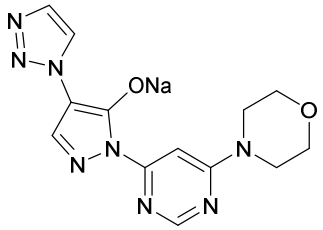
2.6.1 緒言

モリデュスタット（BAY 85-3934）は新規の低酸素誘導因子－プロリン水酸化酵素（HIF-PH）阻害薬で、HIF を安定化させ、その主要な標的遺伝子であるエリスロポエチン（EPO）を誘導し、赤血球産生を促進することによって貧血を改善する。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とナトリウム塩を用いた。非臨床試験に関する資料では、特に断らない限り、濃度及び投与量の表記はモリデュスタット（遊離塩基）として示す。

理化学的性状に関する情報、並びに申請効能・効果及び申請用法・用量を以下に記載する。

構造式	
医薬品一般的名称（JAN）	モリデュスタットナトリウム
化学名	Monosodium 1-[6-(morpholin-4-yl)pyrimidin-4-yl]-4-(1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1*H*-pyrazol-5-olate
分子式	$C_{13}H_{13}N_8NaO_2$
国際一般名（INN）	Molidustat
治験成分記号	BAY 85-3934（遊離塩基）、BAY 1053048（ナトリウム塩）
分子量	BAY 85-3934: 314.31g/mol、BAY 1053048: 336.28g/mol
鏡像異性体／立体化学	なし
申請効能・効果	腎性貧血
申請用法・用量	〈保存期慢性腎臓病患者〉 赤血球造血刺激因子製剤で未治療の場合 通常、成人にはモリデュスタットとして 25mg を開始用量とし、1 日 1 回経口投与する。以後は、患者の状態に応じて投与量を適宜増減するが、1 回 5～200mg の範囲とする。 赤血球造血刺激因子製剤から切り替える場合 通常、成人にはモリデュスタットとして 25mg 又は 50mg を開始用量とし、1 日 1 回経口投与する。以後は、患者の状態に応じて投与量を適宜増減するが、1 回 5～200mg の範囲とする。 〈血液透析患者及び腹膜透析患者〉 赤血球造血刺激因子製剤の治療歴の有無にかかわらず、通常、成人にはモリデュスタットとして 75mg を開始用量とし、1 日 1 回経口投与する。以後は、患者の状態に応じて投与量を適宜増減するが、1 回 5～200mg の範囲とする。

腎性貧血治療薬としての臨床開発及び市販承認を支持するために、広範囲にわたる非臨床試験を実施し、モリデュスタットの薬理学的プロファイル、薬物動態及び代謝プロファイル、毒性及びトキシコキネティクスプロファイルを明らかにした。実施した非臨床試験の詳細と成績を2.6.2以降の項に記載する。

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
^{3}H	Tritium labeled	^{3}H 標識
^{14}C	Carbon 14 labeled	^{14}C 標識
95%CI	95% confidence limit	95%信頼区間
ACN	acetonitrile	アセトニトリル
ADP	Adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
AAGP	Alpha 1-acid glycoprotein	α1 酸性糖タンパク
A_E	Amount excreted	排泄量
ALT	Alanine aminotransferase	アラニン アミノトランスフェラーゼ
AMP	Adenosine monophosphate	アデノシン一リン酸
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ
ATP	Adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to infinity	0 時間から無限大時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
AUC(0-24)	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to 24 hours	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
$AUC(0\text{-}t_{last})$	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to last timepoint > lower limit of quantitation	0 時点から定量可能であった最終時点までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積
$AUC(0\text{-}t_{last})_{norm}$	Area under the plasma concentration vs. time curve from zero to last timepoint > lower limit of quantitation normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した $AUC(0\text{-}t_{last})$
AUC_{norm}	AUC normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した AUC
AUCR	AUC ratio	AUC 比
AUC_u	AUC unbound	血漿中非結合型薬物濃度 - 時間曲線下面積
AZT	3'-azido-3'-deoxythymidine	3'-アジド-3'-デオキシチミジン
b.i.d./ bid	Twice daily (bis in die)	1 日 2 回
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク
BDC	Bile duct-cannulation	胆管カニューレ挿入

略語	英語名称	日本語名称
BEI	Biliary excretion index	胆汁排泄指数
BSEP	Bile salt export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
BSP	Sulfobromophthalein	スルホブロモフタレイン
C	Concentration	濃度
C(tx)	Concentration at time x	投与後 x 時間における濃度
CA	Chromosome Aberration	染色体異常
Caco-2 Cell	Human colon adenocarcinoma cells	ヒト結腸腺癌細胞
C_{Blood} / C_B / C_b	Concentration in blood	血液中濃度
CDCF	5(6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein	5(6)-カルボキシ-2',7'-ジクロロフルオレセイン
CEQ_{max} / Ceq_{max}	Maximum concentration of radioactivity	最高放射能濃度
$CEQ_{max,norm}$	CEQ_{max} normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した CEQ_{max}
CL	Total clearance	全身クリアランス
CL_h	Hepatic clearance	肝クリアランス
Cl_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
C_{max}	Maximum drug concentration in plasma	最高血漿中薬物濃度
$C_{max, norm}$	C_{max} normalized to dose and body weight	用量及び体重で正規化した C_{max}
$C_{max,u}$	Maximum unbound drug concentration in plasma	最高血漿中非結合型薬物濃度
C_{Plasma} / C_p	Concentration in plasma	血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクローム P450
CV	Coefficient of variation	変動係数
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	Dose-range finding	用量設定
EC_{50}	Half maximal effective concentration	50%有効濃度
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
Eq	Equivalents	当量
ES	Estrone-3-sulfate	エストロン-3-硫酸
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
f / F	Female	女性、雌

略語	英語名称	日本語名称
FCS	Fetal calf serum	ウシ胎児血清
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
f_u	Fraction of free (unbound) drug	非結合型分率
gMean	Geometric mean	幾何平均
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
gSD	Geometric standard deviation	幾何標準偏差
hERG	Human ether-a-go-go related gene	ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HIF	Hypoxia inducible factor	低酸素誘導因子
HIV	Human immunodeficiency virus	ヒト免疫不全ウィルス
HLM	Human liver microsomes	ヒト肝ミクロソーム
HPLC	High performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HRMS	High resolution mass spectrometry	高分解能質量分析
HSA	Human serum albumin	ヒト血清アルブミン
i.v./ iv / IV	Intravenous(ly)	静脈内
IC_{50}	Concentration required for 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
K_i	Inhibition constant	阻害定数
LC-HRMS	Liquid chromatography high resolution mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／高分解能質量分析
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem-mass spectrometry	液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析
LLOQ	Lower limit of quantitation	定量下限
LOQ	Limit of quantitation	定量限界
LSC	Liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
M	Molar	モル濃度
M	Metabolite	代謝物
m / M	Male	男性、雄
MATE1	Multidrug and toxin extrusion 1	多剤排出トランスポーター1

略語	英語名称	日本語名称
MATE2K	Multidrug and toxin extrusion 2K	多剤排出トランスポーター2K
MBq	Megabecquerel	メガベクレル
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎臓
MDR1	Multiple drug resistance 1	多剤耐性遺伝子 1
MNT	Micronucleous test	小核試験
MPP	1-Methyl-4-phenylpyridinium	1-メチル-4-フェニルピリジニウム
MRP2	Multidrug resistance-associated protein 2	多剤耐性関連タンパク 2
MRT	Mean residence time	平均滞留時間
MSPK (model)	Mechanistic static PK (model)	静的薬物速度論(モデル)
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐用量
n.a.	Not applicable	該当なし
n.c.	Not calculated	計算されていない
n.d.	Not determined	測定されていない
n.p.	Not planned	計画されていない
n.s.	No sample	試料なし
NA / N/A	Not available	該当なし
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy	核磁気共鳴分光法
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NRU	Neutral red uptake	ニュートラルレッド取り込み
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion-transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
O-DEM	p-Nitroanisole-O-Demethylase	p-ニトロアニソール-O-脱メチル化酵素
p.o./ po / PO	Per os, oral(ly)	経口
PAH	p-Aminohippuric acid	パラアミノ馬尿酸
P_{app}	Apparent permeability coefficient value	みかけの透過係数

略語	英語名称	日本語名称
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine	-
q.d. / qd	Once daily (quaque die)	1日1回
QC	Quality control	-
R	Regression	回帰
R_A	Ratio of accumulation after repeated dosing	反復投与後の蓄積比
RT	Room temparature	室温
SC	Subcutaneous(ly)	皮下投与
SD / S.D.	Standard deviation	標準偏差
SEM	Standard error of the mean	標準誤差
$t_{1/2}$	Half-life	半減期
TCA	Taurocholic acid	タウロコール酸
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{last}	Time of last concentration above LLOQ	定量下限を上回る濃度が検出された最終時点
t_{max}	Time to reach maximum drug concentration in plasma	最高血漿中薬物濃度到達時間
TTC	Threshold of Toxicological Concern	毒性学的懸念の閾値
UDS	Unscheduled DNA Synthesis	不定期DNA合成
UDPGA	Uridine diphosphoglucuronic acid	ウリジン二リン酸グルクロン酸
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyltransferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態の分布容積
WBA	Whole body autoradiography	全身オートラジオグラフィ

2.6.2 薬理試験の概要文の目次

2.6.2.1 まとめ ... 3
2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験 ... 3
2.6.2.1.2 副次的薬理試験 ... 5
2.6.2.1.3 安全性薬理試験 ... 5
2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用 ... 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ... 6
2.6.2.2.1 *In vitro* 試験 ... 6
2.6.2.2.1.1 HIF-PH 阻害作用 ... 6
2.6.2.2.1.2 HIF 安定化作用 ... 8
2.6.2.2.1.2.1 HIF レポーター遺伝子発現 A549 細胞 ... 8
2.6.2.2.1.2.2 A549 及び HeLa 細胞 ... 8
2.6.2.2.2 *In vivo* 試験 ... 9
2.6.2.2.2.1 げっ歯類における単回投与試験 ... 10
2.6.2.2.2.1.1 EPO 誘導 ... 10
2.6.2.2.2.1.2 赤血球産生 ... 12
2.6.2.2.2.2 ラットにおける反復投与試験 ... 13
2.6.2.2.2.3 イヌにおける EPO 誘導及び赤血球産生 ... 15
2.6.2.2.2.4 サルにおける EPO 誘導 ... 16
2.6.2.2.2.5 遺伝子組換えヒトエリスロポエチンとの比較 ... 17
2.6.2.2.2.5.1 ラット ... 17
2.6.2.2.2.5.2 サル ... 18
2.6.2.2.2.6 ゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデル ... 20
2.6.2.2.2.6.1 EPO 誘導 ... 20
2.6.2.2.2.6.2 予防及び改善効果 ... 22
2.6.2.2.2.7 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 ... 23
2.6.2.2.2.8 HIF 標的遺伝子に対する影響 ... 25
2.6.2.2.3 モリデュスタットナトリウムの効力薬理作用 ... 28
2.6.2.2.4 代謝物 M-1 の薬理活性 ... 28
2.6.2.3 副次的薬理試験 ... 29
2.6.2.3.1 特異性 ... 29
2.6.2.3.2 心血管系に対する作用 ... 29
2.6.2.3.2.1 血圧及び心拍数に対する作用 ... 29
2.6.2.3.2.2 圧受容器反射の感受性及び振幅に及ぼす影響 ... 30

2.6.2.4　安全性薬理試験 31
2.6.2.4.1　心血管系 31
2.6.2.4.1.1　*In vitro* 試験 31
2.6.2.4.1.2　イヌ 31
2.6.2.4.2　呼吸器系 31
2.6.2.4.3　中枢神経系 32
2.6.2.4.4　腎機能、血液学的パラメータ及び脂質代謝 32
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用 34
2.6.2.5.1　血圧低下作用を有する薬剤との併用 34
2.6.2.6　考察及び結論 35
2.6.2.7　図表 38
引用文献一覧 39

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

エリスロポエチン（EPO）は骨髄において赤血球の産生や成熟を促進する造血因子であり、その多くは腎臓で産生されていることから、慢性腎臓病患者などで腎機能低下をきたすと、EPO の産生不足により貧血がみられるようになる。現在、赤血球造血刺激因子製剤（ESA）として知られる、遺伝子組換えヒト EPO（rhEPO）が貧血治療のため臨床使用され、有効性と安全性が示されている。しかし、rhEPO 治療では心血管系事象の発現が増加する可能性が報告[1)] されている。また、rhEPO の長期かつ間欠投与により、内因性 EPO の生理学的濃度範囲をはるかに超える EPO 濃度上昇をもたらし得る。近年、より生理学的な EPO 濃度で腎性貧血を改善する可能性がある、低酸素誘導因子－プロリン水酸化酵素（HIF-PH）の阻害による内因性 EPO の誘導が代替アプローチとして考えられている。

HIF は EPO 遺伝子の発現を活性化させる重要な転写因子である。通常の酸素濃度では、酸素を直接的に利用して水酸化反応を触媒する HIF-PH によって HIF の分解が誘導される。一方、低酸素状態では HIF-PH は不活性化し HIF の分解は起こらず、その結果、EPO 遺伝子の転写のスイッチが入り、赤血球産生を増加させることによって低酸素状態に対する代償反応が起こる[2, 3)]。したがって、酸素を検知して HIF の分解を誘導する HIF-PH を阻害することによって、通常酸素濃度下で HIF を安定化し、低酸素状態で生じる生理学的作用と同様に、内因性 EPO を誘導して赤血球産生を促進させることが可能と考えられる。モリデュスタット（BAY 85-3934）は新規の HIF-PH 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 EPO 反応性貧血に対し有望な治療薬となることが期待される。

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。モリデュスタットの効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験では遊離塩基及びナトリウム塩の両方を、安全性薬理試験では遊離塩基を、薬力学的薬物相互作用ではナトリウム塩を用いた。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。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

モリデュスタットの有効性及び特異性を検討するため、*in vitro* 及び *in vivo* において、一連の効力を裏付ける試験を実施した（試験一覧は 2.6.3 を参照のこと）。代表的なモリデュスタットの *in vitro* 及び *in vivo* における試験成績を、表 2.6.2.1- 1 及び表 2.6.2.1- 2 にまとめた。

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 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た結果、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、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 発現量の増加がみられた。血漿中 EPO 濃度の上昇は腎臓及び肝臓の EPO mRNA 発現量と相関した。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回復作用がみられ、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。

表 2.6.2.1- 1 *In vitro* における試験成績のまとめ

Assay	Characteristic value
Inhibition of HIF-PH isoform 1	IC_{50} = 482 nM
Inhibition of HIF-PH isoform 2	IC_{50} = 276 nM
Inhibition of HIF-PH isoform 3	IC_{50} = 450 nM
Induction of luciferase reporter gene under control of a hypoxia responsive element promoter in A549-cells	EC_{50} = 8.4 µM
Induction of HIF-1α in cell culture cells	Effective dose > 0.1 µM

Source: 4.2.1.1.1 PH-36105 and 4.2.1.1.2 PH-39186

表 2.6.2.1- 2 *In vivo* における試験成績のまとめ

Model	Effective dose
Induction of erythropoietin and erythropoiesis in normal Wistar rats after oral administration	≥ 1.25 mg/kg
Induction of erythropoietin and erythropoiesis in normal beagle dogs after oral administration	≥ 0.6 mg/kg
Induction of erythropoietin and erythropoiesis in normal cynomolgus monkeys after oral administration	≥ 0.5 mg/kg
Restoration of erythropoiesis in anemic Wistar rats with gentamycin-induced renal failure	≥ 2.5mg/kg

Source: 4.2.1.1.3 PH-36103 and 4.2.1.1.5 PH-36106

2.6.2.1.2 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、心拍数及び血圧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 では血圧に影響はみられなかった。

2.6.2.1.3 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。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、生理学的に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。

2.6.2.1.4 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。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　*In vitro* 試験

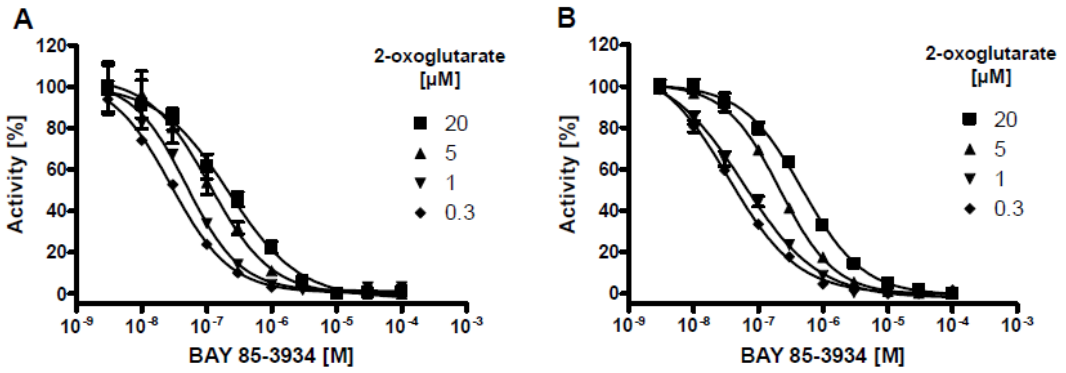
一連の *in vitro* 試験において、モリデュスタットの薬理学的特性を明らかにした。

2.6.2.2.1.1　HIF-PH 阻害作用

参照項目：4.2.1.1.1 PH-36105
4.2.1.1.2 PH-39186

HIF-PH の 3 つのアイソフォーム（HIF-PH1、HIF-PH2 及び HIF-PH3）に対するモリデュスタットの阻害作用について検討した。ビオチン化 HIF-1α部分ペプチドを固定化したアビジンコーティングプレートに、2-オキソグルタル酸（0.3～20μM）／硫酸化鉄（Fe^{2+}：1～30μM）／アスコルビン酸（0.01～2mM）存在下で、HIF-PH1、HIF-PH2 又は HIF-PH3 及び種々の濃度のモリデュスタットを添加し、60 分間インキュベーションした（各濃度につき 3 回測定）。各 HIF-PH の酵素活性は、HIF-1α ペプチドの水酸化を指標として、ユーロピウム標識 VBC タンパク質複合体〔pVHL（フォンヒッペル・リンダウ遺伝子産物）を含むユビキチンリガーゼ複合体〕を用いた時間分解蛍光測定法により測定した。この測定では水酸化反応の阻害は蛍光活性の低下として検出される。

2-オキソグルタル酸（20μM）、Fe^{2+}（10μM）及びアスコルビン酸（2mM）を含有する標準アッセイ条件下において、モリデュスタットは HIF-PH1 及び HIF-PH2 の酵素活性を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 482nM（表 2.6.2.2- 1）及び 276±90nM〔3 試験（216nM、380nM 及び 233nM）の平均値±標準偏差、表 2.6.2.2- 1 及び表 2.6.2.2- 2〕であった（PH-36105）。HIF-PH3 に対する IC_{50} 値は 450nM であった（PH-39186）。また、HIF-PH1 及び HIF-PH2 に対する IC_{50} 値は反応緩衝液中の基質 2-オキソグルタル酸の濃度に依存し、基質濃度を 20μM から 0.3μM に減少させると、約 10 倍又はそれ以上の低下がみられたことから、モリデュスタットは 2-オキソグルタル酸と競合的に阻害することが確認された（図 2.6.2.2- 1）。なお、反応緩衝液中の Fe^{2+}又はアスコルビン酸の濃度がそれぞれ 30 倍及び 200 倍変動しても、モリデュスタットの効力（HIF-PH2 に対する IC_{50} 値）は 2 倍を超えて変化することはなかった（図 2.6.2.2- 2、表 2.6.2.2- 2）。



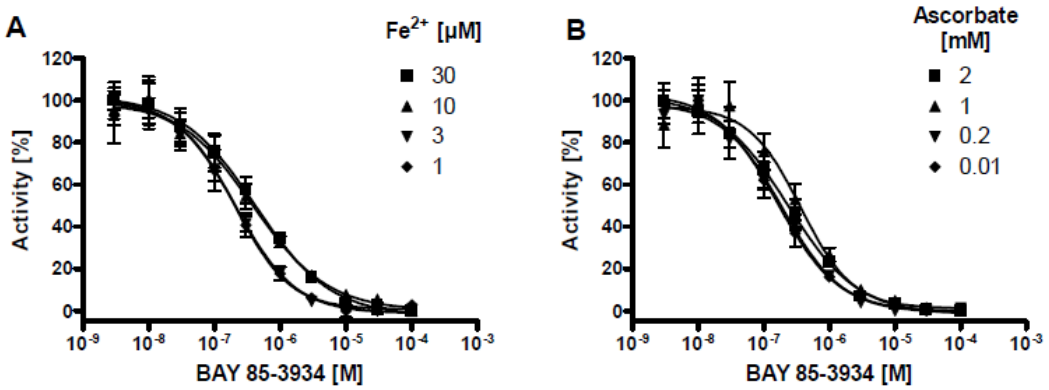
A: HIF-PH2, B: HIF-PH1, BAY 85-3934: molidustat
Data were normalized to basal activity w/o inhibitor = 100%; residual activity = 0%; mean ± SEM

図 2.6.2.2- 1　種々の濃度の 2-オキソグルタル酸添加後の HIF-PH2 及び HIF-PH1 活性に対するモリデュスタットの濃度－反応曲線

表 2.6.2.2- 1　種々の濃度の 2-オキソグルタル酸添加後の HIF-PH2 及び HIF-PH1 活性に対するモリデュスタットの IC_{50} 値（nM）

2-oxoglutarate (μM)	HIF-PH2	HIF-PH1
0.3	28	35
1.0	49	59
5.0	114	214
20	216	482

Fe^{2+}=10μM, ascorbate=2mM



BAY 85-3934: molidustat, A: Fe^{2+} (ascorbate=2mM), B: ascorbate (Fe^{2+}=10μM), 2-oxoglutarate=20μM
Data were normalized to basal activity w/o inhibitor = 100%; residual activity = 0%; mean ± SEM

図 2.6.2.2- 2　種々の濃度の Fe^{2+} 又はアスコルビン酸添加後の HIF-PH2 活性に対するモリデュスタットの濃度－反応曲線

表 2.6.2.2- 2　種々の濃度の Fe^{2+} 又はアスコルビン酸添加後の HIF-PH2 活性に対するモリデュスタットの IC_{50} 値（nM）

Fe^{2+} (μM)	IC_{50}	Ascorbate (mM)	IC_{50}
1	212	0.01	160
3	210	0.2	190
10	380	1	364
30	424	2	233

2-oxoglutarate=20μM

2.6.2.2.1.2 HIF 安定化作用

2.6.2.2.1.2.1 HIF レポーター遺伝子発現 A549 細胞

参照項目： 4.2.1.1.1 PH-36105

モリデュスタットの HIF 安定化作用について、HIF 標的レポーター遺伝子アッセイにより検討した。ホタルルシフェラーゼ遺伝子に低酸素応答性領域（HRE：hypoxia responsive element）を含むプロモーターを連結したレポーター遺伝子を安定導入した A549 細胞株（ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞）に、各種濃度のモリデュスタットを添加し、Fe^{2+}（50μM）の存在下又は非存在下で 6 時間インキュベーションした後、ルシフェラーゼ活性を測定した（4 回測定）。

HIF レポーターアッセイにおいて、モリデュスタットは HRE プロモーターの制御下にあるホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現を誘導したことから、モリデュスタットは HIF-PH を阻害することにより、HIF を安定化することが示唆された。50%有効濃度（EC_{50} 値）は 8.4±0.7 μM（平均値±標準偏差）であった。培養液中の過剰 Fe^{2+}は当該活性に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2.1.2.2 A549 及び HeLa 細胞

参照項目： 4.2.1.1.1 PH-36105

モリデュスタットが HIF-1α を安定化させ細胞内濃度を上昇させる HIF-1α 誘導能について、A549 又は HeLa 細胞株を用いて検討した。各種濃度（0.1～20μM）のモリデュスタットを当該細胞株に添加しインキュベーションした後、細胞を可溶化し SDS ゲル電気泳動を行った。電気泳動後、抗 HIF-1α マウスモノクローナル抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを実施した（ローディングコントロールとして抗 β-アクチンマウスモノクローナル抗体を用いて β アクチンを検出した）。HIF-PH 阻害とそれに続く HIF-1α 安定化作用の可逆性を検討するため、培養液中のモリデュスタットを除去後、タンパク質合成阻害剤としてシクロヘキシミド（100μM）を添加した。

HeLa 細胞株において、モリデュスタットは 120 分間のインキュベーションにより、濃度依存的に HIF-1α を安定化し、0.1～0.25μM の間で HIF-1α は検出閾値を超えて顕著に増加し、5μM 以上で飽和に達した（図 2.6.2.2- 3、A）。モリデュスタット 5μM を用いた検討において、HIF-1α の検出には 20 分間のインキュベーションで十分であった（図 2.6.2.2- 3、B）。また、A549 及び HeLa 細胞株にモリデュスタット 5μM を添加し 120 分間インキュベーションした後、モリデュスタットを培養液から除き、シクロヘキシミドを培養液に添加後 40 分において、細胞溶解液中に HIF-1α は検出されなかった（図 2.6.2.2- 4）。更に、A549 細胞にモリデュスタット 20μM を添加し、シクロヘキシミドで置換後、5 分ごとに HIF-1α を確認した結果、30 分までしか検出されず、その後消失した（図 2.6.2.2- 5）。

結論として、モリデュスタットは培養細胞において 20 分以内に HIF-1α を迅速に安定化することが示された。モリデュスタットは細胞膜を透過後、直接 HIF-PH に作用し効果を発揮するものと考えられる。培養液からモリデュスタットを除去後、シクロヘキシミド存在下で 40 分以内に HIF-1α 安定化作用は消失したことから、HIF-PH 阻害作用は可逆的であると考えられた。これは新規に合成された HIF-PH により HIF-1α が分解／消失した可能性を除外できることに基づく。なお、HIF-1α の安定化による濃度上昇及び消失の速度は、それぞれ脱酸素及び再酸素負荷後の HIF-1α の反応速度と類似していることが報告[4] されている。

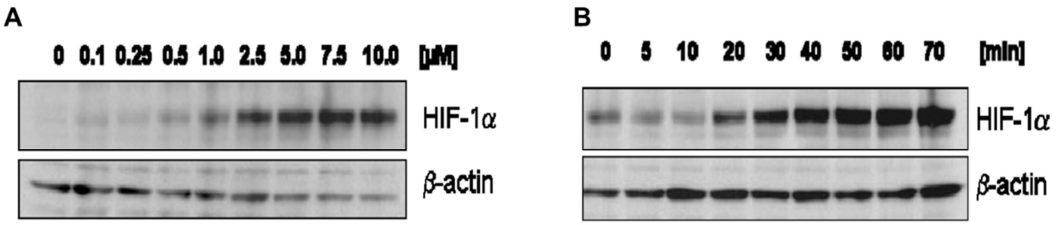


図 2.6.2.2- 3　ウェスタンブロット解析：HeLa 細胞株におけるモリデュスタットの HIF-1α安定化（濃度反応性）（A）及びモリデュスタット（5μM）の HIF-1α安定化の経時変化（B）

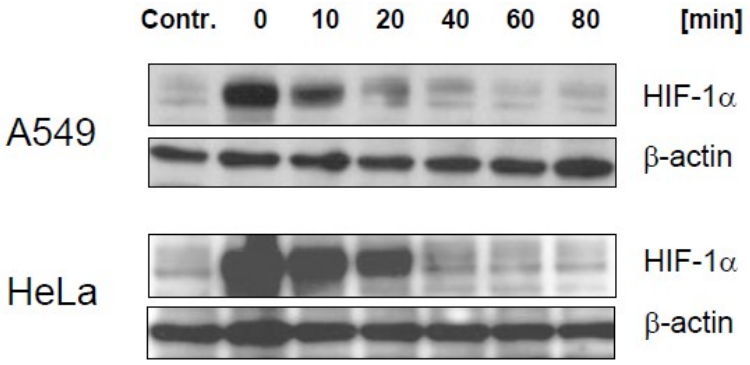


図 2.6.2.2- 4　ウェスタンブロット解析：A549 及び HeLa 細胞株におけるモリデュスタット（5μM）除去及びシクロヘキシミド置換後の HIF-1α安定化の経時変化

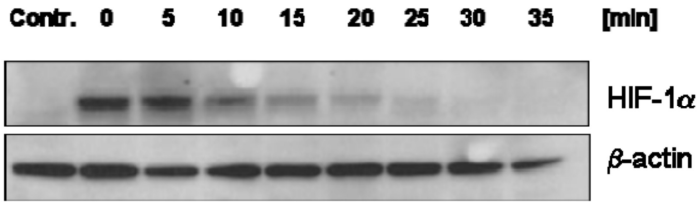


図 2.6.2.2- 5　ウェスタンブロット解析：A549 細胞株におけるモリデュスタット（20μM）除去及びシクロヘキシミド置換後の HIF-1α安定化の経時変化（5 分間隔）

2.6.2.2.2　*In vivo* 試験

種々の正常動物（マウス、ラット、イヌ及びサル）及び腎機能障害ラットモデルを用いて、モリデュスタットの EPO 誘導及び赤血球産生に対する作用を検討した。なお、モリデュスタット及びモリデュスタットナトリウムの媒体には、特に記載のない限り、エタノール／ソルトール／水（10/20/70、v/v/v）混液を用いた。

2.6.2.2.2.1 げっ歯類における単回投与試験

2.6.2.2.2.1.1 EPO 誘導

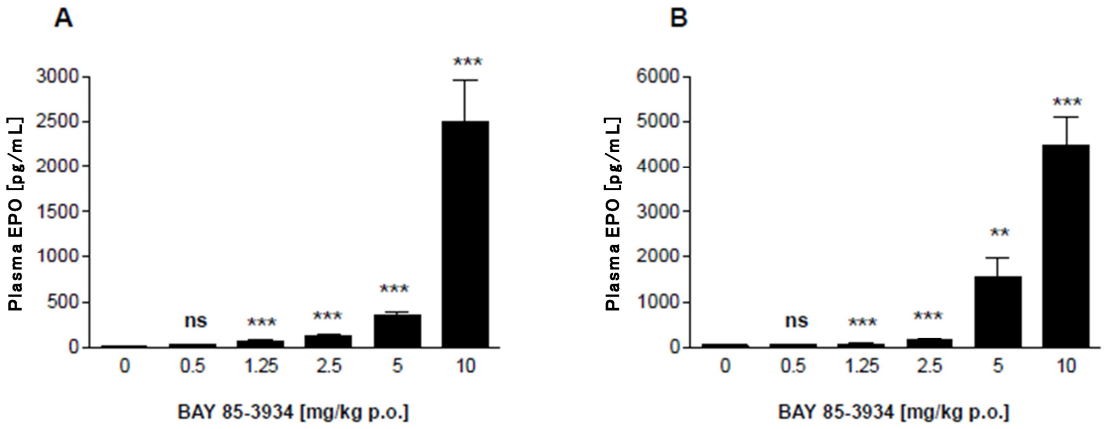
参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

雄性マウス（CD-1 系）を用いて、モリデュスタットの EPO 誘導能を予備的に検討した。モリデュスタットを 50mg/kg 又は 100mg/kg の用量で、マウスにそれぞれ単回腹腔内又は経口投与後 4 時間において採血し、血漿中 EPO 濃度を ELISA 法により測定した結果、媒体投与群に比しそれぞれ約 160 倍又は約 220 倍高かった（n＝3）。

更に、雄性ラット（Wistar、体重 240～340g）を用いて、モリデュスタットの EPO 誘導に対する作用を検討した。モリデュスタットを 0（媒体）、0.5、1.25、2.5、5 及び 10mg/kg の用量でラットに単回経口投与後 4 時間において採血し、血漿中 EPO 濃度を ELISA 法により測定した（n＝5、独立した 2 試験を実施）。その結果、モリデュスタット 1.25mg/kg 以上の用量で、媒体投与群に比し血漿中 EPO 濃度の上昇が認められ、モリデュスタットによる EPO 誘導が確認された（図 2.6.2.2- 6）。モリデュスタットの EPO 誘導作用が飽和に達する用量を確認するため、モリデュスタットを 0（媒体）、5、15、50、150、500 及び 1500mg/kg の用量でラットに単回経口投与後 5、24 及び 48 時間において採血し、血漿中 EPO 濃度を測定した（n＝3）。その結果、モリデュスタット 500mg/kg 以上の用量で血漿中 EPO 濃度が最大に達し、EPO 濃度の上昇は 48 時間以上持続することが確認された（図 2.6.2.2- 7）。

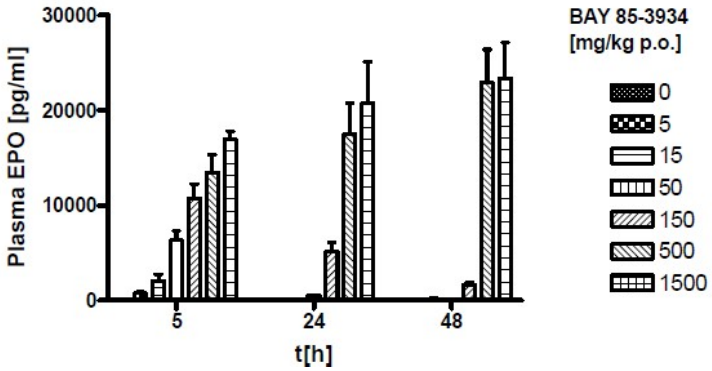
また、モリデュスタットを 0（媒体）、1、2.5、5 及び 10mg/kg の用量でラットに単回経口投与後 4 時間において、腎臓を摘出し定量的リアルタイム PCR 法（TaqMan™解析）により EPO mRNA 発現量を測定した（n＝5）。その結果、1mg/kg 以上の用量において、EPO mRNA 発現量は有意に増加した（図 2.6.2.2- 8）。

更に、血漿中 EPO 誘導及び腎組織中 EPO mRNA 誘導の時間推移を検討するため、モリデュスタットを 5mg/kg の用量でラットに単回経口投与し、被験薬投与前（ベースライン）、投与後 0.5、1、2、4、6 及び 8 時間において、血漿中 EPO 濃度及び腎組織中 EPO mRNA 発現量を測定した（n＝5）。また血漿中モリデュスタット濃度についても測定した。モリデュスタットの血漿中濃度は投与後 30 分で、EPO mRNA 発現量は投与後 2 時間でそれぞれ最大に達した（図 2.6.2.2- 9）。血漿中 EPO 濃度は投与後 6 時間で最大に達し、その時点で血漿中モリデュスタット濃度は 90%を超えて低下し、かつ EPO mRNA 発現量もベースライン付近まで低下した（図 2.6.2.2- 9）。



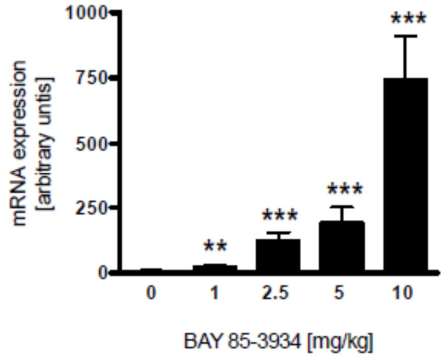
BAY 85-3934: molidustat, ns: non-significant, ** p<0.01, *** p<0.001 (unpaired t-test, vs. vehicle group), data from two independent experiments A and B, mean ± SEM

図 2.6.2.2- 6　ラットにおけるモリデュスタット単回投与後 4 時間の血漿中 EPO 濃度



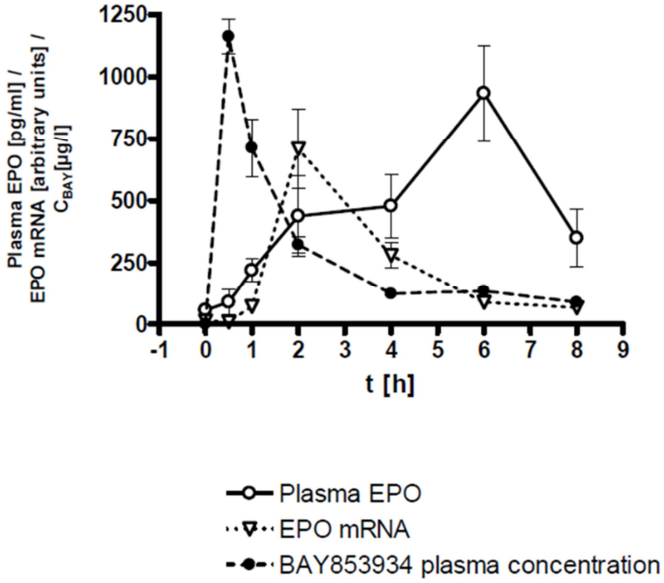
BAY 85-3934: molidustat, t: time, h: hour, mean ± SEM

図 2.6.2.2- 7　ラットにおけるモリデュスタット単回投与後の血漿中 EPO 濃度の経時変化



BAY 85-3934: molidustat, ** p<0.01, *** p<0.001 (unpaired t-test, vs vehicle group), mean ± SEM

図 2.6.2.2- 8　ラットにおけるモリデュスタット単回投与後 4 時間の腎臓 EPO mRNA 発現量



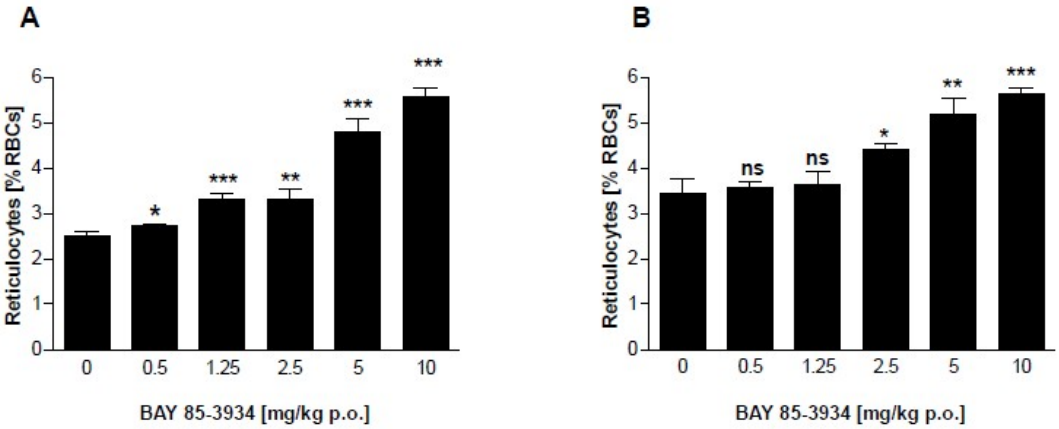
BAY853934: molidustat, t: time, h: hour, data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 9　ラットにおけるモリデュスタット単回投与後の血漿中モリデュスタット濃度、血漿中 EPO 濃度及び腎臓 EPO mRNA 発現量の経時変化

2.6.2.2.2.1.2　　赤血球産生

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

雄性ラット（Wistar、体重 240～340g）を用いて、モリデュスタット投与後の骨髄からの網状赤血球産生作用を検討した。モリデュスタットを 0（媒体）、0.5、1.25、2.5、5 及び 10mg/kg の用量で、ラットに単回経口投与後 72 時間において採血し、チアゾールオレンジ染色を用いたフローサイトメリーにより網状赤血球数を測定し、全赤血球数に対する網状赤血球の比率を算出した（n＝5、独立した 2 試験を実施）。その結果、赤血球産生応答の指標として、モリデュスタットは用量依存的に網状赤血球産生を誘導することが確認された（図 2.6.2.2- 10）。



BAY 85-3934: molidustat, ns: non-significant, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (unpaired t-test, vs. vehicle group), data from two independent experiments A and B, mean ± SEM

図 2.6.2.2- 10　ラットにおけるモリデュスタット単回投与後 72 時間の網状赤血球比率

2.6.2.2.2.2　ラットにおける反復投与試験

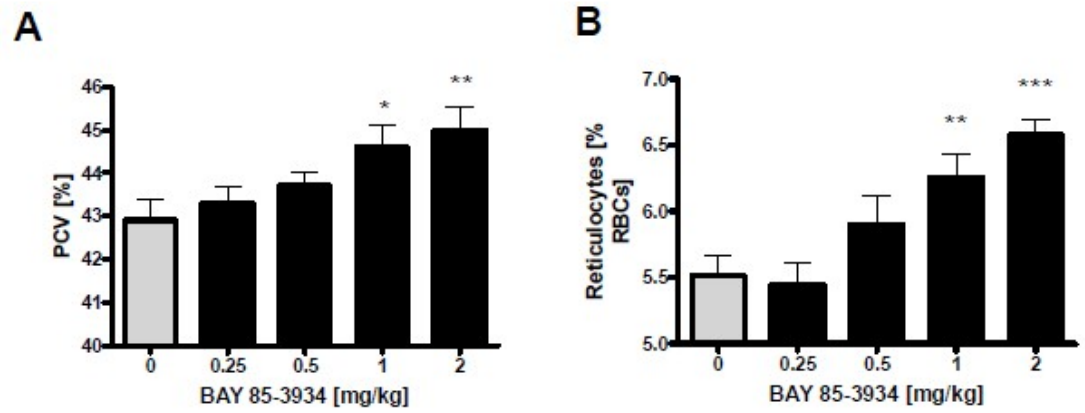
参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

雄性ラット（Wistar、体重 240～340g）において、ヘマトクリット値の上昇及び網状赤血球産生に対するモリデュスタット反復投与時の最小有効用量を確認するため、モリデュスタットを 0（媒体）、0.25、0.5、1 及び 2mg/kg の用量で、ラットに 1 日 1 回 3 日間反復経口投与した（n＝10）。最終投与後 48 時間において採血し、ヘマトクリット値及び網状赤血球比率をそれぞれ測定した。その結果、1mg/kg 以上の用量において、媒体投与群に比しヘマトクリット値の上昇及び網状赤血球比率の増加がみられた（図 2.6.2.2- 11）。

更に、モリデュスタットを 0（媒体）、0.5、1.25、2.5 及び 5mg/kg の用量で、ラットに 1 日 1 回 26 日間反復経口投与し、初回投与前及び投与後の週 1 回、ヘマトクリット値を測定した（n＝12）。その結果、1.25mg/kg 以上の用量でヘマトクリット値は上昇し、1.25mg/kg 群では媒体投与群に対し最終的に約 3%高かった（図 2.6.2.2- 12）。用量反応関係は緩やかで、最高用量では投与前に対しヘマトクリット値は約 17%高かった（図 2.6.2.2- 12）。なお、モリデュスタットの忍容性は良好であり、体重は全用量群で正常に増加した。

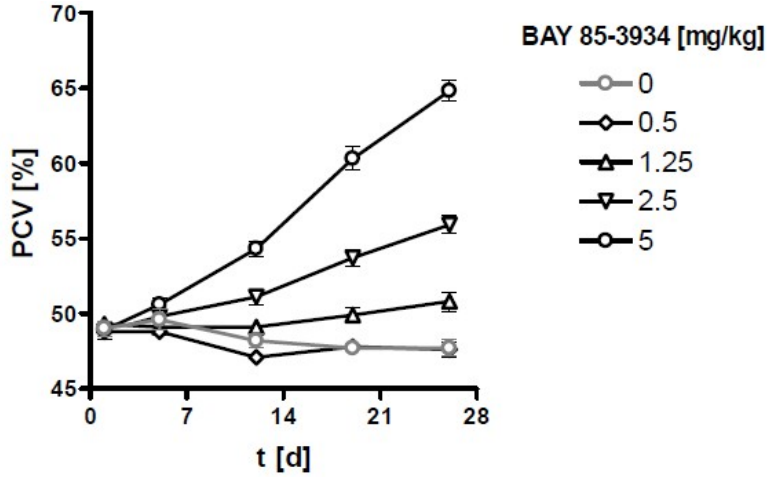
また、モリデュスタットを 0（媒体）、2.5、5 及び 10mg/kg の用量で、ラットに週 1 回又は 2 回 6 週間間欠経口投与し、経時的にヘマトクリット値を測定した（n＝10）。週 1 回又は 2 回投与後 6 週間において、2.5mg/kg 以上の用量で媒体投与群に比しヘマトクリット値は高値を示した（図 2.6.2.2- 13）。

以上、ラットにおけるモリデュスタット 1 日 1 回反復投与の赤血球産生応答に対する用量反応関係は緩やかであり、最小有効用量は 1.25mg/kg であった。また、週 1 回又は 2 回の 6 週間長期間欠投与では 2.5mg/kg 以上の用量で有効であった。



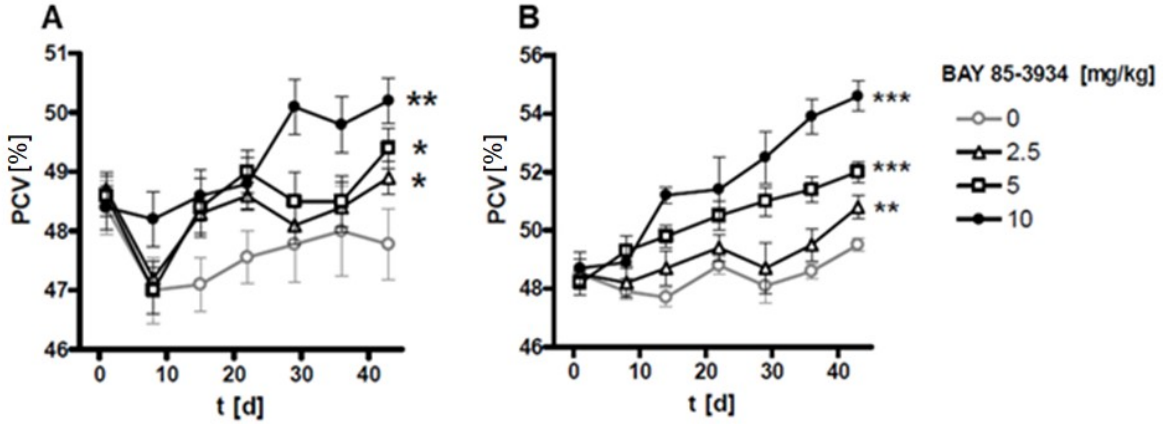
A: PCV (packed cell volume, hematocrit), B: Reticulocytes, BAY 85-3934: molidustat, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (unpaired t-test, vs. vehicle group), mean ± SEM

図 2.6.2.2- 11　ラットにおけるモリデュスタット 3 日間反復投与後 48 時間のヘマトクリット値及び網状赤血球比率



BAY 85-3934: molidustat, PCV: packed cell volume (hematocrit), t: time, d: day, data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 12　ラットにおけるモリデュスタット投与後のヘマトクリット値の経時変化（26 日間反復投与試験）



BAY 85-3934: molidustat, once (A) and twice (B) weekly administration of molidustat,
PCV: packed cell volume (hematocrit), t: time, d: day, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 (unpaired t-test, vs. vehicle group at day 43), data points are plotted as means ± SEM

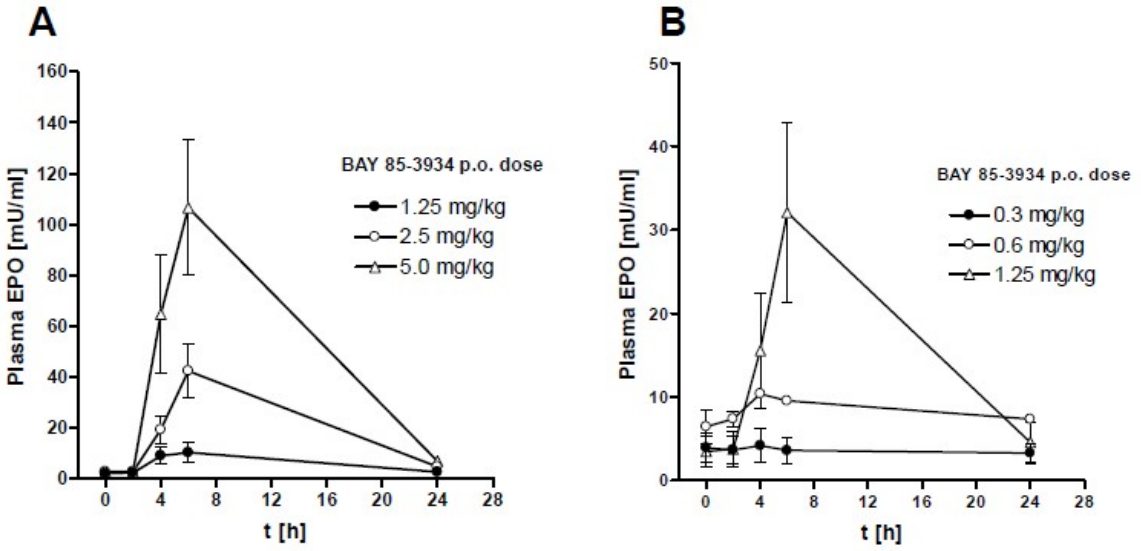
図 2.6.2.2- 13　ラットにおけるモリデュスタット投与後のヘマトクリット値の経時変化（週 1 回又は 2 回 6 週間間欠投与試験）

2.6.2.2.2.3　イヌにおける EPO 誘導及び赤血球産生

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

モリデュスタットを 1.25、2.5 及び 5mg/kg の用量でビーグル犬（体重 8.7～18.4kg）に単回経口投与した（n＝3、experiment 1）。投与前（ベースライン）、投与後 2、4、6 及び 24 時間において採血後、血漿中 EPO 濃度を測定し、更に、投与後 72 時間において網状赤血球比率を測定した。5mg/kg 投与後 4～6 時間において、血漿中 EPO 濃度は最大に達し、ベースラインに対し約 40 倍上昇した（図 2.6.2.2- 14、A）。投与後 24 時間で血漿中 EPO 濃度はベースラインにまで回復した。1.25mg/kg においても、血漿中 EPO 濃度はベースラインに対し約 5 倍の上昇がみられたことから、無作用量は更に低用量と考えられた。赤血球産生応答に対する用量反応関係は、ラットと同様に緩やかであった（表 2.6.2.2- 3）。

更に、低用量（0.3、0.6 及び 1.25mg/kg）を用いて、同様な検討を行った結果（n＝2 又は 3、experiment 2）、0.6mg/kg において血漿中 EPO 濃度はベースラインに対し 2 倍未満の上昇がみられたが、0.3mg/kg では血漿中 EPO 濃度の上昇はみられなかった（図 2.6.2.2- 14、B）。また、0.6mg/kg 以上を投与した群において、用量依存的な網状赤血球比率の増加がみられたのに対し、0.3mg/kg ではベースラインと同程度であった（表 2.6.2.2- 3）。



BAY 85-3934: molidustat, 1.25 - 2.5 - 5 mg/kg (A: experiment 1),
0.3 - 0.6 - 1.25 mg/kg (B: experiment 2), t: time, h: hour, data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 14　イヌにおけるモリデュスタット単回投与後の血漿中 EPO 濃度の経時変化

表 2.6.2.2- 3　イヌにおけるモリデュスタット単回投与後 72 時間の網状赤血球比率（%）

Dose (mg/kg)	Mean ± SD (baseline)	Mean ± SD (72 hour)	% change
0.3	0.71 ± 0.06	0.72 ± 0.06	+ 1.4
0.6	1.05 ± 0.07	1.33 ± 0.13	+ 27
1.25	0.60 ± 0.27	0.85 ± 0.37	+ 42
2.5	1.12 ± 0.22	1.65 ± 0.40	+ 47
5	0.61 ± 0.14	1.30 ± 0.39	+ 114

0.3 - 1.25 mg/kg (from experiment 2), 2.5 - 5 mg/kg (from experiment 1)

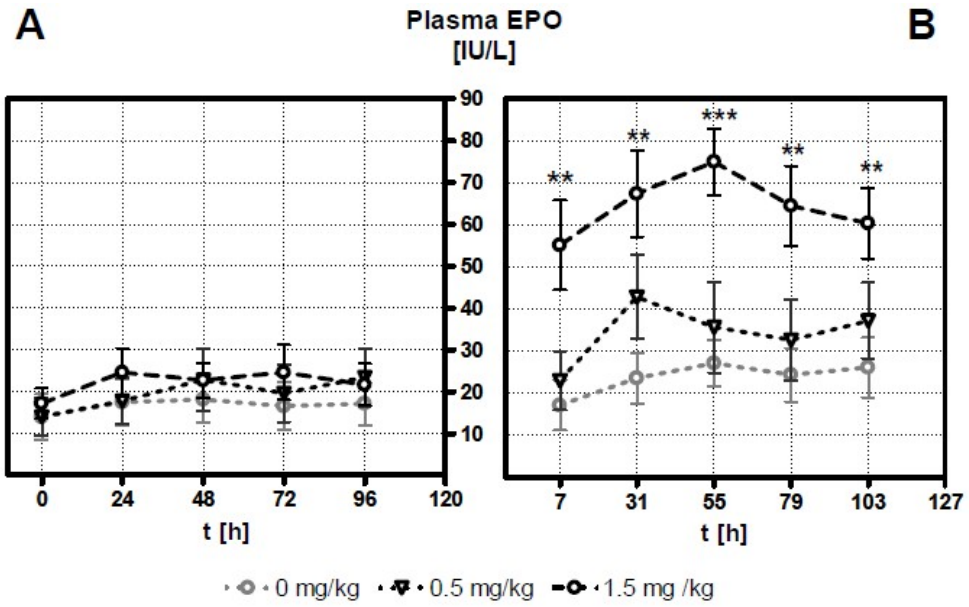
2.6.2.2.2.4　サルにおける EPO 誘導

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

サルを用いて、有効用量のモリデュスタットを反復投与後、EPO 誘導に対する順応及び EPO の蓄積について検討した。モリデュスタットを 0（媒体：0.5%タイロース溶液）、0.5 及び 1.5mg/kg の用量で、カニクイザル（雌雄各 3 例、体重 2.8～5.6kg）に 1 日 1 回 5 日間反復経口投与し、血漿中 EPO 濃度〔各投与前（ベースライン）及び投与後 7 時間〕並びに血液学的パラメータ〔初回投与前（ベースライン）及び 8 日目〕を測定した（n＝6）。

1.5mg/kg 投与後、各 7 時間において、EPO 濃度は各ベースライン値（17.2～24.6IU/mL）に比し顕著に上昇した（55.2～75.0IU/mL）（図 2.6.2.2- 15、A 及び B)。雌では 0.5mg/kg 投与にお

いても、EPO 濃度の明らかな上昇がみられた〔38.1～61.6IU/mL vs 23.2～37.6IU/mL（ベースライン値）〕。雌における EPO 濃度のベースライン値は雄に比べ高く、EPO 誘導に対する反応性が高い傾向にあった。いずれの投与群においても、各投与後 24 時間には初回投与前の EPO 濃度レベルに回復した（図 2.6.2.2- 15、A）。試験に用いた全 6 例のサルにおいて、モリデュスタット反復投与による EPO 誘導に対する反応の順応、血漿中での EPO の蓄積はみられなかった。少数例かつバラツキがみられたが、サルにおける最小有効用量は 0.5mg/kg と判断した（図 2.6.2.2- 15、B）。なお、白血球数及び血小板数に影響はみられなかった。



A: EPO values at baseline, B: EPO values 7 hours after administration, t: time, h: hour, ** p<0.01, *** p<0.001 (unpaired t-test, vs vehicle group), data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 15　サルにおけるモリデュスタット投与後の血漿中 EPO 濃度の経時変化（5 日間反復投与試験）

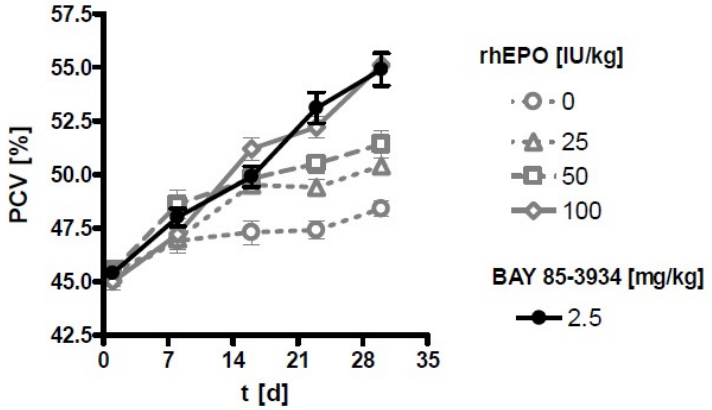
2.6.2.2.2.5　遺伝子組換えヒトエリスロポエチンとの比較

2.6.2.2.2.5.1　　ラット

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

モリデュスタットの効果を標準治療である遺伝子組換えヒトエリスロポエチン（rhEPO）と比較検討するため、rhEPO を 0（生理食塩液）、25、50 及び 100IU/kg の用量で雄性ラット（Wistar、体重 240～340g）に週 2 回（月曜日及び木曜日）4 週間反復皮下投与、又はモリデュスタットを 2.5mg/kg の用量で 1 日 1 回 4 週間反復経口投与した（n＝10）。被験薬投与後、経時的にヘマトクリット値を測定し、また 30 日目にはヘモグロビン濃度も測定した。いずれの投与群においても、被験薬投与後 30 日のヘマトクリット値（図 2.6.2.2- 16）及びヘモグロビン濃度（表 2.6.2.2- 4）は生理食塩液投与群に比し高値を示した。ヘマトクリット値の上昇の程度は、全期間を通して rhEPO 100IU/kg 投与群とモリデュスタット投与群で類似していた（図 2.6.2.2- 16）。ヘモグロビン濃度の上昇率も rhEPO 100IU/kg 投与群とモリデュスタット投与群

で類似していた（表 2.6.2.2- 4）。したがって、ラットにおいて、モリデュスタット 2.5mg/kg の 1 日 1 回投与の効果は rhEPO 100IU/kg の週 2 回投与の効果とほぼ同等であることが確認された。



BAY 85-3934: molidustat, PCV: packed cell volume (hematocrit), t: time, d: day,
data points are plotted as means ± SEM, t-test vs. 0 IU/kg at day 30, p<0.001 for all comparisons

図 2.6.2.2- 16 ラットにおける rhEPO 又はモリデュスタット投与後のヘマトクリット値の経時変化（rhEPO 週 2 回又はモリデュスタット 1 日 1 回 4 週間反復投与試験）

表 2.6.2.2- 4 ラットにおける rhEPO 週 2 回又はモリデュスタット 1 日 1 回 4 週間反復投与後 30 日のヘモグロビン濃度（g/L）

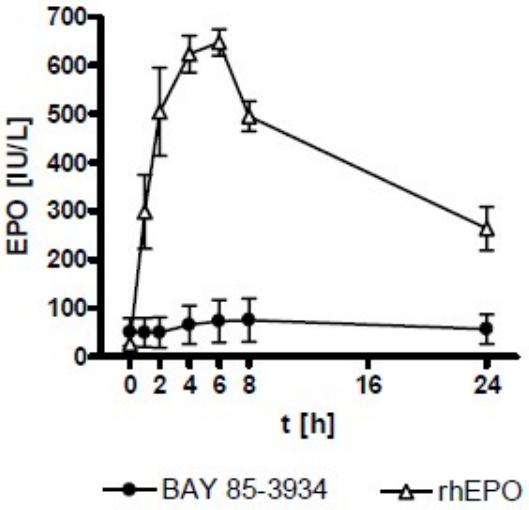
Dose	Mean ± SD	% change (vs. 0 IU/kg)
rhEPO: 0 IU/kg (saline)	156 ± 4.6	-
rhEPO: 25 IU/kg	161 ± 2.2	+ 3.2
rhEPO: 50 IU/kg	164 ± 7.3	+ 5.1
rhEPO: 100 IU/kg	175 ± 3.9	+ 12
molidustat: 2.5 mg/kg	176 ± 7.5	+ 13

2.6.2.2.2.5.2 サル

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36103

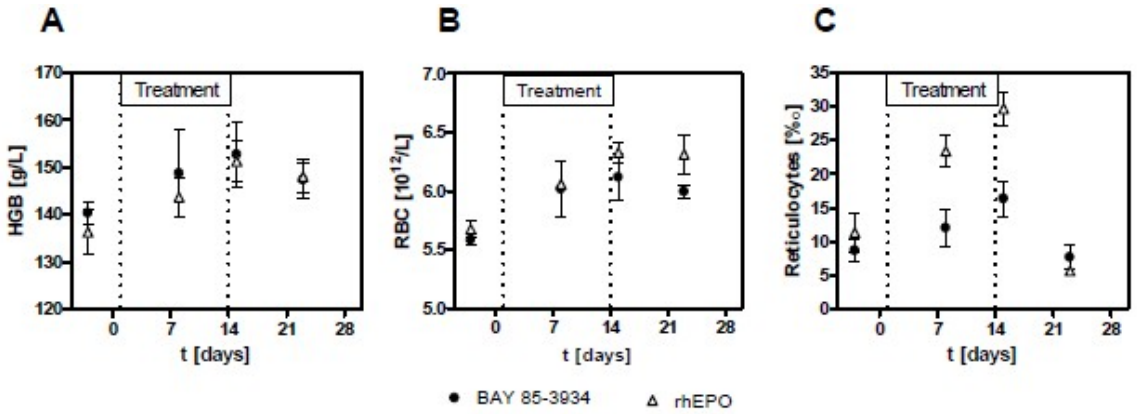
サルにおけるモリデュスタットの効果を rhEPO と比較検討するため、単回及び反復投与試験を実施した。rhEPO を 100IU/kg の用量でカニクイザル（体重 2.8～5.6kg）に単回皮下投与、又はモリデュスタットを 1.5mg/kg（媒体：0.5%タイロース溶液）の用量で単回経口投与した（n＝3）。被験薬投与前（ベースライン）、並びに投与後 1、2、4、6、8 及び 24 時間において採血し、血漿中 EPO 濃度を測定した。また、rhEPO を 100IU/kg の用量でカニクイザルに週 2 回 2 週間（1、4、8 及び 11 日目）反復皮下投与、又はモリデュスタットを 1.5mg/kg の用量で 1 日 1 回 2 週間反復経口投与した（n＝3）。被験薬の初回投与前（ベースライン）、並びに投与後 8 日、15 日及び 23 日において、ヘモグロビン濃度、赤血球数及び網状赤血球比率を測定した。

rhEPO 単回投与後の血漿中 EPO 濃度は、モリデュスタット単回投与による内因性 EPO 誘導に比し高かった（図 2.6.2.2- 17）。しかし、反復投与試験におけるヘモグロビン濃度及び赤血球数の増加量は両群共に、測定期間を通してほぼ一致した（図 2.6.2.2- 18、A 及び B）。網状赤血球比率は rhEPO 投与群の方がモリデュスタット投与群よりも約 2 倍高かった（図 2.6.2.2- 18、C）。最終測定日（23 日目）にはベースライン値未満にまで回復した。網状赤血球比率について、rhEPO 投与群では網状赤血球産生が最大に達すると予測される時期（rhEPO 投与後 4 日目）と実際の測定時期（8 及び 15 日目）が一致したため、高値を示したものと推測された。一方、モリデュスタットはベースラインに近いレベルで持続的に内因性 EPO 産生を刺激することによって同等の赤血球産生効果をもたらすものと考えられる。



BAY 85-3934: molidustat, t: time, h: hour, data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 17　サルにおける rhEPO（100IU/kg）又はモリデュスタット（1.5mg/kg）単回投与後の血漿中 EPO 濃度の経時変化



A: HGB (hemoglobin), B: RBC (red blood cell), C: Reticulocytes, BAY 85-3934: molidustat, t: time, data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 18 サルにおける rhEPO（100IU/kg）週 2 回又はモリデュスタット（1.5mg/kg）1 日 1 回 2 週間反復投与試験でのヘモグロビン濃度、赤血球数及び網状赤血球比率の経時変化

2.6.2.2.2.6 ゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデル

ゲンタマイシンを雄性ラット（Wistar、体重 250～360g）に投与することによって作製した腎障害ラットモデル[5)] を用いて、モリデュスタットの内因性 EPO 誘導、並びに腎性貧血に対する予防及び改善効果を検討した。

2.6.2.2.2.6.1 EPO 誘導

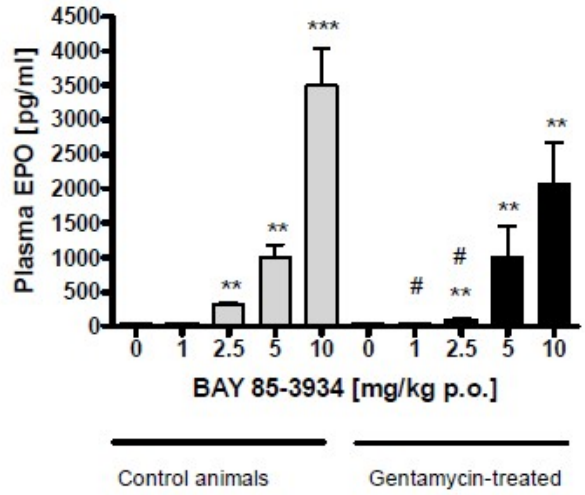
参照項目： 4.2.1.1.5 PH-36106

ゲンタマイシンを 100mg/kg の用量でラットに 1 日 1 回 15 日間反復腹腔内投与した。対照群には同容量の生理食塩液を腹腔内投与した。ゲンタマイシン処置群では対照群に比し、全例で血漿中クレアチニン濃度の上昇及びクレアチニンクリアランスの低下がみられ、重度の腎障害を発症していることが確認された。ゲンタマイシン処置群及び対照群それぞれにおいて、モリデュスタット投与群間で平均ヘマトクリット値が同程度となるように動物を割り付けた。ゲンタマイシン処置群及び対照群のそれぞれにおいて、モリデュスタットを 0（媒体）、1、2.5、5 及び 10mg/kg の用量（5mL/kg）で単回経口投与した（n＝5）。被験薬投与後 4 時間において採血及び臓器（腎臓及び肝臓）の摘出を行い、それぞれ血漿中 EPO 濃度及び EPO mRNA 発現量を測定した。更に、摘出腎を用い、急性及び慢性腎障害のいくつかのマーカー〔kidney injury molecule-1（KIM-1）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、グルコーストランスポーター1（GLUT-1）、オステオポンチン（OP）及びメタロプロテイナーゼ阻害因子 1（TIMP-1）〕の mRNA 発現量についても測定した。

モリデュスタット投与後の血漿中 EPO 濃度は、対照群及びゲンタマイシン処置群のいずれにおいても顕著かつ用量依存的に上昇した（図 2.6.2.2- 19）。両群共に 2.5mg/kg 以上の用量で EPO 誘導がみられた。誘導された EPO の絶対量はゲンタマイシン処置群で低値であった。腎臓における EPO mRNA 発現量についても同様な結果が得られ、両群共に 1mg/kg 以上の用量で増加がみられた（図 2.6.2.2- 20、A）。また、ゲンタマイシン処置群の EPO mRNA 発現量が対照群に比し低かったことも同様であった。肝臓における EPO mRNA 発現量は、対照群の正常腎に比べて 10 分の

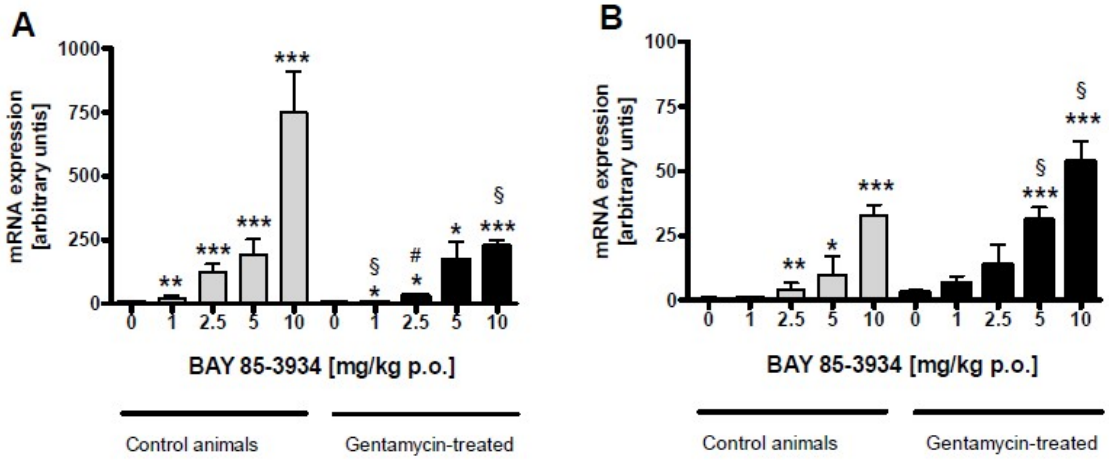
1 以下ではあるものの、両群共に増加がみられた（図 2.6.2.2- 20、B）。肝臓の EPO mRNA 発現量は、対照群に比しゲンタマイシン処置群でわずかに高かった。

急性及び慢性腎障害のマーカーである KIM-1、NGAL、GLUT-1、OP 及び TIMP-1 の mRNA はいずれもゲンタマイシン処置群で対照群に比し発現量の増加がみられたが、モリデュスタット投与後にこれらの mRNA 発現量に影響はみられなかった。



BAY 85-3934: molidustat, Mann Whitney comparison vs. corresponding 0 mg/kg dose group
** p<0.01, *** p<0.001, vs. corresponding control group # p<0.05, means ± SEM

図 2.6.2.2- 19　正常ラット及びゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにおけるモリデュスタット単回投与後 4 時間の血漿中 EPO 濃度



A: kidney, B: liver, BAY 85-3934: molidustat, t-test vs. corresponding 0 mg/kg dose group
** p<0.01, *** p<0.001, t-test vs. corresponding control group § p<0.05, # p<0.001, means ± SEM

図 2.6.2.2- 20　正常ラット及びゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにおけるモリデュスタット単回投与後 4 時間の腎臓及び肝臓の EPO mRNA 発現量

2.6.2.2.2.6.2　　予防及び改善効果

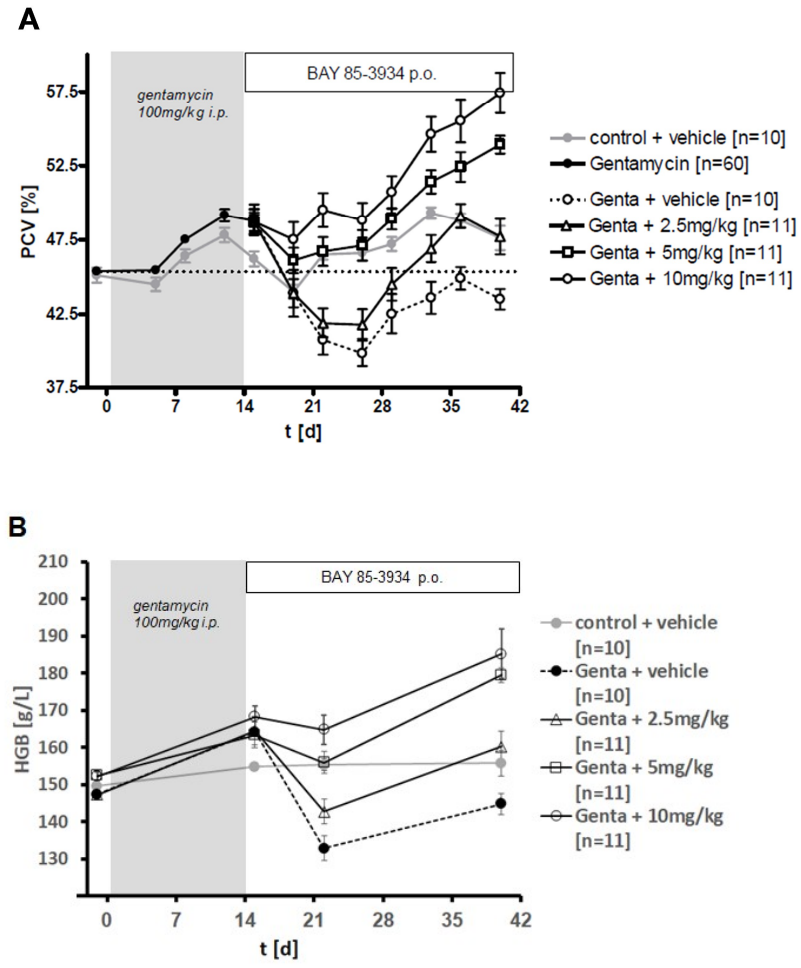
参照項目： 4.2.1.1.5 PH-36106

ゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルを用いて、モリデュスタットの貧血に対する予防及び改善効果を検討した。

ゲンタマイシンを 100mg/kg の用量でラットに 1 日 1 回 14 日間反復腹腔内投与し、対照群には同容量の生理食塩液を腹腔内投与した。ゲンタマイシン処置後、ヘマトクリット値が最低となる前の 15 日目より（図 2.6.2.2- 21、A）、モリデュスタットを 0（媒体）、2.5、5 及び 10mg/kg の用量（5mL/kg）で 1 日 1 回週 5 回 4 週間反復経口投与した。ゲンタマイシン処置群で血漿中に EPO が誘導される最低用量として 2.5mg/kg を選択した。対照群には媒体を 1 日 1 回週 5 回 4 週間反復経口投与した。

ゲンタマイシン処置群では対照群に比し体重が平均約 25%低下し、14～20 日目に最低値を示した。ゲンタマイシン投与期間中に動物の 28.3%が死亡し、生存動物について、モリデュスタット投与群間で平均ヘマトクリット値が同程度となるように動物を割り付けた。なお、ゲンタマイシン処置終了後 26 日目において、ヘマトクリット値は最低となり、処置前に比し約 7%低下がみられたことから、当該腎障害モデルで貧血が誘発されることが確認された（図 2.6.2.2- 21、A、Gentamycin 群及び Gentamycin＋vehicle 群）。

モリデュスタット 5 及び 10mg/kg 投与群において、ヘマトクリット値の低下は完全に抑制され、最終的なヘマトクリット値は対照群よりも高値であった（図 2.6.2.2- 21、A）。最低用量 2.5mg/kg 投与群においても、22 日目以降、媒体投与群（ゲンタマイシン処置群）のヘマトクリット値を約 1～2%上回るレベルの回復がみられ、モリデュスタットの効果が確認された。ヘマトクリット値はモリデュスタット投与後約 2 週間でベースラインレベルまで回復した。またモリデュスタット投与後のヘモグロビン濃度の経時的推移はヘマトクリット値とよく一致した（図 2.6.2.2- 21、B）。



A: PCV (packed cell volume, hematocrit), B: HGB (hemoglobin), BAY 85-3934: molidustat, Genta: Gentamycin, t: time, d: day, data points are plotted as means ± SEM

図 2.6.2.2- 21　正常ラット及びゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにおけるモリデュスタット週 5 回 4 週間反復投与試験でのヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度の経時変化

2.6.2.2.2.7　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

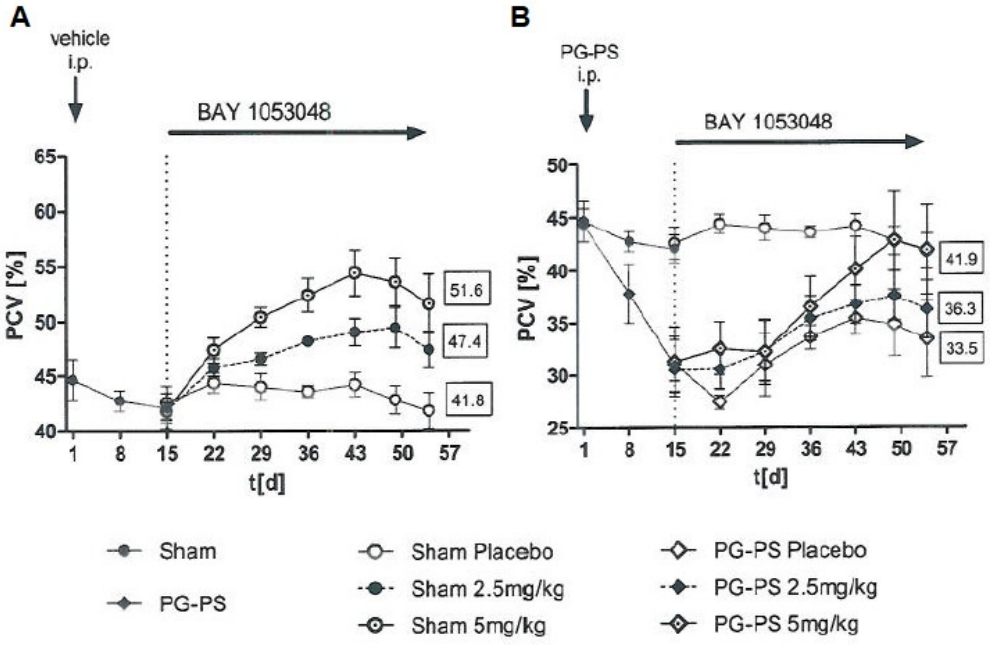
参照項目： 4.2.1.1.10 PH-37106

化膿レンサ球菌（*Streptococcus pyogenes*）由来のペプチドグリカンーポリサッカライド（PG-PS）の単回投与により、慢性炎症と共に持続的な貧血が誘発される[6)]。PG-PS（15mg/kg）を雌性ラット（Lewis、体重 155～181g）に単回皮下投与し炎症を誘発した（対照群には生理食塩液を皮下投与）。両後肢の足関節直径を測定し炎症反応の兆候を確認した。PG-PS 又は生理食塩液処置後 2 週間において、モリデュスタットナトリウムを 0（媒体）、2.5 及び 5mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 2.34 及び 4.67mg/kg）の用量（5mL/kg）で、1 日 1 回 5 週間反復経口投与した〔対照群（Sham 群、n＝5）、PG-PS 群（n＝11 又は 12）〕。なお、Sham 群及び PG-PS 処置群のそれぞれにおいて、モリデュスタット投与群間で平均ヘマトクリット値が同程度となるように

動物を割り付けた。被験薬の反復投与終了後、摘出した腎臓及び肝臓における低酸素、炎症及び組織傷害性のマーカー遺伝子〔EPO、ADM、ANGPTL-4、IL-6、単球走化性促進因子（MCP-1）、TNF-α、IL-1、NGAL、KIM-1、ヘプシジン（HAMP）〕の mRNA 発現量を測定した。

PG-PS 処置動物（処置後 2 週間より媒体投与した動物）において、22 日目にはヘマトクリット値は 17%減少し（図 2.6.2.2- 22、B、PG-PS Placebo）、腎臓及び肝臓における低酸素、炎症及び組織傷害性を示すマーカー遺伝子の上昇がみられ、PG-PS 処置により炎症性貧血モデルが作製されたことが確認された。モリデュスタット投与により、ヘマトクリット値の更なる低下は抑制され、4.67mg/kg 投与群では 49 日目（モリデュスタット投与 34 日目）に正常レベルにまで回復し（図 2.6.2.2- 22、B）、これには腎臓の MCP-1 mRNA 及び肝臓の HAMP mRNA 発現量の低下を伴った。試験終了時点（54 日目）で、2.34mg/kg 投与群においても媒体投与群に比しヘマトクリット値は約 3%高かった（図 2.6.2.2- 22、B）。PG-PS 処置群におけるモリデュスタット投与後の腎臓の EPO mRNA 発現量は Sham 群よりも 2 倍高かった。

なお、Sham 群ではモリデュスタット 2.34mg/kg 及び 4.67mg/kg 投与により、媒体投与群に比しヘマトクリット値はそれぞれ 5.6%及び 9.8%高く（図 2.6.2.2- 22、A）、腎臓における EPO mRNA 発現量は 4.67mg/kg 投与群で媒体投与群よりも 100 倍高かった。



A: Sham, B: PG-PS treated animals, BAY 1053048: molidustat sodium, PCV: packed cell volume (hematocrit), t: time, d: day, means ± SD

図 2.6.2.2- 22　正常ラット（Sham）及び PG-PS 誘発炎症性貧血ラットモデルにおけるモリデュスタットナトリウム 5 週間反復投与試験でのヘマトクリット値の経時変化

2.6.2.2.2.8　HIF 標的遺伝子に対する影響

参照項目：4.2.1.1.8 PH-36450
4.2.1.1.6 PH-36116
4.2.1.1.7 PH-36122
4.2.1.1.9 PH-39083

EPO 以外の HIF が標的とする遺伝子（低酸素応答性遺伝子）[2)] に対するモリデュスタットの影響について検討した。

モリデュスタット投与後の腎臓における HIF 標的遺伝子の経時的変化を検討した（PH-36450）。モリデュスタットを 5mg/kg の用量で雄性ラット（Wistar、体重 240～340g）に単回経口投与後 0.5、1、2、4、6 及び 8 時間の各時点において、それぞれ 5 例より摘出した腎臓を用い、EPO に加え HIF 標的遺伝子として知られる内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）、アドレノメジュリン（ADM）、ヘムオキシゲナーゼ 1（HMOX1）、乳酸脱水素酵素 A（LDH-A）、グルコーストランスポーター1（GLUT-1）、血管内皮増殖因子 A（VEGF-A）、アンジオポエチン様因子 4（ANGPTL-4）、インスリン様増殖因子結合タンパク質（IGFBP-1、IGFBP-3）、HIF-PH1、HIF-PH2、HIF-PH3 についてそれぞれ mRNA 発現量を測定した。また、0 及び 4 時間後におけるベースライン値を得るため、それぞれ無投与群及び媒体投与群を設置した（各 5 例）。EPO mRNA は投与後 1 時間で約 5 倍に達し、2 時間で最大に達した（約 54 倍）（図 2.6.2.2- 23）。そのほかの HIF 標的遺伝子の mRNA は誘導されないか、又は誘導されてもわずかであった。なお、HMOX1、IGFBP-1、ADM 及び ANGPTL-4 の mRNA は投与後 2 時間において最大に達し、ベースラインに比し 2～4 倍の間であったが、EPO mRNA と比べると明らかに発現量は低かった。

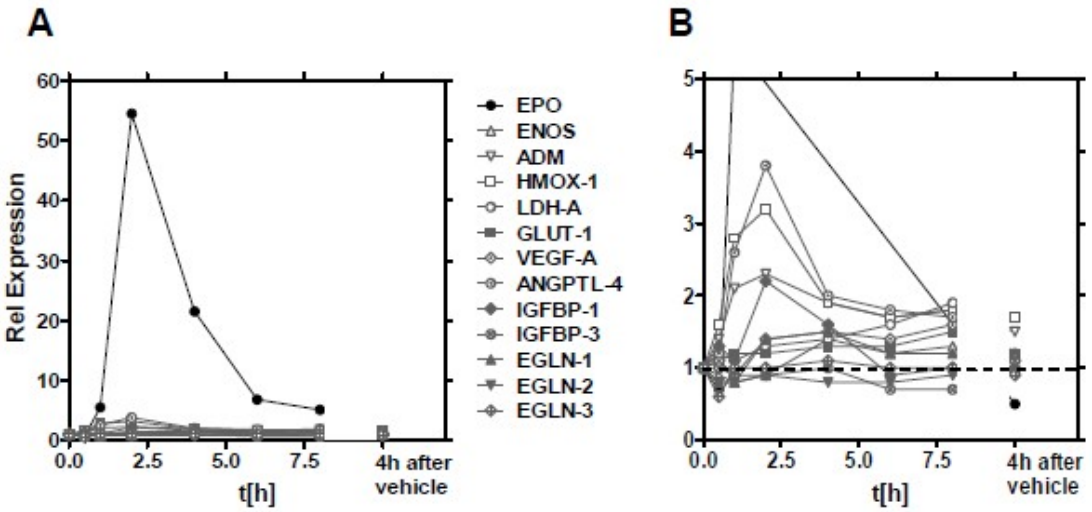
更に、正常ラット及びゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルを用いて、モリデュスタットを用量漸増で投与した 4 時間後における腎臓及び肝臓の HIF 標的遺伝子発現を同様に検討した。

モリデュスタットを 0（媒体）、0.5、1.25、2.5 及び 5mg/kg の用量で雄性ラット（Wistar、体重 250～360g）に単回経口投与した（5mL/kg、n＝12）。投与後 4 時間において、摘出腎臓及び肝臓を用い、EPO、ANGPTL-4、炭酸脱水酵素 9（CA9）、HMOX1、IGFBP-1、VEGF-A、エンドセリン 1（ET）、LDH-A、GLUT-1、ADM、eNOS、HIF-PH3 の mRNA 発現量を測定した（PH-36116）。腎臓の EPO mRNA は用量依存的に増加し、最高用量 5mg/kg ではベースラインに比し約 70 倍に達した。そのほかの HIF 標的遺伝子の mRNA は誘導されないか、又は誘導されてもわずかであった。なお、腎臓の ANGPTL-4 mRNA は最大 5 倍に達したが用量依存的な増加はみられず、また eNOS mRNA は最高用量でも 4 倍であり、EPO mRNA と比べると明らかに発現量は低かった。肝臓でも、そのほかの mRNA は誘導されない、又は誘導されてもわずかであった。ANGPTL-4 mRNA の発現量が 2 倍に達したが、腎臓の EPO mRNA と比べて明らかに低い発現量であった。

また、ゲンタマイシン 100mg/kg 又は同容量の生理食塩液を 1 日 1 回 15 日間反復皮下投与した雄性ラット（Wister、体重 250～360g）に、モリデュスタットを 0（媒体）、1.25、2.5、5 及び 10mg/kg の用量で単回経口投与した（5mL/kg、n＝5）。投与後 4 時間の摘出腎臓及び肝臓について、EPO、ANGPTL-4、ADM、CA9、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 1（PDK-1）、VEGF-A、IGFBP-1、GLUT-1、LDH-A の mRNA 発現量を測定した（PH-36122）。腎臓の EPO mRNA は用量依存的に増加し、対照群及びゲンタマイシン処置群において、最高用量 10mg/kg 投与後、ベースラインに比しそれぞれ約 90 倍及び約 250 倍に達した（図 2.6.2.2- 24）。肝臓の EPO mRNA は両群共に、正常腎と比べて 10 分の 1 以下であった。腎臓及び肝臓の EPO を除く、そのほかの HIF 標的遺伝子は誘導されないか、又は誘導されてもわずかであった（図 2.6.2.2- 24）。なお、対照群の ANGPTL4 mRNA は最高用量で 5 倍に達したが、用量依存的な増加はみられなかった。また、対照群及びゲンタマイシン処置群において、肝臓の ADM mRNA は最高用量で 5 倍に達したが、腎臓の EPO mRNA

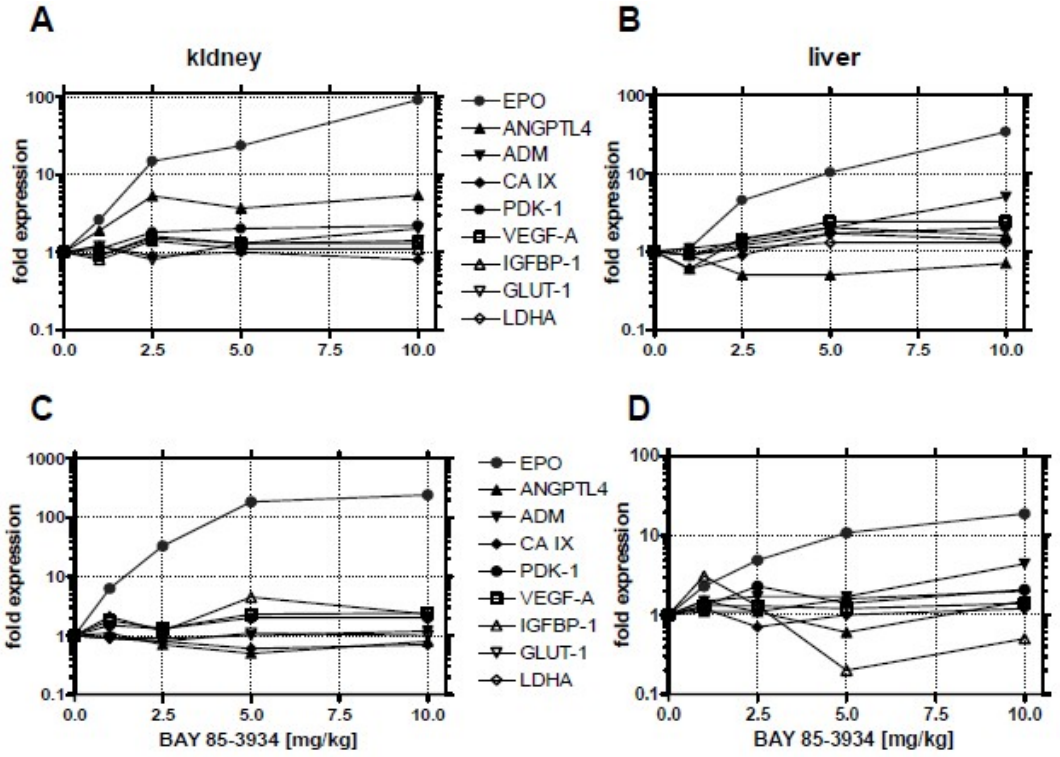
と比べると明らかに発現レベルは低かった。対照群とゲンタマイシン処置群との間で、腎臓及び肝臓における mRNA 発現量に明らかな差異はみられなかった（図 2.6.2.2- 24）。

以上、いずれの試験においても、モリデュスタット投与後の EPO mRNA の発現量と比べると、そのほかの HIF 標的遺伝子 mRNA の発現量は十分低いことが確認された。



B: enlargement of the curves between relative expression levels from 0- to 5-fold shown in A,
Rel = relative, t = time, h = hour

図 2.6.2.2- 23　ラットにおけるモリデュスタット（5mg/kg）単回投与後の腎臓の HIF 標的遺伝子 mRNA 発現の経時変化



BAY 85-3934: molidustat, A and B: normal rats, C and D: rats after treatment with Gentamycin, A and C: kidney, B and D: liver, Data source: PH-36122

図 2.6.2.2- 24　正常ラット及びゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにおけるモリデュスタット単回投与後 4 時間の HIF 標的遺伝子 mRNA 発現

HIF 標的遺伝子産物 EPO 及び VEGF の血漿中誘導に対するモリデュスタットの影響について検討した（PH-39083）。モリデュスタットナトリウムを 0（媒体）、5、15 及び 50mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 4.67、14 及び 46.7mg/kg）の用量（5mL/kg）で、雄性ラット（Wistar、体重 233～264g）に単回経口投与後 6 及び 24 時間において採血後、血漿中 EPO 及び VEGF 濃度を ELISA 法により測定した（n＝5）。

血漿中 EPO 濃度はモリデュスタットの用量依存的に上昇し、投与後 6 及び 24 時間において、4.67mg/kg 投与群ではそれぞれ 16 倍及び 9 倍に、14mg/kg 投与群ではそれぞれ 240 倍及び 12 倍に、46.7mg/kg 投与群ではそれぞれ 1000 倍及び 235 倍に上昇した。一方、血漿中 VEGF 濃度は、投与後 6 及び 24 時間において、4.67mg/kg 投与群ではいずれも上昇せず、14mg/kg 投与群ではいずれも 1.4 倍上昇したのみで、46.7mg/kg 投与群ではそれぞれ 2.2 倍及び 1.6 倍上昇した。したがって、血漿中 VEGF 誘導について、モリデュスタット 4.67mg/kg はラットにおける無影響量である可能性が考えられ、これは 14mg/kg 以上を投与後に血漿中 VEGF 濃度の上昇傾向がみられていることから推測された。しかし、血漿中 VEGF 濃度の上昇率は、いずれの投与群においても、媒体投与群と比較して有意差はみられなかった（p＞0.05 vs. 媒体投与群、one way ANOVA＋Dunnett's multiple comparisons）。

2.6.2.2.3 モリデュスタットナトリウムの効力薬理作用

参照項目： 4.2.1.1.11 PH-36727

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）の薬理作用について、*in vitro* 試験では、HIF-PH1 及び HIF-PH2 に対する阻害作用を生化学アッセイ（方法は 2.6.2.2.1.1 と同様）、並びに HIF 安定化作用を HIF 標的レポーター遺伝子アッセイ（方法は 2.6.2.2.1.2 と同様）により、また *in vivo* 試験では、マウス及びラットにおける血漿中 EPO 濃度、又はヘモグロビン濃度／ヘマトクリット値を測定することにより検討した。

生化学アッセイでは、2-オキソグルタル酸（20μM）、Fe^{2+}（10μM）及びアスコルビン酸（2mM）を含有する標準アッセイ条件下において、モリデュスタットナトリウム及びモリデュスタットの HIF-PH2 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 346nM 及び 236nM、並びに HIF-PH1 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 544nM 及び 586nM であった（4 回測定）。また HIF 標的レポーター遺伝子アッセイにおいて、モリデュスタットナトリウム及びモリデュスタットの EC_{50} 値はそれぞれ 7.1μM 及び 6.4μM であった（4 回測定）。

モリデュスタットナトリウムを 50mg/kg（遊離塩基換算で 46.7mg/kg、媒体：0.5％クレモフォール）の用量で、又は 0（媒体）及び 100mg/kg（遊離塩基換算で 93.5mg/kg）の用量で、雄性マウス（CD-1、体重 27～30g）にそれぞれ単回腹腔内又は経口投与後 4 時間において、血漿中 EPO 濃度はいずれも媒体投与群に比し 60 倍以上の高値を示した（n＝3）。

また、モリデュスタットナトリウムを 0（媒体）、2.5、5 及び 10mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 2.34、4.67 及び 9.35mg/kg）の用量で、雌性ラット（Lewis、体重 180～210g）に単回経口投与後 4 時間において血漿中 EPO 濃度を、また 2 日間反復経口投与後 3 日においてヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値をそれぞれ測定した（n＝3）。血漿中 EPO 濃度は用量依存的に上昇し、9.35mg/kg 投与群では約 2000pg/mL に達し、これはモリデュスタット 10mg/kg をラットに単回経口投与後 4 時間における血漿中 EPO 濃度と同程度であった（図 2.6.2.2- 6）。ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値は 2.34mg/kg 以上の用量で増加することが確認された。

以上より、モリデュスタットナトリウムの *in vitro* 及び *in vivo* 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ることが確認された。

2.6.2.2.4 代謝物 M-1 の薬理活性

参照項目： 4.2.1.1.4 PH-36726

げっ歯類、イヌ及びヒトにおける主要な代謝物 M-1 は、N-グルクロン酸抱合体（2.6.4.5.1）である。M-1 の薬理活性について、HIF-PH1 及び HIF-PH2 に対する阻害作用を生化学アッセイにより検討した（方法は 2.6.2.2.1.1 と同様）。

ラットの肝細胞に未変化体であるモリデュスタットを添加しインキュベーションした後、M-1 を単離、精製した。モリデュスタットでは HIF-PH1 及び HIF-PH2 に対する阻害作用（IC_{50} 値はそれぞれ 246nM 及び 76nM）が確認されたが、M-1 では阻害作用はみられなかった。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 特異性

参照項目： 4.2.1.2.1 PH-39205
4.2.1.2.2 PH-39206

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）に対する酵素分析アッセイにより、モリデュスタットの特異性を検討した（PH-39205）。また、オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ（3 種類）に対する活性についても検討した（PH-39206）。いずれのアッセイにおいても 2 回測定を実施し、50%以上の阻害又は刺激作用が認められた場合、「有意」と判定した。

モリデュスタット（10μM）は、検討した 67 種類の広範な標的及び 8 種類の特定酵素に対し、阻害及び刺激作用のいずれも示さなかった。同様に、オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼに対し、阻害及び刺激作用のいずれも示さなかった。以上、モリデュスタットは *in vitro* スクリーニング試験においてオフターゲット作用を示さなかった。

2.6.2.3.2 心血管系に対する作用

2.6.2.3.2.1 血圧及び心拍数に対する作用

参照項目： 4.2.1.2.3 PH-36728

モリデュスタットのような HIF-PH 阻害薬は、正常酸素分圧下において、低酸素状態でみられる生理学的作用である内因性 EPO を誘導する。しかし低酸素状態は心血管系に影響を及ぼすことが知られているため、モリデュスタットの血圧及び心拍数に対する影響についてラットを用いて検討した。

テレメーターを装着した雌性ラット（Wistar、体重 220～390g）に、モリデュスタットナトリウムを 0〔媒体：エタノール／PEG400（20/80、v/v）混液〕、1、3 及び 10mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 0.93、2.80 及び 9.35mg/kg）の用量（n＝10）で、又は 0（媒体）、30、100 及び 300mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 28.0、93.5 及び 280mg/kg）の用量（n＝4 又は 5）でそれぞれ単回経口投与した（2mL/kg）。同様に、モリデュスタットナトリウム 0（媒体）及び 30mg/kg（遊離塩基換算で 28.0mg/kg）、アドレナリンβ受容体遮断薬アテノロール 10mg/kg の単回経口投与、並びにモリデュスタットナトリウム（30mg/kg：遊離塩基換算で 28.0mg/kg）とアテノロール（10mg/kg）との併用経口投与を行った（n＝5）。血圧及び心拍数は、被験薬投与前 2 時間の平均測定値からの変化率（%）により示した。更に、サテライト動物を用いて、モリデュスタットナトリウム 10 及び 30mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 9.35 及び 28.0mg/kg）投与後におけるモリデュスタットの血漿中濃度、並びに 28.0mg/kg 投与後における血漿中 EPO 濃度を測定した〔測定時点：0～7 時間後（n＝3）、24 時間後（n＝6）〕。

モリデュスタット 0.93mg/kg では血圧に影響はみられなかったが、モリデュスタット 2.80mg/kg 以上では用量依存的な血圧の低下がみられ、2.80、9.35 及び 28.0mg/kg の用量でそれぞれ 7、12 及び 16%低下した。28.0mg/kg 以上の用量では作用が飽和に達する傾向が認められ、最大作用は 93.5mg/kg 投与時の 24%の血圧低下であった。最大作用に達する時間は、28.0mg/kg

までの用量では投与後 3 時間以内、93.5 及び 280mg/kg では 6～11 時間以内であった。血圧低下の持続時間は用量依存的であった。最高用量 280mg/kg において、血圧は投与後 24 時間以内に媒体投与群レベルまで徐々に回復した。

また、血圧低下に伴って一過性の頻脈（最大 38%）が認められたが、これはアテノロールの併用投与によりほぼ完全に消失したことから、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頻脈によるものと考えられた。サテライト動物において、モリデュスタット 9.35 及び 28.0mg/kg を投与後 30 分～1 時間に最高血漿中濃度（C_{max}）に達し、血漿中 EPO 濃度は 28.0mg/kg 投与後 4 時間において最大に達した。

2.6.2.3.2.2 圧受容器反射の感受性及び振幅に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.2.4 PH-37020

ラットにおける頻脈が圧受容器反射によるものと考えられたことから（2.6.2.3.2.1）、更に、モリデュスタットの圧受容器反射の感受性及び振幅に及ぼす影響について検討した。

モリデュスタットナトリウムを 0〔媒体：エタノール／PEG400（20/80、v/v）混液〕及び 10mg/kg（遊離塩基換算で 9.35mg/kg）の用量で、雌性ラット（Wistar、体重 205～250g）に単回経口投与後 2 時間 30 分において、麻酔下で、アルギニンバソプレッシン（AVP、0.9%塩化ナトリウム溶液）400ng/kg を 25 分間隔で 3 回静脈内投与し、平均動脈圧及び心拍数を測定した（n＝7 又は 8）。同様に、モリデュスタットナトリウムを 0（媒体）、10 及び 30mg/kg（遊離塩基換算でそれぞれ 9.35 及び 28.0mg/kg）の用量でラットに単回経口投与後 3 時間 30 分において、麻酔下で、アドレナリンα1 受容体作動薬メトキサミン塩酸塩（メトキサミン、0.9%塩化ナトリウム溶液）50、100、200 及び 400μg/kg を 15 分間隔で静脈内に連続投与後、平均動脈圧及び心拍数を測定した（n＝4 又は 7）。

媒体投与群において、AVP の投与に応じた、短時間かつ迅速な平均動脈圧の上昇及び心拍数の低下がみられた。モリデュスタット投与により 12%の平均動脈圧の低下がみられたが、媒体投与群と同様、AVP による平均動脈圧の上昇及び心拍数の低下に対し影響を及ぼさなかった。メトキサミンによる平均動脈圧の上昇及び心拍数の低下に対しても、モリデュスタットは影響を及ぼさなかった。したがって、モリデュスタットの単回投与はラットにおける圧受容器反射の感受性及び振幅に影響を及ぼさないと考えられる。

2.6.2.4 安全性薬理試験

モリデュスタットが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 *in vivo* 試験で検討した（試験一覧は 2.6.3 参照のこと）。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。なお、*in vivo* 試験におけるモリデュスタットの媒体には、エタノール／ソルトール／水（10/40/50、v/v/v）混液を用いた。

2.6.2.4.1 心血管系

2.6.2.4.1.1 *In vitro* 試験

参照項目： 4.2.1.3.1 PH-36325

hERG カリウムチャネルを安定して発現するヒト胎児由来腎臓（HEK）293 細胞を用いて、ホールセルパッチクランプ法により、モリデュスタット（1、10 及び 100μM、媒体：DMSO）が hERG テール電流に及ぼす影響を検討した（5 回測定／被験液濃度）。陽性対照には E-4031（1μM）を用いた（5 回測定）。

モリデュスタットは検討した最高濃度まで、hERG テール電流に影響を及ぼさなかった。なお、E-4031 は添加前の hERG テール電流振幅を 5%にまで低下させた。

2.6.2.4.1.2 イヌ

参照項目： 4.2.1.3.2 A47489

モリデュスタット原末をゼラチンカプセルに封入したものを用い、用量が 1、3 及び 10mg/kg となるように、テレメーターを装着した覚醒下の雌雄ビーグル犬（体重 10.6～17.1kg）に単回経口投与し、16 時間にわたって動脈血圧（収縮期及び拡張期）、心拍数並びに心電図を測定した（n＝5）。対照群には水を経口投与した。心電図 QT 間隔については、Fridericia 式（QTcF）、van de Water 式（QTcV）及び Matsunaga 式（QTcM）を用いて心拍数補正を行った。また、サテライト動物（体重 10.5～13.7kg）において、同様に、モリデュスタットを 1、3 及び 10mg/kg の用量で単回経口投与後 1、3、7 及び 24 時間に採血し、血漿中モリデュスタット濃度を測定した（n＝4）。

モリデュスタットの単回投与後、16 時間の観察期間中に動脈血圧及び心拍数への影響は認められなかった。また心電図パラメータ（PQ、QRS、QTc 間隔）に対しても影響は認められなかった。サテライト動物におけるモリデュスタットの C_{max} は用量依存的に上昇し、それぞれ 357μg/L（1mg/kg）、1600μg/L（3mg/kg）及び 5118μg/L（10mg/kg）であった。

2.6.2.4.2 呼吸器系

参照項目： 4.2.1.3.3 A48137

モリデュスタットを 0（媒体）、3、10 及び 30mg/kg の用量で、非拘束覚醒下の雄性ラット（Sprague Dawley、体重 314～401g）に単回経口投与し、全身プレチスモグラフィーにより 5 時

間にわたって呼吸機能に対する影響を検討した（n＝8）。投与前、投与後 30 分、1 時間、1 時間 30 分、3 及び 5 時間において、呼吸数、1 回換気量及び分時換気量を評価した。

検討したすべての用量において、モリデュスタットの単回経口投与は呼吸数、1 回換気量及び分時換気量に対し生理学的に問題となる影響を及ぼさなかった。なお、最高用量 30mg/kg 投与後 3 及び 5 時間において、媒体投与群に比し 20%までの呼吸数の増加（p＜0.05、Dunnett's test）がみられたものの、試験期間を通して変化は緩やか、かつその程度も小さかったことから、生理学的には問題とはならないと考えられた。

2.6.2.4.3 中枢神経系

参照項目： 4.2.1.3.4 PH-36375
4.2.1.3.5 PH-36330
4.2.1.3.6 A47464

モリデュスタットの中枢神経系に及ぼす影響を検討するため、ラットを用い、以下に示す 3 試験を実施した。いずれの試験においても、モリデュスタットを 0（媒体）、3、10 及び 30mg/kg の用量で、雄性ラット（Wistar）に単回経口投与した（6mL/kg）。

一般症状観察、自発運動及び体温（PH-36375）：モリデュスタットをラット（体重 193～218g）に単回経口投与後 1、2 及び 5 時間において一般症状及び体温、並びに 1 及び 5 時間においてオープンフィールドでの自発運動に対する影響を評価した（n＝6）。またサテライト動物において、モリデュスタットを単回経口投与後 1、2 及び 5 時間に採血し、血漿中モリデュスタット濃度を測定した（n＝3）。

痙攣、熱侵害受容及びヘキソバルビタール睡眠時間（PH-36330）：モリデュスタットをラット（体重 182～230g）に単回経口投与後 1 時間において、ペンチレンテトラゾールを静脈内投与し、痙攣閾値に対する影響を評価した（n＝6 又は 7）。また、モリデュスタットを単回経口投与後 45 分において、ホットプレートを用いた熱侵害受容反応に対する影響を評価した後（n＝7 又は 8）、その 15 分後、ヘキソバルビタールを腹腔内投与し、睡眠時間に対する影響を評価した（n＝6～8）。

運動協調性（A47464）：モリデュスタットをラット（体重 91～124g）に単回経口投与後 1 時間において、加速ロータロッドを用いて運動協調性に対する影響を評価した（n＝12）。

いずれの試験においても、モリデュスタットの単回経口投与は中枢神経系機能パラメータに対し影響を及ぼさなかった。またモリデュスタットの単回経口投与後 1 時間において、血漿中モリデュスタット濃度は最大に達し、C_{max} はそれぞれ 452μg/L（3mg/kg）、1604μg/L（10 mg/kg）及び 5300μg/L（30mg/kg）であった。

2.6.2.4.4 腎機能、血液学的パラメータ及び脂質代謝

参照項目： 4.2.1.3.7 PH-36331

モリデュスタットを 0（媒体）、3、10 及び 30mg/kg の用量で、雄性ラット（Wistar、体重 197～236g）に単回経口投与した（6mL/kg、n＝9 又は 10）。なお、被験薬投与前 15 分において、尿量確保の目的で 3mL の脱塩水を経口投与した。被験薬投与後 2 時間まで尿を収集後、採血し、

尿量、尿中電解質排泄量（ナトリウム、カリウム、クロライド）、血液学的パラメータ（赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット、血中総ヘモグロビン濃度／血漿遊離ヘモグロビン濃度）、血液凝固パラメータ（トロンビン時間及びトロンボプラスチン時間）、血漿中トリグリセド及びコレステロール濃度を測定した。

モリデュスタットの単回経口投与は、検討したいずれのパラメータに対しても生理学的に問題となる影響を及ぼさなかった。なお、30mg/kg 投与群で尿中ナトリウム排泄量〔102μmol/kg ；p＜0.05 vs 媒体投与群（38μmol/kg）、Welch test〕、3mg/kg 投与群で赤血球数〔8.14×10^{12}/L ；p＜0.05 vs 媒体投与群（7.63×10^{12}/L）、ANOVA＋Dunnett's test〕及び血中総ヘモグロビン濃度〔157g/L ；p＜0.05 vs 媒体投与群（151g/L）、ANOVA＋Dunnett's test〕において、媒体投与群に比し有意差が認められたものの、いずれの変化も用量依存性はみられず偶発的な変化であると考えられたことから、モリデュスタット投与に関連したものではないと考えられた。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

2.6.2.5.1 血圧低下作用を有する薬剤との併用

参照項目： 4.2.1.4.1 PH-37183

ラットでみられた血圧低下作用（2.6.2.3.2）の機序について HIF-PH 阻害薬による eNOS 遺伝子誘導の可能性が考えられた[7] ため、NO による血管拡張（血圧低下）作用を持続・増強させる PDE5 阻害薬との併用がモリデュスタットの血圧低下作用を増強させるか検討した。

テレメーターを装着した雌性ラット（Wistar、体重 220～390g）にモリデュスタットナトリウム 3mg/kg（遊離塩基換算で 2.80mg/kg）、PDE5 阻害薬バルデナフィル 1 又は 3mg/kg、あるいは媒体〔エタノール／PEG400（20/80、v/v）混液〕をそれぞれ単独で、並びにモリデュスタット 3mg/kg をバルデナフィル 1 又は 3mg/kg との併用で経口投与した（n＝3 又は 4）。

モリデュスタット投与後、平均動脈圧はわずかに低下し、心拍数には影響はみられなかった。バルデナフィル投与後、平均動脈圧は用量依存的に軽度～中等度の低下（ベースラインに比し 10%まで）がみられ、用量に相関した心拍数の増加がみられた。併用投与後、平均動脈圧は相加的に低下したものの、血圧低下の増強はみられなかった。バルデナフィル投与後にみられた心拍数の増加には影響はみられなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

モリデュスタットは、直接的に細胞内酸素を検知し、腎臓の EPO 産生におけるネガティブ調節因子として機能する HIF-PH に対する強力かつ可逆的な阻害薬である。酸素低下による HIF-PH 阻害の機序は、赤血球数を増加させるために行う高地トレーニングの根拠でもある。モリデュスタットは HIF-PH を阻害することによって、低酸素状態で生じる生理学的作用と同様に、内因性 EPO を誘導し赤血球産生を促進する。

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、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 HIF 標的レポーター遺伝子を安定導入した A549 細胞において、モリデュスタットは HIF 標的レポーター遺伝子の発現を誘導したことから、モリデュスタットは HIF-PH を阻害することにより、HIF を安定化することが示された。更に、A549 及び HeLa 細胞において、培養液からモリデュスタットを除去後、タンパク質合成阻害剤存在下で HIF は分解／消失したことから、モリデュスタットの HIF-PH 阻害作用は可逆的であることが確認された。

モリデュスタットはげっ歯類、イヌ及びサルのいずれに対しても経口投与により血漿中に EPO を誘導することが確認された。EPO 誘導の最小有効用量は、ラットで 1.25mg/kg、イヌで 0.6mg/kg、サルで 0.5mg/kg であり、EPO 誘導に続いて赤血球を産生した。いずれの動物種においても、EPO 誘導はモリデュスタットの用量依存的に促進され、ラットでは 500mg/kg 以上の経口投与により飽和に達した。

ラット及びサルにおいて、モリデュスタットの 1 日 1 回反復経口投与（ラット：2.5mg/kg、サル：1.5mg/kg）による赤血球産生作用は、rhEPO の標準的な投与方法（100IU/kg 週 2 回の反復皮下投与）と同等であることが確認された。これはモリデュスタット 1 日 1 回の投与が、非生理的に血漿中 EPO 濃度が高濃度となる rhEPO 製剤間欠投与の代替治療法となる可能性を示している。すなわち、モリデュスタットは、より低濃度かつより生理的な血漿中 EPO 濃度で rhEPO 製剤と同等の赤血球産生作用を発揮し得る可能性がある。またサルにモリデュスタットの有効用量 1.5mg/kg を 1 日 1 回 5 日間反復経口投与しても、血漿中に EPO の蓄積及び EPO 誘導に対する順応は認められなかった。

ゲンタマイシン誘発腎障害ラットモデルにおいて、モリデュスタットは 2.5～10mg/kg の単回経口投与により、用量依存的に血漿中 EPO を誘導した。また腎臓及び肝臓において EPO mRNA 発現量が増加した。血漿中 EPO 濃度及び腎臓の EPO mRNA 発現量を正常動物と比較すると低値ではあったが、障害された腎臓においても HIF-PH 阻害に対する EPO 誘導作用は保持されていることが確認された。このことは、低酸素刺激に反応し EPO を産生する機能が障害腎において保持されていることを示した報告[8, 9]と一致している。肝臓での EPO mRNA 発現量は正常動物の腎臓と比較すると 10 分の 1 以下ではあったものの、顕著に増加し、またこれは正常動物に比べゲンタマイシン処置動物でわずかだが高かった。腎障害ラットにモリデュスタットを投与したとき、肝臓での EPO 産生が血漿中 EPO 濃度に量的に寄与している可能性が考えられるが、少なくともモリデュスタットの投与なしでは腎臓での低下した EPO 産生に対する肝臓の代償反応は機能しないものと考えられる。更に、貧血を誘発した当該モデルにおいて、モリデュスタットは 2.5、5 及び 10mg/kg の反復経口投与により、ヘマトクリット値の低下の抑制及び回復作用を示したことから、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確認された。5mg/kg 以上の用量では、ヘマトクリット値の低下が完全に抑制された。なお、5mg/kg 投与時の非結合型 AUC(0-24)の 1031μg･h/L〔AUC(0-24)：3014μg･h/L、血漿中非結合型分率（fu）：34.2%〕は、慢性腎臓病患者に最高用量 200mg を 1 日 1 回投与時の推定非結合型 AUC の 1339μg･h/L（AUC：6470μg･h/L、

fu：20.7%）（表 2.6.6.9- 1）と大きな開きはみられず、腎障害ラットモデルにおける試験成績から臨床でのモリデュスタットの有効性が期待される。

同様に、PG-PS 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 の 1 日 1 回反復経口投与により、ヘマトクリット値の低下は抑制され、モリデュスタットによる貧血の改善効果が確認された。なお、これには腎臓の MCP-1 mRNA 及び肝臓の HAMP mRNA の発現の低下を伴っていたことから、抗炎症作用も示唆される。

モリデュスタット 5mg/kg の単回経口投与により、ラットの腎臓における EPO mRNA の発現は 50 倍以上増加したが、そのほかの HIF 標的遺伝子に対しては誘導されない、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 まで単回経口投与した結果、腎臓の EPO mRNA は最大 250 倍に増加したが、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。このように、いずれの試験においても、モリデュスタット投与後の EPO mRNA 発現量と比べると、そのほかの HIF 標的遺伝子 mRNA の発現量は十分に低いことが確認された。更に、モリデュスタット 46.7mg/kg までの単回経口投与により、ラットの血漿中 EPO 濃度は最大 1000 倍に上昇したが、血漿中 VEGF 濃度は最大でも 2 倍程度に上昇したのみであった。したがって、モリデュスタットは貧血改善効果を示す有効用量において、選択的に EPO を誘導するものと考えられる。

以上の試験成績から、モリデュスタットは 1 日 1 回経口投与により、EPO 反応性貧血の治療に適した EPO 誘導薬であることが示された。

広範にわたる受容体、イオンチャネル、トランスポーター及び酵素に対する放射性リガンド結合アッセイ及び酵素分析アッセイを用いた *in vitro* スクリーニング試験において、モリデュスタットによる阻害及び刺激作用はみられず、モリデュスタットはオフターゲット作用を示さなかった。

モリデュスタット 2.80mg/kg 以上の用量をラットに単回経口投与したとき、血圧は用量依存的に低下し、93.5mg/kg 投与により最大 24%低下した。血圧低下に伴って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、血管収縮刺激薬による血圧の上昇及び心拍数の低下に対し、モリデュスタットは影響を及ぼさなかったことから、ラットの圧受容器反射の感受性及び振幅に影響を及ぼさないと考えられる。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は 28.0mg/kg 投与後 30 分～1 時間で最大に達し、最大血圧低下がみられた投与後 3 時間と比べて開きがあったことから（2.6.2.3.2.1）、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。なお、国内第Ⅲ相試験の全 5 試験併合解析の 52 週解析では、モリデュスタット併合群（全 393 例）の TEAE として血圧低下及び低血圧がそれぞれ 1.8%（7 例）にみられ、また実薬対照 3 試験併合解析の 52 週解析では、モリデュスタット併合群（全 317 例）の TEAE として血圧低下及び低血圧がそれぞれ 1.6%（5 例）及び 1.9%（6 例）にみられ、ダルベポエチン併合群（全 237 例）では低血圧が 1.3%（3 例）にみられた（2.7.4.2.1.5.7）。一方、ND2 試験併合解析及び HD 患者を対象とした実薬対照試験である試験 19352 の 52 週解析のいずれにおいても、モリデュスタット併合群における収縮期及び拡張期血圧は共に臨床的に意味のあるベースラインからの変動を認めず、かつダルベポエチン併合群との間に大きな違いはみられなかった（2.7.4.4.1）。

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。

安全性薬理試験において、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）及び腎機能に対する影響を検討した結果、ラットの中枢神経系、呼吸器系、腎機能（血液学的パラメータ及び脂質代謝を含む）、並びにイヌの血行動態及び心電図パラメータ（QT/QTc 間隔を含む）、更に *in vitro* 心室再分極（hERG カリウムチャネル）のいずれに対しても、モリデュスタットは生理学的に問題となる影響を及ぼさなかった。ラットにおける無毒性量（NOAEL）である 30mg/kg（最高用量）投与後の非結合型 C_{max} の 1813μg/L（C_{max}：5300μg/L）は、慢性腎臓病患者に最高用量 200mg を 1 日 1 回投与時の推定非結合型 C_{max} の 593μg/L（C_{max}：2866μg/L）（表 2.6.6.9- 1）に比し 3 倍高く、またイヌにおける NOAEL の 10mg/kg（最高用量）投与後の非結合型 C_{max} の 2050μg/L（C_{max}：5100μg/L、fu：40.2%）は 3.5 倍高かった。

以上の安全性薬理試験成績から、モリデュスタットは慢性腎臓病患者で予測される最大曝露量においても、催不整脈作用を含め、有害作用をもたらす可能性は低いと考えられる。

2.6.2.7　　図表

図表は本文中に記載した。

引用文献一覧

1) Unger EF et al., N Engl J Med 2010:362:189-192 (4.3.1)
2) Schofield CJ et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2004:5:343-354 (4.3.2)
3) Wenger RH et al., Am J Physiol Renal Physiol 2010:298:F1287-F1296 (4.3.3)
4) Jewell UR et al., FASEB J 2001:15:1312-1314 (4.3.4)
5) Nagano N et al., J Pharm Pharmacol 1990:42:758-762 (4.3.5)
6) Sartor RB et al., Infect Immun 1989:57:1177-1185 (4.3.6)
7) Coulet F et al., J Biol Chem 2003:278:46230-46240 (4.3.22)
8) Kato A et al., Ren Fail 1994:16:645-651 (4.3.7)
9) Shimizu S et al., Acta Physiol Scand 1994:151:225-231 (4.3.8)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

試験一覧表は、2.6.3.2、2.6.3.3、2.6.3.4 及び2.6.3.5を参照。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

別途記載のない限り、すべての試験はBayer 社（Wuppertal、ドイツ）で行われた。

Test Article: **molidustat or molidustat sodium**

Primary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Report No.	Location in CTD
Inhibition of HIF-prolyl hydroxylases (isoform 1 and 2)	-	*In vitro*	PH-36105	4.2.1.1.1
Inhibition of HIF-prolyl hydroxylase (isoform 3)	-	*In vitro*	PH-39186	4.2.1.1.2
Induction of HIF-dependent reporter gene expression	-	*In vitro*	PH-36105	4.2.1.1.1
Induction HIF-1 alpha in cell culture cells	-	*In vitro*	PH-36105	4.2.1.1.1
Induction of plasma erythropoietin	Mouse	i.p./ Oral, single dose	PH-36103	4.2.1.1.3
Induction of kidney erythropoietin mRNA, plasma erythropoietin and reticulocytes	Rat	Oral, single dose	PH-36103	4.2.1.1.3
Induction of reticulocytes and increase of hematocrit	Rat	Oral, repeated dose	PH-36103	4.2.1.1.3
Induction of plasma erythropoietin and reticulocytes	Dog	Oral, single dose	PH-36103	4.2.1.1.3
Induction of plasma erythropoietin	Monkey	Oral, repeated dose	PH-36103	4.2.1.1.3
Comparison of erythropoietic efficacy with recombinant human erythropoietin	Rat/ Monkey	Oral, repeated dose	PH-36103	4.2.1.1.3
Gentamycin-induced renal anemia in rats	Rat	Oral, repeated dose	PH-36106	4.2.1.1.5
Peptidoglycan-Polysaccharide (PG-PS) induced inflammatory anemia in rats	Rat	Oral, repeated dose	PH-37106	4.2.1.1.10
HIF-target gene transcription in kidney	Rat	Oral, single dose	PH-36450	4.2.1.1.8
HIF-target gene transcription in kidney and liver	Rat	Oral, single dose	PH-36116	4.2.1.1.6
HIF-target gene transcription in kidney and liver in gentamycin-induced renal anemia in rats	Rat	Oral, single dose	PH-36122	4.2.1.1.7
Plasma levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor (VEGF)	Rat	Oral, single dose	PH-39083	4.2.1.1.9

i.p.: intraperitoneal

Test Article: **molidustat or molidustat sodium**

Primary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Report No.	Location in CTD
In vitro and *in vivo* activity of molidustat sodium	- Mouse/ Rat	*In vitro*, i.p./Oral, single dose (Mouse) Oral, single/ repeated dose (Rat)	PH-36727	4.2.1.1.11
In vitro activity of M-1 metabolite in the HIF-PH enzyme assay	-	*In vitro*	PH-36726	4.2.1.1.4

2.6.3.3 副次的薬理試験

別途記載のない限り、すべての試験はBayer 社（Wuppertal、ドイツ）で行われた。

Test Article: **molidustat or molidustat sodium**

Secondary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Report No.	Location in CTD
Radio-ligand binding assays	67 receptors/ ion channels/ transporters	*In vitro*	PH-39205 [a]	4.2.1.2.1
Enzyme assays	8 enzymes	*In vitro*	PH-39205 [a]	4.2.1.2.1
	3 enzymes	*In vitro*	PH-39206 [b]	4.2.1.2.2
Blood pressure and heart rate	Rat	Oral, single dose	PH-36728	4.2.1.2.3
Baroreceptor reflex response	Rat	Oral, single dose	PH-37020	4.2.1.2.4

[a] external study performed at [redacted] Taiwan

[b] external study performed at [redacted] France

2.6.3.4 安全性薬理試験

別途記載のない限り、すべての試験はBayer 社（Wuppertal、ドイツ）で行われた。

Test Article: **molidustat**

Safety Pharmacology – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD (Report No.)
Effects on hERG K^+ current	Transfected HEK cells	*In vitro*	Bayer AG	4.2.1.3.1 (PH-36325)
Effects on cardiovascular system	Dog	Oral (gelatin capsule)	Bayer AG	4.2.1.3.2 (A47489)
Effects on respiratory system	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG	4.2.1.3.3 (A48137)
Effects on central nervous system	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG	4.2.1.3.4 (PH-36375) 4.2.1.3.5 (PH-36330) 4.2.1.3.6 (A47464)
Effects on renal/urinary system	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG	4.2.1.3.7 (PH-36331)
Effects on blood cell parameter and coagulation	Rat	Oral (gavage)	Bayer AG	4.2.1.3.7 (PH-36331)

Test Article: **molidustat**

Safety Pharmacology – *In-vitro* studies

Organ Systems Evaluated	Test System	Concentration	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Electrophysiology					
hERG K^+ current	Transfected HEK cells (whole-cell voltage-clamp technique)	0 – 1 – 10 – 100 µmol/L (positive control: E-4031, 1 µmol/L)	None (IC_{20} > 100 µmol/L)	Yes	4.2.1.3.1 (PH-36325)

Test Article: **molidustat**

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of administration	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Central nervous system							
Behavior (mod. Irwin test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (6)	None	Yes	4.2.1.3.4 (PH-36375)
Locomotor activity (open field test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (6)	None	Yes	4.2.1.3.4 (PH-36375)
Body temperature	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (6)	None	Yes	4.2.1.3.4 (PH-36375)
Anti- / proconvulsive effect (pentylenetetrazole threshold test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (6-7)	None	Yes	4.2.1.3.5 (PH-36330)
Nociceptive responsiveness (hot plate test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (7-8)	None	Yes	4.2.1.3.5 (PH-36330)
Duration of hexobarbital-induced anesthesia	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (6-8)	None	Yes	4.2.1.3.5 (PH-36330)
Motor coordination (rotarod test)	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (12)	None	Yes	4.2.1.3.6 (A47464)

Test Article: **molidustat**

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of administration	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Renal / urinary system							
Urine volume, electrolyte excretion	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (9-10)	No physiologically significant effects on urine volume and electrolyte excretion (Na, K, Cl)	Yes	4.2.1.3.7 (PH-36331)
Metabolism							
Hematology	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (9-10)	No physiologically significant effects on cell count (erythrocytes, leukocytes, platelets), hematocrit, and hemoglobin	Yes	4.2.1.3.7 (PH-36331)
Plasmatic coagulation	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (9-10)	None (thrombin time, thromboplastin time)	Yes	4.2.1.3.7 (PH-36331)
Lipid metabolism	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (9-10)	None (plasma cholesterol and triglycerides)	Yes	4.2.1.3.7 (PH-36331)

Test Article: **molidustat**

Safety Pharmacology – *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of administration	Doses [a] [mg/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Respiratory system							
whole-body plethysmography	Rat/ Sprague Dawley	Oral (gavage)	0 - 3 - 10 - 30	male (8)	No physiologically significant effects on respiration rate, tidal and minute volume	Yes	4.2.1.3.3 (A48137)
Cardiovascular system							
Hemodynamics, ECG	Dog/ Beagle [b]	Oral (gelatin capsule)	1 - 3 - 10	male & female (5)	No effects on arterial blood pressure, heart rate, and ECG (including the QT/QTc interval)	Yes	4.2.1.3.2 (A47489)
Systemic exposure							
Dog	Dog/ Beagle	Oral (gelatin capsule)	1 - 3 - 10	male & female (4)	mean maximal drug plasma concentrations at 1-2 hours post-treatment amounted to 0.4 mg/L, 1.6 mg/L, and 5.1 mg/L	Yes	4.2.1.3.2 (A47489)
Rat	Rat/ Wistar	Oral (gavage)	3 - 10 - 30	male (3)	mean maximal drug plasma concentrations at 1 hour post-treatment amounted to 452 µg/L, 1604 µg/L, and 5300 µg/L	Yes	4.2.1.3.4 (PH-36375)

[a] single dose unless specified otherwise

[b] conscious, telemetered dogs

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用

別途記載のない限り、すべての試験はBayer 社（Wuppertal、ドイツ）で行われた。

Test Article: **molidustat sodium**

Pharmacodynamic Drug Interactions – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Report No.	Location in CTD
Effects of combined PDE5 inhibitor on blood pressure and heart rate	Rat	Oral (gavage)	PH-37183	4.2.1.4.1