 週間反復投与試験では、モリデュスタットとして 0、0.5、1.5 及び 5mg/kg を反復経口投与後、持続的血液濃縮（高 Ht 高 Hb 血）に関連した毒性所見として、雌 5mg/kg 全例が重度一般状態悪化により切迫殺された。雌雄 5mg/kg 群で骨髄線維化、腎臓好塩基性（再生）尿細管の増加、坐骨神経の軸索変性及び肝内胆管増生（血中 GLDH 及び ALT 増加を伴う）が、雄 5mg/kg 群で心臓の小動脈炎／小動脈周囲炎、脾臓の巣状壊死及び肝臓の壊死（血中 LDH 及び GGT 増加を伴う）、雌 5mg/kg 群で脾臓及び扁桃の萎縮がみられた。更に、雌雄 1.5mg/kg 以上で胸腺の萎縮及び腎臓の糸球体腫大（メサンギウム肥厚を伴う）が観察された（2.6.6.3.2.3）。

以上のように、ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験で認められた所見は、概して遺伝子組換えヒトエリスロポエチン（rhEPO）製剤の反復投与毒性試験においても同様に観察されている所見と同様であり、主薬理作用である赤血球造血亢進による血液濃縮・多血状態の持続に関連した変化であり、造血亢進に直接的あるいは二次的に関連しない毒性所見は認められなかった。持続的な多血状態・高粘度血液は循環障害及び全身諸臓器のうっ血を招き、特にラットでは心臓への負荷の増大（心室拡張、房室弁・心房の血栓症・心筋変性・線維化など）を来たし、各種臓器での血栓・腎臓の糸球体腫大、更に骨髄線維化・過骨症などの毒性所見を惹起した。投与期間の延長に伴って毒性発現用量及び無毒性量は小さくなった。また、反復投与試験で観察された所見は一部の線維化や血栓を除き、休薬により回復又は軽減した。一方、臨床ではヘモグロビンを正常範囲に保つようモニターするため、ヘモグロビン及びヘマトクリット値が正常な健康動物を

用いた毒性試験でみられた多血状態の持続に由来するような所見が、臨床使用上のリスクとなる可能性は低い。

2.4.4.4 遺伝毒性

標準的組合せの遺伝毒性試験を実施した結果、ネズミチフス菌を用いた復帰変異原性試験は陰性（2.6.6.4.1.1）、マウスリンフォーマ $TK^{+/-}$試験は陽性であった（2.6.6.4.1.2）。マウスにおける腹腔内 2 回投与後の骨髄小核試験では結論できなかった（2.6.6.4.2.1）。雄ラットへの 4 週間反復投与後、正染性赤血球の小核出現頻度は有意な増加を示したが、小核を有する多染性赤血球には有意な増加は認められなかった（2.6.6.4.2.2）。一方、マウス（2.6.6.4.2.3）及びラット（2.6.6.4.2.4）への単回及び反復投与後の骨髄に染色体異常誘発は認められなかったこと、また、単回（2.6.6.4.2.5）及び反復投与（2.6.6.4.2.6）後のラット肝臓を用いた UDS 試験の結果が陰性であったことから、*in vitro* マウスリンフォーマ $TK^{+/-}$試験で観察された遺伝毒性の徴候は、*in vivo* では意義のない所見であることが確認された。以上のように、モリデュスタットには生物学的に意義のある遺伝毒性リスクは認められないと結論した。

2.4.4.5 がん原性

マウスにモリデュスタットとして最高用量 5mg/kg までの 2 年間連日投与時の忍容性は良好で、体重を含めて動物の一般状態、生死、摂餌量、臨床病理学的検査及び器官重量に毒性所見は認められなかった。モリデュスタット投与に関連した特定の腫瘍性及び前腫瘍性病変の発生頻度の増加は認められなかった。最高用量 5mg/kg 群において、赤血球数、ヘモグロビン量及びヘマトクリット値の増加が、骨髄造血亢進又は脾臓における髄外造血亢進を伴って観察されたが、期待される薬理作用としての赤血球造血作用の発現と考えられた。最高用量の曝露量は臨床最大曝露量（AUCu）の 0.2 又は 0.3 倍であったが、ヘモグロビン及びヘマトクリット値が平均値比較で対照群の約 1.2 倍高値を維持して 2 年間連日飲水投与された結果、がん原性が認められなかったことは意義があると考えられる（2.6.6.5.1）。

ラットにおいてはモリデュスタットとして最高用量 1mg/kg までの約 2 年間の連日強制経口投与時の忍容性は良好で、体重を含めて動物の一般状態、生死、摂餌量及び器官重量に毒性所見は認められなかった。病理学的検査所見においても、モリデュスタット投与に関連した特定の腫瘍性及び前腫瘍性病変の発生頻度の増加は認められなかった。最高用量 1mg/kg 群ではヘモグロビン量及びヘマトクリット値の増加、並びに赤血球数増加傾向が一貫して認められ、当該用量での曝露量は臨床最大曝露量（AUCu）の 0.1 又は 0.2 倍ではあったが、マウス試験と同様に、高ヘモグロビン高ヘマトクリット値を維持して 2 年間連日反復投与された結果、がん原性は認められなかった（2.6.6.5.2）。

2.4.4.6 生殖発生毒性

ラット受胎能試験において、雄 6mg/kg 以上で一般状態の不良及び死亡率の増加がみられたが、ヘマトクリット増加に続く臓器血流への二次的影響という薬理学的作用機序に関連したものと考えられた。着床後死亡の増加とこれに続く生存胎児数減少もまた同様に、母動物及び／又は胎盤血流への多血状態の持続的影響に関連した機序が想定される。最高用量 20mg/kg まで雄授胎能への影響は認められなかった（2.6.6.6.1）。

ラット器官形成期投与試験において、モリデュスタット 30mg/kg の投与は胎児における眼の奇形を増加させた。胎児の発生過程における HIF 活性上昇に関連した小眼球症の発生が報告されていることから、この所見はモリデュスタットの薬理学的作用機序に関連したものと考えられる。更に、同じく 30mg/kg 群において母動物に毒性徴候及び非特異的な胎児毒性（着床後死亡・後期

吸収胚増加、生存胎児数及び生存児平均体重減少）が観察され、これらもモリデュスタットによるヘマトクリットの増加、血液粘度の増加の結果に続発する、胎盤及び臓器血流の変化という薬理学的作用に関連した変化と推定される（2.6.6.6.2.1）。

ウサギ器官形成期投与試験においては、モリデュスタットは最高用量 20mg/kg まで母動物毒性を誘発せず、子宮内発生にも影響を及ぼさなかった（2.6.6.6.2.2）。

ラット出生前及び出生後の発育及び母体の機能に関する試験では、母動物への毒性用量投与時に、着床後死亡の増加、平均生存児数の減少、胃内無乳出生児及び死産児の増加、出生児の低体重及び機能発達の一部遅延が観察されたが、母動物の一般状態悪化に続発した二次的な影響と考えられた（2.6.6.6.3）。

2.4.4.7 局所刺激性

独立した胃腸管局所刺激性試験は実施しなかった。経口投与による反復投与毒性試験の胃腸管の病理組織学的検査所見より局所刺激性の有無を評価した。その結果、胃腸管粘膜に局所刺激性を示唆する病理組織学的所見は認められなかったことから、モリデュスタットは胃腸管に対する局所刺激性はないと考えられた。

2.4.4.8 その他の毒性

光毒性

モリデュスタットは 290～720nm の範囲で光を吸収を示すことから、in vitro 3T3 NRU 光毒性試験を実施したところ、毒性係数（photoirritation factor：PIF）は 1 であり、モリデュスタットに光毒性はないと結論した（2.6.6.8.2）。

不純物の毒性／安全性評価

最終製剤中に混入する可能性のある遺伝毒性不純物は認められない。また、非遺伝毒性不純物はいずれも原薬規格 [redacted]%以下で管理されている。

2.4.5 総括及び結論

モリデュスタットは、HIF-PH に対する選択的阻害薬であり、*in vitro* 試験での作用及び選択性、並びに種々の正常動物及び貧血モデルにおける *in vivo* での効果に基づいて候補薬として選択された。

モリデュスタットは *in vitro* において、HIF-PH アイソフォーム（HIF-PH1、HIF-PH2、HIF-PH3）に対する阻害作用を有し、HIF 安定化作用を示すことが確認された。またげっ歯類、及び非げっ歯類（イヌ、サル）並びに腎性貧血ラットモデルを用いた *in vivo* による検討において、モリデュスタットは EPO を誘導し赤血球産生作用を発揮することが確認された。また EPO 以外の HIF 標的遺伝子発現を検討した *in vivo* 試験の成績から、モリデュスタットが選択的に EPO を誘導することが確認された。

受容体、イオンチャネル及びトランスポーターなどの広範な標的に対するオフターゲット作用を評価した *in vitro* スクリーニング試験において、モリデュスタットは作用を示さなかった。

テレメーター装着ラットにおいて、モリデュスタットの投与後、一過性かつ用量依存的な平均動脈圧の低下がみられ、同時に観察された心拍数の増加は血管拡張に応じた圧受容器反射を介する反射性頻脈によるものと考えられた。しかし、モリデュスタットは圧受容器反射の感受性及び振幅に影響を及ぼさなかった。血圧低下の機序は不明であるものの、モリデュスタットの血漿中濃度及び血圧低下作用のそれぞれが最大となる時間には開きがあったことから、モリデュスタットの直接作用ではなく、2 次的な作用によるものと考えられる。

ラットにモリデュスタット及び PDE5 阻害薬バルデナフィルを併用投与した結果、血圧は相加的に低下したものの、血圧低下作用は増強されなかった。

生命維持に重要な器官系（心電図所見を含む心血管系、中枢神経系、呼吸器系）及び腎機能を検討した安全性薬理試験において、モリデュスタットは問題となる影響を及ぼさなかった。心室再分極（hERG カリウムチャネル及びイヌの心電図パラメータ）に対する影響はみられず、ヒトに催不整脈作用を示す可能性は低いと考えられる。

ラット、イヌ及びサルにおけるモリデュスタットの薬物動態に明らかな種差は認められず、血漿及び血液クリアランスは低～中等度、分布容積は中等度であった。ラットにおいては代謝物として相当量のグルクロン酸抱合体が胆汁中に排泄されることから、ラットにおける薬物動態パラメータは腸肝循環の影響を含む可能性がある。

モリデュスタットの血漿中濃度は、投与経路によらずすべての動物種で二相性の消失パターンを示し、同じ時間帯で比較するとすべての動物種で消失半減期は類似していた。ラット及びイヌにモリデュスタットを単回経口投与したとき、全身曝露は用量比例性をやや上回って増加する傾向が認められた。ラット及びイヌ反復経口投与毒性試験において、ラットでは全身曝露に反復投与の影響はみられなかったが、イヌでは減少傾向が認められた。全身曝露に性差は認められなかった。

モリデュスタットの血漿タンパク結合率は低く、48.6%（マウス）～79.3%（ヒト）の範囲であり、種差が認められた。主要代謝物 M-1 のタンパク結合率も低く、ヒトで 16.8%、イヌで 9.7%であった。

ラットに[^{14}C]モリデュスタットを単回経口投与後、放射能は全身の臓器・組織に広く速やかに分布した後、速やかに消失した。腎臓など一部の臓器では、内部での不均一な分布が認められた。

臓器・組織における放射能の不可逆的な結合及びメラニン含有組織に対する特異的親和性は認められなかった。実質的に血液脳関門通過性はみられなかった。すべての臓器・組織におけるみかけの消失半減期は 6 時間未満と短かったことから、反復投与による臓器・組織分布試験は実施しなかった。妊娠ラットにおいて、放射能の胎盤通過性は中等度であった。

In vitro における検討で、ヒトを含むすべての動物種における主代謝経路は、M-1 を産生する未変化体の N-グルクロン酸抱合であり、酸化的代謝の寄与はほとんどみられなかった。ヒトにおける M-1 の産生には UGT1A1 が主に寄与しており、UGT1A9 の寄与はわずかと考えられた。*In vitro* の検討で、モリデュスタットのグルクロン酸抱合は、チロシンキナーゼ阻害薬及び HIV プロテアーゼ阻害薬、加えてトラニラストによって特に強く阻害された。

In vitro における検討と矛盾なく、ラット、イヌ及びヒトの *in vivo* 試験で認められた主要な代謝経路は M-1 を産生する N-グルクロン酸抱合であった。ラットでは投与された放射能の主要な排泄経路は糞中であり、ほとんどが親化合物として回収されたことから、ラットにおける薬物動態パラメータは腸肝循環の影響を受ける可能性がある。一方で、イヌ及びヒトの主要な排泄経路はラットとは異なって尿中であることから、ヒトにおける腸肝循環の意義は低いと考え、ラットにおける腸肝循環を検討しなかった。ラットにおいて、モリデュスタット及び／又は代謝物の乳汁移行が少量認められた。

In vitro における検討で、モリデュスタットの CYP1A1 に対する強い阻害作用（IC_{50} 値は 5.0 μM）が認められた。消失における寄与が 0.45 以上の CYP1A1 基質を併用するとモリデュスタットの CYP1A1 阻害作用を介して臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性がある。一方、M-1 は CYP2D6 に対して軽度阻害作用を示したが、MSPK モデルによる AUCR 値を算出したところ、AUCR 値は 1.25 を下回った。したがって、CYP1A1 を除くと、モリデュスタット及び M-1 は CYP 及び UGT 阻害作用、CYP 誘導作用を介して、相互作用薬として臨床的に問題となる薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

モリデュスタットは BCRP の基質であった。しかしながら、ヒトにおいてモリデュスタットの吸収はほぼ完全であったことから（2.7.2.3.1.1）、消化管における BCRP による吸収の制限はほとんどないと考えられる。したがって、BCRP 阻害薬が併用された場合においても、消化管に存在する BCRP の阻害を介して、臨床的に問題となるモリデュスタットの被相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられる。モリデュスタットは P-gp の基質ではなく、M-1 は P-gp 及び BCRP の基質ではなかった。

モリデュスタットは肝の取込みトランスポーターである OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 の基質ではなかった。したがって、モリデュスタットを肝取込みトランスポーターに対する阻害薬と併用しても、臨床的に問題となるモリデュスタットの被相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられる。

M-1 の腎取込みトランスポーターである OAT3 に対する基質親和性は低かった。また、M-1 はそのほかの腎取込みトランスポーター、OAT1 及び OCT2 の基質ではなかった。臨床試験において M-1 の腎排泄に対して能動輸送の寄与は小さいことが示されたことから（2.7.2.3.1.3）、M-1 の腎排泄における腎取込み及び排泄トランスポーターの寄与及び阻害作用の臨床的意義は小さいと考えられる。

モリデュスタットは *in vitro* で BCRP に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値は 6.39μM であった。臨床薬物相互作用試験において、モリデュスタット 150mg を BCRP の典型基質薬ロスバスタチンと同時に投与したとき、ロスバスタチンの C_{max} は 30%増加、AUC は 11%増加にとどまったことから、モリデュスタットによる BCRP 阻害は *in vivo* において基質薬の全身曝露に顕著な影響を及

ぼさないことが示された（2.7.2.3.3.1.2）。また、モリデュスタットは腎取込みトランスポーターである OAT3 に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 16μM であった。この IC_{50} 値は、臨床最高用量 200mg 投与時の予測 $C_{max,u}$ に対して 0.12 と低かった。したがって、OAT3 に対するモリデュスタットの阻害作用を介して臨床的に問題となる薬物動態学的薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられる。また、モリデュスタットは P-gp、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、BSEP、OAT1、OCT2、MATE1 及び MATE2K に対しては *in vitro* で阻害作用を示さなかったことから、これらのトランスポーターに対するモリデュスタットの阻害を介して薬物相互作用を引き起こす可能性は低いと考えられる。

主代謝物 M-1 は P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OAT1、OCT2、BSEP 及び MRP2 に対する阻害作用を *in vitro* で示さなかった。一方、M-1 は OAT3 に対して阻害作用を示し、IC_{50} 値は 1579μM であった。しかしながら、日本人血液透析患者で観察された血漿中非結合型 M-1 濃度の最高値（モリデュスタットを臨床最高用量の 200mg 反復経口投与した第Ⅲ相試験にて測定）は IC_{50} 値に対して 0.022 と極めて低かった。したがって、M-1 の OAT3 阻害作用を介して臨床的に問題となる薬物動態学的薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられる。また、M-1 は MATE1 及び MATE2K に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値は 150～200μM の範囲にあると推測された。MATE1 及び MATE2K に対する IC_{50} 値として保守的な 150μM を用いると、日本人血液透析患者で観察された血漿中非結合型 M-1 濃度の最高値（モリデュスタットを臨床最高用量の 200mg 反復経口投与した第Ⅲ相試験にて測定）は IC_{50} 値に対して 0.231 であった。これは、メトホルミンの AUC を約 40%～50%増加[1,2,3]させる、MATE の典型阻害薬シメチジンの MATE2K に対する $C_{max,u}/IC_{50}$ の 1.2～2.3、MATE1 に対する 3.3～6.3[4]、並びにピリメタミンの MATE2K に対する $C_{max,u}/IC_{50}$ の 2.99、MATE1 に対する 2.27[5]よりもかなり低かった。したがって、メトホルミンのような MATE 典型基質薬に及ぼす M-1 の *in vivo* における影響は、典型阻害薬と比べてかなり小さいと推測され、M-1 の MATE に対する阻害作用により臨床的に問題となる薬物相互作用が引き起こされる可能性は低いと考えられる。

M-1 は P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、OCT1、OAT1、OCT2、BSEP 及び MRP2 に対する阻害作用を *in vitro* で示さなかった。

単回経口投与時の概略の致死量はラット及びマウス共に 2000mg/kg であり、イヌでは 50mg/kg より大きかった。

ラット及びイヌを用いた反復投与毒性試験で認められた所見は、概して遺伝子組換えヒトエリスロポエチン（rhEPO）製剤の反復投与毒性試験においても同様に観察されているものであり、主薬理作用である赤血球造血亢進による血液濃縮・多血状態の持続に関連した変化であった。持続的な多血状態・高粘度血液は循環障害及び全身諸臓器のうっ血を招き、特にラットでは心臓への負荷の増大（心室拡張、房室弁・心房の血栓症・心筋変性・線維化など）を来たし、各種臓器での血栓・腎臓の糸球体腫大、更に骨髄線維化・過骨症などの毒性所見を惹起した。投与期間の延長に伴って毒性発現用量及び無毒性量は低くなった。また、反復投与試験で観察された所見は一部の線維化や血栓を除き、休薬により回復又は軽減した。一方、臨床ではヘモグロビンを正常範囲に保つようモニターするため、多血状態が持続することはなく、ヘモグロビン及びヘマトクリット値が正常な健康動物を用いて多血状態を持続させた結果として観察された毒性所見が、直接的に臨床使用上のリスクとなるものとは考えられない。造血亢進に直接的あるいは二次的に関連しない毒性所見は認められなかった。

一連の *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験の結果、モリデュスタットに遺伝毒性リスクはないと結論された。

マウス及びラットを用いた約 2 年間の長期投与によるがん原性試験の結果、モリデュスタットにがん原性は認められなかった。

生殖発生毒性試験結果から、ラット受胎能試験では雌動物への毒性用量の投与時に着床後死亡数の減少及び生存胎児数の減少がみられたが、雄動物の受胎能に影響は認められなかった。ラット器官形成期投与試験においては、母動物の毒性用量投与時に着床後死亡の増加及び胎児体重の減少が観察された。加えて、モリデュスタットの HIF-PH 阻害作用に関連して胎児に小眼球の発生がみられた。ウサギ器官形成期投与試験では胚・胎児発生への影響は認められなかった。ラット出生前及び出生後の発育及び母体の機能に関する試験では、母動物への毒性用量投与時に着床後死亡の増加、平均生存児数の減少、胃内無乳児及び死産児の増加、出生児の低体重及び機能発達の一部遅延が観察されたが、母動物の一般状態悪化に続発した二次的な影響と考えられた。以上の試験成績から、妊娠時にモリデュスタット投与による次世代への悪影響が否定できないことから、妊婦への投与を禁忌に設定している。

モリデュスタットに光毒性は認められなかった。

以上のように、モリデュスタットの非臨床安全性プロファイルは、rhEPO 製剤投与時のものと同質であり、遺伝毒性及びがん原性リスクも認められなかったことから、長期投与の臨床使用を支持するものである。

2.4.6 参考文献一覧

1) Somogyi A et al., Br J Clin Pharmacol 1987:23:545-551 (4.3.24)
2) Wang Z et al., Pharmacogenet Genomics 2008:18:637-645 (4.3.25)
3) Kusuhara H et al., Clin Pharmacol Ther 2011:89:837-844 (4.3.26)
4) Elsby R et al., Pharmacol Res Perspect 2017:5(5):1-13 (4.3.23)
5) Kikuchi R et al., J Pharm Sci 2013:102(12):4426-4432 (4.3.27)