2.6.1　緒言

2.6.1.1　序文

ベルイシグアト（BAY 1021189 又は MK-1242）は、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）の選択的刺激薬である。ベルイシグアトの化学構造を図 2.6.1.1- 1 に、理化学的性状に関する情報を表 2.6.1.1- 1 に示す。

図 2.6.1.1- 1　ベルイシグアトの化学構造

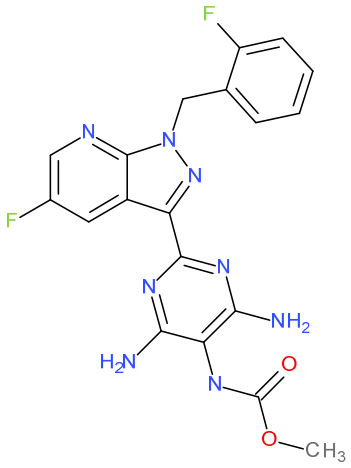
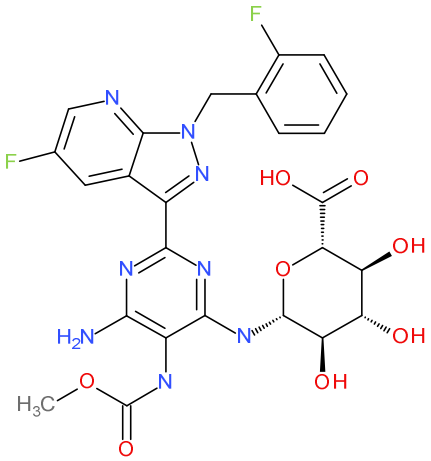


表 2.6.1.1- 1　ベルイシグアトの理化学的性状に関する情報

化学名（IUPAC）	methyl {4,6-diamino-2-[5-fluoro-1-(2-fluorobenzyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-3-yl]pyrimidin-5-yl}carbamate
分子式	$C_{19}H_{16}F_2N_8O_2$
分子量	426.39 g/mol
CAS No	1350653-20-1
キラル中心	なし

また、ヒト血漿中における主要代謝物である M-1（BAY 1222707）の化学構造を図 2.6.1.1- 2 に示す。M-1 はベルイシグアトの N－グルクロン酸抱合体であり、薬理活性及びオフターゲット作用を示さず、化学的転位反応を示唆する結果は得られていない。

図 2.6.1.1- 2　M-1 の化学構造



一酸化窒素（NO）／sGC シグナル伝達経路は、心血管系の重要な調節因子である。sGC は広範な組織で偏在的に発現し、内皮細胞由来 NO の受容体として機能している。sGC は NO と結合すると、血管緊張、増殖、線維化及び炎症など細胞機能調節において重要な役割を担うシグナル伝達分子である環状グアノシン一リン酸（cGMP）の生成反応を触媒する。心血管疾患及び心不全の病態では、NO 産生が障害され、NO 利用能の低下及び組織中 cGMP 量の低下を来す内皮細胞機能不全がみられる。この NO 利用能低下及び不十分な sGC 刺激によって、全身、冠動脈、肺及び腎臓の血管緊張調節障害、灌流障害による臓器の損傷及び機能不全、有害なリモデリング及び心腎症候群が発現する。したがって、cGMP シグナル伝達を回復させるために、薬理学的に直接 sGC を刺激することは、心血管疾患及び様々なタイプの心不全に対する新規の治療的アプローチとなる可能性がある。

ベルイシグアトは選択的かつ特異的に sGC と結合し、濃度依存的に cGMP の産生を増加させることから、慢性心不全に対する治療薬として開発されてきた。本医薬品製造販売承認申請におけるベルイシグアトの申請効能・効果及び申請用法・用量等を表 2.6.1.1- 2 に示す。ベルイシグアトの非臨床試験成績は次項以降に示す。

表 2.6.1.1- 2 製造販売承認申請の概略

申請区分	医療用医薬品（1）新有効成分含有医薬品
販売名	ベリキューボ錠 2.5mg、同 5mg、同 10mg
一般名	ベルイシグアト
効能・効果	慢性心不全 ただし、慢性心不全の標準的な治療を受けている患者に限る。
用法・用量	通常、成人にはベルイシグアトとして、1 回 2.5mg を 1 日 1 回食後経口投与から開始する。約 2 週間間隔で 5mg、10mg を 1 日 1 回食後投与に段階的に増量する。なお、患者の状態に応じて適宜増減する。

2.6.2 薬理試験の概要文の目次

略語一覧 3
2.6.2.1　まとめ..... 5
2.6.2.1.1　効力を裏付ける試験..... 5
2.6.2.1.2　副次的薬理試験..... 6
2.6.2.1.3　安全性薬理試験..... 6
2.6.2.1.4　薬力学的薬物相互作用..... 7
2.6.2.2　効力を裏付ける試験..... 8
2.6.2.2.1　*In vitro* 試験 8
2.6.2.2.1.1　高度精製組換え sGC に対する作用 9
2.6.2.2.1.2　GTP 消費測定による sGC 刺激アッセイ..... 10
2.6.2.2.1.3　sGC 過剰発現細胞に対する作用..... 11
2.6.2.2.1.4　血管内皮細胞に対する作用 11
2.6.2.2.1.5　単離血管に対する作用 12
2.6.2.2.1.6　ランゲンドルフ灌流心臓標本における作用 12
2.6.2.2.1.7　ヒト血小板に対する作用 12
2.6.2.2.1.8　硝酸耐性伏在動脈に対する作用 13
2.6.2.2.2　*In vivo* 試験 14
2.6.2.2.2.1　麻酔正常ラットにおける作用 16
2.6.2.2.2.2　覚醒正常ラットにおける作用 16
2.6.2.2.2.3　自然発症高血圧ラットにおけるベルイシグアト単回経口投与の作用 17
2.6.2.2.2.4　自然発症高血圧ラットにおけるベルイシグアト反復経口投与の作用 18
2.6.2.2.2.5　高血圧及び心不全ラットにおける作用 18
2.6.2.2.2.6　麻酔イヌにおける作用 19
2.6.2.2.2.7　低酸素誘発急性肺高血圧イヌモデルにおける作用 20
2.6.2.2.2.8　トロンボキサン誘発急性肺高血圧ブタモデルにおける作用 21
2.6.2.2.2.9　肺高血圧を有する頻回ペーシング心不全イヌモデルにおける作用 22
2.6.2.2.2.10　ブレオマイシン誘発皮膚線維化マウスモデルにおける作用 23
2.6.2.3　副次的薬理試験..... 24
2.6.2.3.1　*In vitro* 試験 24
2.6.2.3.2　*In vivo* 試験 24
2.6.2.4　安全性薬理試験..... 25

2.6.2.4.1　*In vitro* 試験 26
2.6.2.4.1.1　hERG 電流に対する影響..... 26
2.6.2.4.2　*In vivo* 試験 26
2.6.2.4.2.1　ラットの中枢神経系に及ぼす影響 26
2.6.2.4.2.1.1　ラットにおける行動、自発運動及び体温 26
2.6.2.4.2.1.2　ラットにおける協調運動 27
2.6.2.4.2.1.3　ラットにおける化学物質誘発痙攣 27
2.6.2.4.2.2　ラットの呼吸機能に及ぼす影響 27
2.6.2.4.2.3　テレメータ装着覚醒イヌの心血管系に及ぼす影響 27
2.6.2.4.2.4　ラットの胃内容排出及び腸管排出に及ぼす影響 28
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用..... 29
2.6.2.5.1　麻酔ラットにおけるベルイシグアトとニトログリセリンとの相互作用..... 29
2.6.2.5.2　テレメータ装着自然発症高血圧ラットにおけるサクビトリル及びバルサルタンとベルイシグアトとの相互作用 29
2.6.2.5.3　テレメータ装着イヌにおけるニトログリセリンとベルイシグアトとの相互作用..... 29
2.6.2.6　考察及び結論..... 31
2.6.2.7　図表..... 34
引用文献一覧 34

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
ADP	Adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin	平滑筋型αアクチン
ANP	Atrial natriuretic peptide	心房性ナトリウム利尿ペプチド
ARB	Angiotensin II receptor blocker	アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬
$BaSO_4$	Barium sulfate	硫酸バリウム
BNP	B-type natriuretic peptide	B型ナトリウム利尿ペプチド
BP	Blood pressure	血圧
CBF	Coronary blood flow	冠血流量
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	環状グアノシン一リン酸
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣細胞
C_{max}	Mean maximum drug concentration in plasma	血漿中最高濃度
$C_{max,u}$	Maximum concentration of unbound fraction	血漿中非結合型最高濃度
CNGA2	Cyclic nucleotide-gated cation channel	環状ヌクレオチド感受性カチオンチャネル
CNP	C-type natriuretic peptide	C型ナトリウム利尿ペプチド
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CO	Cardiac output	心拍出量
CVP	Central venous pressure	中心静脈圧
DEA/NO	Diethylamine/nitric oxide complex	ジエチルアミン／一酸化窒素複合体
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
+dP/dt	First derivative of ventricular pressure (Left ventricular contractility)	左室圧一次微分値（左室収縮性）
EC_{50}	Median/half maximum effective concentration	50%有効濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
GC-A	Receptor guanylyl cyclase GC-A	グアニル酸シクラーゼ受容体A
GC-B	Receptor guanylyl cyclase GC-B	グアニル酸シクラーゼ受容体B
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
GTN	Glycerol trinitrate	ニトログリセリン
GTP	Guanosine triphosphate	グアノシン三リン酸
HEK	Human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	human ether-à go-go related gene	－
HR	Heart rate	心拍数
IC_{20}	Concentration required for 20% inhibition	20%阻害濃度
IC_{50}	Median/half maximum inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonization	医薬品規制調和国際会議
IV	Intravenous	静脈内投与

略語	英語名称	日本語名称
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester	NG-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル
LVP	Left ventricular pressure	左室圧
LVEDP	Left ventricular enddiastolic pressure	左室拡張末期圧
mAoP	Mean aortic blood pressure	平均大動脈圧
MAP	Mean arterial blood pressure	平均動脈圧
MEC	Minimum effective concentration	最小有効濃度
MRHD	Maximum recommended human dose	最高推奨臨床用量
NEP	Neutral endopeptidase, Neprilysin	中性エンドペプチダーゼ、ネプリリジン
NO	Nitric oxide	一酸化窒素
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one	1H-[1,2,4]オキサジアゾロ[4,3-a]キノキサリン-1-オン
PAP	Pulmonary artery pressure	肺動脈圧
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩液
PDE	Phosphodiesterase	ホスホジエステラーゼ
PEG	Polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PH-LVD	Secondary pulmonary hypertension due to left ventricular disfunction	左室機能不全に伴う二次性肺高血圧
PTZ	Pentylenetetrazol	ペンチレンテトラゾール
PVR	Pulmonary vascular resistance	肺血管抵抗
QTc	Corrected QT interval in ECG	補正 QT 間隔
SEM	Standard error of mean	平均の標準誤差
sGC	Soluble guanylate/guanylyl cyclase	可溶性グアニル酸シクラーゼ
SHR	Spontaneously hypertensive rats	自然発症高血圧ラット
sLVP	Systolic left ventricular pressure	左室収縮期圧
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine	S-ニトロソ-N-アセチル-D,L-ペニシルアミン
SNP	Sodium nitroprusside	ニトロプルシドナトリウム
SVO_2	Oxygen saturation in the coronary sinus	冠静脈洞血酸素飽和度
SVR	Systemic vascular resistance	全身血管抵抗
t_{max}	Time to reach maximum drug concentration in plasma	血漿中最高濃度到達時間
TRAP-6	Thrombin receptor activator peptide 6	トロンビン受容体活性化ペプチド 6
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

ベルイシグアトの薬理学的プロファイルを明らかにするために、効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験を実施した。

2.6.2.1.1 効力を裏付ける試験

一酸化窒素（NO）・可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）シグナル伝達経路は、心血管系の重要な調節因子のひとつである。広範な組織に偏在的に発現する sGC は、内皮細胞由来 NO の受容体として機能し、NO が結合するとシグナル伝達分子である環状グアノシン一リン酸（cGMP）の生成反応を触媒する。cGMP は、血管緊張などの細胞機能、増殖、線維化及び炎症の調節において重要な役割を果たしている[1,2,3]。

心血管疾患及び心不全の病態では、NO 産生が障害されることで NO 利用能の低下及び組織中 cGMP 量の低下を来す内皮細胞機能不全がみられる。この NO 利用能低下及び不十分な sGC 刺激によって、全身、冠動脈、肺及び腎臓などに血管緊張調節障害や灌流障害が生じ、臓器の損傷及び機能不全、有害なリモデリング、心腎症候群などが発現する[4,5,6,7]。このようなことから、cGMP シグナル伝達を回復させるために薬理学的に直接 sGC を刺激することは、心血管疾患や慢性心不全に対する新規の治療法となる可能性がある。

ベルイシグアト（BAY 1021189 又は MK-1242）は、sGC 刺激薬に分類される新規の化合物であり、選択的かつ特異的に sGC に結合し、濃度依存的に cGMP の産生を増加させる。このような作用機序を有するベルイシグアトの薬理学的プロファイルを、各種動物における血行動態試験及び心不全モデル等の実験的心血管疾患モデル試験を含む各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験により検討し、sGC 刺激薬であるベルイシグアトが慢性心不全に対する新たな治療手段となる可能性を評価した。

In vitro 試験として、sGC に対するベルイシグアトの作用を検討した結果、ベルイシグアトは sGC を刺激し、cGMP の産生を増加させることが確認された。単離した組換え sGC、sGC 過剰発現細胞株及び血管内皮細胞を用いた検討結果、並びに類薬の知見等 [2]から、ベルイシグアトは NO 非依存的に cGMP の産生を増加させることに加え、低濃度の NO に対する sGC の感受性を高めることで NO と相乗的に cGMP の産生を増加させると考えられた。ベルイシグアトは、ウサギの伏在動脈及び大動脈、イヌ大腿静脈、並びにブタ冠動脈等の各種動物の血管を弛緩させ、硝酸耐性のウサギ伏在動脈に対してもフェニレフリン誘発収縮を抑制した。ラットランゲンドルフ灌流心臓標本において、ベルイシグアトは 10nM～10μM の濃度範囲で、心拍数、左室拡張期圧及び収縮力に影響を及ぼすことなく、濃度依存的に冠動脈灌流圧を低下させた。ヒト血漿中主要代謝物 M-1 は sGC に対して薬理活性を示さなかった。

In vivo 試験として、麻酔下のラットにベルイシグアトを経口投与（0.3～10mg/kg）又は急速静脈内投与（0.03～1mg/kg）すると、血圧が用量依存的かつ持続的に低下し、これは反射性の心拍数増加を伴った。覚醒下の自然発症高血圧ラット（SHR）においてもベルイシグアトを経口投与（0.3～3mg/kg）すると、血圧が用量依存的及び持続的に低下し、反射性の心拍数増加を伴った。高血圧、心臓・腎臓損傷、心不全及び高死亡率を示すレニントランスジェニックラット心不全モデルにおいて、覚醒下でベルイシグアト（3 及び 10mg/kg 1 日 1 回）を反復経口投与すると、心臓の相対重量が対照に比べ低下し、また尿タンパク質排泄が低下して心腎保護作用が認められるとともに、死亡率が低下した。麻酔下のイヌにベルイシグアト（10～300μg/kg）を急速静脈内投与すると、平均大動脈圧（mAoP）が用量依存的に低下した。高用量（100 及び 300μg/kg）では、肺動脈圧（PAP）が持続的に低下した。また、ベルイシグアトは心拍出量（CO）、冠血流

量（CBF）及び冠静脈洞血酸素飽和度（SVO_2）を用量依存的に増加させ、心筋酸素バランスの改善が示された。低酸素下で肺高血圧を来したイヌに麻酔下でベルイシグアト（10～300μg/kg）を急速静脈内投与すると、mAoP が用量依存的に低下し、PAP 及び中心静脈圧（CVP）も 30μg/kg 以上の用量で用量依存的に低下した。また、ベルイシグアトは用量依存的に CO を増加させ、並行して全身血管抵抗（SVR）及び肺血管抵抗（PVR）を減少させ、SVO_2 の増加を伴った。頻回ペーシングによる左室機能不全に伴う二次性肺高血圧（PH-LVD）を呈する覚醒下のイヌモデルにおいて、ベルイシグアトは全身血圧よりも肺動脈に対して顕著な降圧作用を示し、後負荷をバランスよく減少させた。

要約すると、*in vitro* 及び *in vivo* の検討において、ベルイシグアトは sGC 刺激薬であることが示された。ベルイシグアトは、NO 非依存的に sGC を刺激するだけでなく、内因性の NO との相乗効果によっても cGMP を増加させる可能性がある。この作用機序及び薬理学的特性により、ベルイシグアトは心血管系に対して顕著な効果を示すと考えられた。以上のように、ベルイシグアトは *in vitro* 及び *in vivo* において典型的な sGC 刺激薬として機能することから、心血管系疾患及び慢性心不全に対する治療薬となることが期待される。

2.6.2.1.2 副次的薬理試験

放射性リガンド結合試験及び酵素試験によって、広範なオフターゲット（n=110）に対するベルイシグアトの特異性を検討した。ヒトのドパミントランスポーターを阻害（IC_{50}=2.9μM）したことを除き、10μM の濃度まで、これらのオフターゲットに対する阻害作用は認められなかった。また、ベルイシグアトは、アデノシン二リン酸（ADP）、トロンビン受容体アゴニストペプチド-6（TRAP-6）及びコラーゲンによって誘発されたヒト血小板凝集に対し、*in vitro* で臨床的に意味のある抗凝集作用を示さなかった。

更に、放射性リガンド結合試験及び酵素試験において、ヒト血漿中主要代謝物 M-1 のオフターゲット作用を検討した結果、77 種類のオフターゲットに対し、10μM の濃度まで作用を示さなかった。

以上のように、ベルイシグアト及びその代謝物 M-1 は、*in vitro* において、ベルイシグアトのヒトでの有効用量である最高推奨臨床用量（MRHD）10mg 1 日 1 回経口投与時の血漿中非結合型最高濃度（MRHD 投与時 $C_{max,u}$）の約 162 倍の濃度まで、意義のあるオフターゲット作用を示さなかった。

2.6.2.1.3 安全性薬理試験

生命維持に重要な器官機能［中枢神経系、心血管系〔心電図（ECG）など〕及び呼吸器系］並びに胃腸管系に及ぼすベルイシグアトの影響を検討する *in vitro* 及び *in vivo* 試験（ラット及びイヌ）を実施した。ベルイシグアトは単回経口投与した。

ベルイシグアトは、ラットの呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

ラットの中枢神経系機能に関する試験において、行動及び体温にベルイシグアトの影響が認められた（体温低下と関連した活動性低下、軽微な歩行／姿勢異常、正行反射の軽微な遅延）。これらの影響は高用量でのみ認められ、その $C_{max,u}$ は、MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 37 倍に相当した。体温低下は、ベルイシグアトのオンターゲット作用である末梢／皮膚血管拡張の結果であり、それは動脈圧の低下を伴うことから、血管拡張及びその後の体温低下が、観察された行動に対する影響の要因と考えられた。同用量を用いたラットでのフォローアップ試験において、中枢神経系機能〔自発運動（オープンフィールド）、協調運動及び化学物質誘発痙攣〕に対する影響は認められず、また、ラットにおけるベルイシグアトの血液脳関門を介した脳移行性は非常に低い

（2.6.4.4.1.1）ことから、ベルイシグアトが中枢神経系機能に直接影響を及ぼした可能性は低いと考えられる。

ラットにおいて、ベルイシグアトは MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 6 倍に相当する血漿中濃度で胃腸管運動を抑制した。これはベルイシグアトのオンターゲット作用の平滑筋弛緩作用に基づく胃腸管の弛緩によると考えられた。

更に、イヌにおいて、動脈圧の低下とそれに伴う心拍数の増加等の心血管系への影響が最低用量（MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 4 倍）から認められた。これらの影響もベルイシグアトの平滑筋弛緩作用に基づく血管拡張によるものと考えられる。

ヒトにおける QT 延長のリスクを検討した *in vitro* 及び *in vivo* 心血管系試験（hERG K+チャネルアッセイ及びイヌの ECG 測定における QT/QTc 間隔）において、臨床的に意義のある所見は認められなかった。

以上のように、安全性薬理試験において認められた影響は、sGC 刺激薬の薬理作用による血管拡張及び胃腸管弛緩で説明できるもののみであった。

2.6.2.1.4 薬力学的薬物相互作用

ベルイシグアトが他の cGMP 増加剤〔NO ドナーであるニトログリセリン（GTN）、又は中性エンドペプチダーゼ（NEP）阻害薬であるサクビトリルとアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（ARB）であるバルサルタンの併用〕による標準治療に影響を及ぼすか否かの知見を得るため、ラット及びイヌにおいて、GTN 又はサクビトリル／バルサルタンのベルイシグアトの血行動態に及ぼす影響を検討した。

GTN を投与した麻酔ラット又はサクビトリル及びバルサルタンを併用投与した覚醒ラットにおいて、ベルイシグアトを併用投与した結果、血圧低下作用及び心拍数増加作用に相加効果がみられた。また、覚醒イヌに GTN 及びベルイシグアトを併用投与した結果、血圧低下作用に相加効果のみがみられ、心拍数に対する付加的な影響はみられなかった。血圧及び心拍数に対する相加効果を超える効果は認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In vitro* 試験

表 2.6.2.2- 1 ベルイシグアトの効力を裏付ける試験一覧 – *in vitro*

Title	Test system (including species)	Dosing/ concentration information	Noteworthy findings	Module/ Report
Stimulation of sGC	Baculovirus/Sf9 expression system of highly purified recombinant sGC	BAY 1021189 0.01 to 100 μM; DEA/NO 0.001 to 0.1 μM; ODQ 100 μM	Specific basal activity of sGC = 82.7 nmol/mg/min; 1.7-fold to 57.6-fold increase by 0.01 to 100 μM BAY 1021189; 341.6-fold increase by 100 μM BAY 1021189 plus 0.1 μM DEA/NO; stimulation nearly completely blocked by ODQ	4.2.1.1.1 PH-36490
Stimulation of sGC	Luminometric GTP consumption assay	BAY 1021189 0.001 to 10 μM	MEC = 120 nM	4.2.1.1.2 PH-36740
Stimulation of sGC	Recombinant CHO cell line overexpressing rat sGC (sGC reporter cell line)	BAY 1021189 0.0003 to 10 μM; SNAP 0.03 and 0.1 μM; ODQ 10 μM	EC_{50} = 1,005 ± 145 nM (BAY 1021189 alone); EC_{50} = 39.0 ± 5.1 nM (BAY 1021189 + 30 nM SNAP); EC_{50} = 10.6 ± 1.7 nM (BAY 1021189 + 100 nM SNAP); EC_{50} = 256 ± 40 nM (BAY 1021189 + ODQ pre-treatment)	4.2.1.1.3 PH-36199
Stimulation of sGC	Recombinant CHO cell line overexpressing rat sGC (sGC reporter cell line)	BAY 1222707 (M-1) of BAY 1021189 0.001 to 10 μM	No stimulation of sGC up to 10 μM	4.2.1.1.4 PH-38991
Stimulation of sGC	cGMP formation (porcine endothelial cells)	BAY 1021189 0.001 to 10 μM; DEA/NO 0.01 to 1 μM; ODQ 10 μM	BAY 1021189 induced a concentration-dependent cGMP increase, synergistic BAY 1021189 in combination with DEA/NO; effects completely blocked by ODQ	4.2.1.1.5 PH-39102
Specificity	Stable CHO reporter cell line overexpressing rat GC-A and GC-B	BAY 1021189 0.0003 to 30 μM	No clinically relevant stimulation of the GC-A- or the GC-B reporter cell line	4.2.1.1.6 PH-36559 4.2.1.1.7 PH-36570
Phenylephrine-/ U 46619-induced contractions of isolated vessels	Rabbit saphenous artery rings; rabbit aortic rings; canine femoral vein rings; porcine coronary artery rings	BAY 1021189 10^{-10} /10^{-8} to 10^{-5} g/mL (0.00023/0.023 to 23 μM)	IC_{50} = 798 nM (rabbit saphenous artery); IC_{50} = 692 nM (rabbit aorta); IC_{50} = 3,072 nM (canine femoral vein); IC_{50} = 956 nM (porcine coronary artery)	4.2.1.1.8 PH-36442

Title	Test system (including species)	Dosing/ concentration information	Noteworthy findings	Module/ Report
Langendorff preparation	Langendorff-perfused heart (rat)	BAY 1021189 0.001 to 10 μM	Reduction of coronary perfusion pressure by up to 30% (10 μM)	4.2.1.1.9 PH-36473
Interaction with platelets	Phosphorylation sites of VASP (Ser157 and Ser239) (human washed platelets)	BAY 1021189 0.03 to 10 μM; SNP 0.1 to 30 μM; DEA/NO 0.001 to 0.3 μM	16-fold increase in cGMP levels with BAY 1021189 (10 μM); 5.3-fold increase with SNP (30 μM); 9.3-fold increase with DEA/NO (0.3 μM)	4.2.1.1.10 PH-36444
Nitrate tolerance	Normal and nitrate-tolerant rabbit saphenous artery rings	Isosorbide dinitrate 150 - 250 mg 3 times percutaneously for 3 - 4 days BAY 1021189 10^{-10} to 10^{-6} g/mL (0.00023 to 2.3μM) GTN 10^{-10} to 10^{-6} g/mL (0.00044 to 4.4μM)	BAY 1021189; IC_{50} = 5.6 nM (normal); IC_{50} = 5.8 nM (nitrate tolerant) GTN; IC_{50} = 1.9 nM (normal); IC_{50} = 9.6 nM (nitrate tolerant)	4.2.1.1.11 PH-36443

DEA/NO	diethylamine/nitric oxide complex	MEC	minimum effective concentration
EC_{50}	median/half maximum effective concentration	ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (sGC inhibitor)
cGMP	cyclic guanosine monophosphate		
GC-A	receptor guanylyl cyclase GC-A	SNAP	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine (NO donor)
GC-B	receptor guanylyl cyclase GC-B		
GTN	glycerol trinitrate	SNP	sodium nitroprusside
IC_{50}	median/half maximum inhibitory concentration	VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein

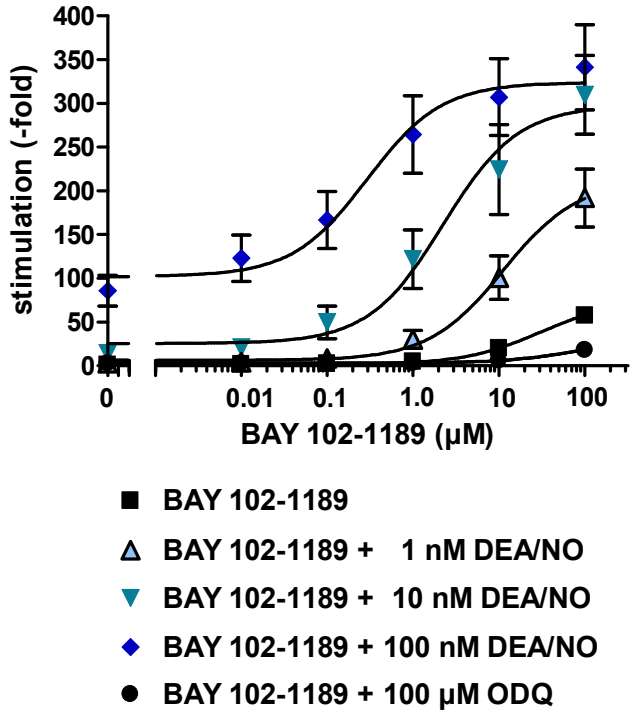
2.6.2.2.1.1 高度精製組換え sGC に対する作用

参照項目：4.2.1.1.1 PH-36490

sGC による cGMP 産生に対するベルイシグアト及び NO の影響、並びに sGC 阻害薬 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one（ODQ）の影響について検討した。高度に精製した組換え sGC（sGC 遺伝子組込みバキュロウイルス感染 Sf9 細胞から精製）を被験物質の存在下でα-[^{32}P]グアノシン三リン酸（GTP）とともにインキュベートし、[^{32}P]cGMP の生成を指標として被験物質の sGC 刺激作用を評価した。測定は Duplicate 測定を 6～10 回繰り返した。刺激作用はベースラインの活性に対する比（倍率）で表した。ベルイシグアト及び NO-供与体であるジエチルアミン/NO 複合体（DEA/NO）のそれぞれ単独又は併用した場合の sGC 刺激作用、並びに ODQ の阻害作用について検討した。

ベルイシグアト（0.01～100μM）は、組換え sGC による cGMP 産生を濃度依存的に刺激し、1.7～57.6 倍増加させた（図 2.6.2.2- 1）。ベルイシグアト及び DEA/NO を併用すると、広範な濃度範囲でそれぞれの単独効果の和を上回る効果が認められ、ベルイシグアト及び DEA/NO の最高濃度（それぞれ 100μM と 0.1 μM）における sGC の活性はベースラインの 341.6 倍に達した。ベルイシグアトによる sGC 刺激作用は、ODQ により抑制された（最大はベースラインの 18 倍）。

図 2.6.2.2- 1　　高度精製 sGC に対するベルイシグアト及び NO の刺激作用と ODQ の阻害作用



The data presented means±SEM from 5-10 independent experiments performed in duplicate.
BAY 102-1189=vericiguat
Source:PH-36490

2.6.2.2.1.2　GTP 消費測定による sGC 刺激アッセイ

参照項目：4.2.1.1.2 PH-36740

sGC（sGC 過剰発現細胞の細胞質画分から精製）に対するベルイシグアトの作用を検討するために、sGC を NO ドナーであるリンシドミン（SIN-1）及び被験物資（ベルイシグアト）存在下でインキュベートし、GTP 消費量〔GTP からの cGMP とピロリン酸（PPi）の生成〕を sGC 活性の指標として、生成される PPi をルミノメトリーで経時的に測定した。酵素活性は発光シグナル強度に正比例する。異なる濃度（0.001～10μM）の被験物質の存在下で酵素反応速度を測定し、被験物質の sGC 刺激作用を検討した。酵素反応速度をベースラインの 2 倍に増加させる被験物質濃度を、最小有効濃度（MEC）とした。

本 sGC 刺激アッセイにおいて、ベルイシグアトは濃度依存的に sGC を刺激し、その MEC は 120nM であった。

2.6.2.2.1.3 sGC 過剰発現細胞に対する作用

参照項目： 4.2.1.1.3 PH-36199
4.2.1.1.4 PH-38991
4.2.1.1.6 PH-36559
4.2.1.1.7 PH-36570

ラット sGC を過剰発現する組換え CHO 細胞株を用いて、ベルイシグアトの sGC 刺激作用を検討した（4.2.1.1.3 PH-36199）。カルシウム感受性発光タンパク質エクオリン及び cyclic nucleotide-gated cation channel（CNGA2）をラット肺 sGC とともに発現させた CHO 細胞株（sGC レポーター細胞株）を用い、被験物質存在下で sGC 活性を、細胞内 cGMP の生成による CNGA2 活性化とそれに伴うカルシウム流入を、エクオリンの発光で検出することにより測定し、被験物質の sGC 刺激作用を検討した。ベルイシグアトは、sGC レポーター細胞株を濃度依存的に刺激し、EC_{50} 値は 1,005±145nM であった。NO ドナーの S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine（SNAP）の存在下（30 及び 100nM）では、ベルイシグアトの EC_{50} 値は低下し、それぞれ 39.0±5.1nM 及び 10.6±1.7nM となった。また、sGC レポーター細胞株を sGC 阻害薬である ODQ 10μM で 3 時間前処理すると、ベルイシグアトの作用が抑制された。更に、ベルイシグアトの刺激作用に対する SNAP（30 及び 100nM）の増強作用も、ODQ で前処理すると消失した。

前述のラット sGC を過剰発現する CHO 細胞株（sGC レポーター細胞株）を用いて、主要代謝物 M-1（BAY 1222707）の sGC 刺激作用についても同様に検討した（4.2.1.1.4 PH-38991）。BAY 1222707 は、検討濃度である 10μM で、sGC レポーター細胞株を刺激しなかった。したがって、M-1 は sGC に対して明らかな作用を有さないと考えられる。

受容体型グアニル酸シクラーゼである GC-A〔心房性ナトリウム利尿ペプチド（ANP）受容体／B 型ナトリウム利尿ペプチド（BNP）受容体〕及び GC-B〔C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）受容体〕に対するベルイシグアトの作用について、CNGA2 とエクオリンを発現させた CHO 細胞株にラット GC-A 又は GC-B を安定的に過剰発現させた GC-A（又は GC-B）レポーター細胞株を用いて検討した（GC-A；4.2.1.1.6 PH-36559、GC-B；4.2.1.1.7 PH-36570）。ベルイシグアトは、検討濃度 30μM まで、GC-A 及び GC-B レポーター細胞株に対して明らかな作用を示さなかった。したがって、ベルイシグアトの sGC に対する作用は特異的であることが確認された。

2.6.2.2.1.4 血管内皮細胞に対する作用

参照項目： 4.2.1.1.5 PH-39102

ブタ血管内皮細胞を用いて、細胞内 cGMP 濃度に及ぼすベルイシグアトの作用を検討した。培養したブタ肺動脈血管内皮細胞（PEC）を被験物質の存在下にピルビン酸（2mM）を含むリンガー溶液中でスーパーオキシドジスムターゼ（30U/mL）と 13 分間インキュベートし、氷冷エタノールを加えて反応を終了させた。凍結後、細胞を 500μL のアッセイバッファー中でホモジナイズして、アッセイバッファー中の cGMP 濃度をラジオイムノアッセイキット cGMP[^{125}I]で測定した。結果は、ウェル当たりの cGMP 量（fmol）及び対照（未処理 PEC 細胞）と比較した倍率として表した。

ベルイシグアト（0.001～10μM）は cGMP を濃度依存的に増加させた。この作用は、sGC 阻害薬の ODQ により完全に阻害された。精製 sGC で既に確認されているように（2.6.2.2.1.1）、内皮細胞においても、cGMP 産生に対するベルイシグアトの作用は、DEA/NO との併用でそれぞれの単独効果の和を上回る効果を示したことから、相乗効果が示唆された。sGC に対する相乗効果は、内皮機能障害を有する病態でのベルイシグアトの *in vivo* 作用において重要である可能性がある。

2.6.2.2.1.5 単離血管に対する作用

参照項目： 4.2.1.1.8 PH-36442

ウサギ（NZW）伏在動脈、ウサギ（NZW）大動脈及びイヌ（FBI-dog）大腿静脈を用いて、フェニレフリンで誘発した収縮に対するベルイシグアトの作用を検討した。Krebs-Henseleit 液を満たしたオーガンバスに各血管切片を 2～4g の張力を掛けて吊るし 3×10^{-8}～1×10^{-6}g/mL のフェニレフリンで複数回、収縮・ウォッシュアウトを繰り返した後、被験物質（ベルイシグアト最高 10^{-5}g/mL；23μM）を加え、フェニレフリンによる収縮を測定した。また、ブタ冠動脈を用いて、U46619（トロンボキサン様物質）で誘発した収縮に対するベルイシグアトの作用を同様に検討した。ベルイシグアトは DMSO に溶解して使用した。

ベルイシグアトは、ウサギ伏在動脈、ウサギ大動脈及びイヌ大腿静脈のフェニレフリン誘発収縮を濃度依存的に抑制し、IC_{50} 値はそれぞれ、798、692 及び 3,072nM であった。また、ベルイシグアトは、ブタ冠動脈に対する U 46619 誘発収縮も濃度依存的に抑制し、その IC_{50} 値は 956nM であった。

2.6.2.2.1.6 ランゲンドルフ灌流心における作用

参照項目： 4.2.1.1.9 PH-36473

ラットランゲンドルフ灌流心を用いて、ベルイシグアトの作用を検討した。Wistar ラットから心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流システムに接続して、Krebs-Henseleit 液を通し、冠動脈灌流圧を測定した。また、左室内に挿入した水を満たしたバルーンに接続した圧トランスデューサーを介して左室圧を測定した。圧トランスデューサーからのシグナルを増幅・解析して心拍数（HR）、左室圧最大一次微分値（+dP/dtmax）を算出した。ベルイシグアトは 10%DMSO/90%生理食塩液に溶解して使用した。

ラットランゲンドルフ灌流心において、ベルイシグアトは、10nM～10μM で濃度依存的に冠動脈灌流圧を低下させ、最高濃度で最大作用（約 30%）を示した。ベルイシグアトは最高濃度まで、ラットランゲンドルフ灌流心の HR、LVDP 及び+dP/dtmax に影響を及ぼさなかった。

2.6.2.2.1.7 ヒト血小板に対する作用

参照項目： 4.2.1.1.10 PH-36444

ヒト血小板を用いて、ベルイシグアトの sGC 刺激作用を血管拡張因子刺激リン酸化タンパク質（VASP）のリン酸化及び cGMP 濃度を指標とし、NO ドナー（SNP 及び DEA/NO）を比較対照として検討した。ヒト血小板を被験物質と 37℃で 3 分間インキュベート後、sGC 依存的 VASP のリン酸化（Ser239 及び Ser157）を Sodium dodecyl sulfate ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）－イムノブロッティング法を用いて、cGMP 濃度をラジオイムノアッセイキットを用いて、それぞれ測定した。

ベルイシグアト及び NO ドナー（SNP 及び DEA/NO）はいずれも濃度依存的に VASP の泳動をシフトさせたことから、被験物質の sGC 刺激作用による血小板 VASP のリン酸化が確認された。cGMP 濃度は、ベルイシグアト（10μM）で 16 倍増加し、SNP（30μM）で 5.3 倍、DEA/NO（0.3μM）で 9.3 倍増加した。

また、本作用が血小板機能に意義のある影響を及ぼすかを検討するため、ヒト血小板を用いて、ベルイシグアトの血小板凝集に及ぼす影響を検討した。ベルイシグアトは、ADP、TRAP-6、コ

ラーゲン又はトロンボキサンによって誘発された血小板凝集に対して、臨床的に意義のある影響を及ぼさなかった（2.6.2.3.1）。

2.6.2.2.1.8　硝酸耐性伏在動脈に対する作用

参照項目： 4.2.1.1.11 PH-36443

有機硝酸化合物を慢性投与すると血管に硝酸耐性が発現する。正常及び硝酸耐性ウサギから摘出した伏在動脈を用いてベルイシグアトの血管弛緩作用を検討した。ニトログリセリン（GTN）による血管弛緩の硝酸耐性を誘発するために、ウサギ（NZW）に硝酸イソソルビド（ISDN）150～250mg を 1 日 3 回 3～4 日間投与した。屠殺日に再度 ISDN を投与し、伏在動脈を摘出して、試験に使用した。血管収縮・弛緩作用は 2.6.2.2.1.5 と同様の方法で検討した。

GTN は、フェニレフリン誘発収縮を抑制し、その IC_{50} 値は対照（正常ウサギ）伏在動脈では 1.9nM、耐性（硝酸耐性ウサギ）伏在動脈では 9.6nM であったことから、硝酸を投与したウサギの血管における硝酸耐性が確認された。GTN とは異なり、ベルイシグアトは正常ウサギの伏在動脈と同様に硝酸耐性ウサギの伏在動脈に対してもフェニレフリン誘発収縮を抑制し、その IC_{50} 値はそれぞれ、5.6 及び 5.8nM であった。

2.6.2.2.2 *In vivo*試験

表 2.6.2.2- 2 ベルイシグアトの効力を裏付ける試験一覧 – *in vivo*

Title	Test system (including species)	Method of administration, vehicle formulation	Dosing information (dose, schedule)	Noteworthy findings	Module/ Report
Cardio-vascular effects	Anesthetized rats	IV bolus, Transcutol/ cremophor/PBS (10/10/80)	Vehicle, 0.03, 0.1, 0.3, and 1 mg/kg	Maximum BP-lowering effects of -16, -26, -31, and -62 mmHg, respectively	4.2.1.1.12 PH-39101
Cardio-vascular effects	Anaesthetized rats	Oral Transcutol/ cremophor/water (10/20/70)	Vehicle, 0.3, 1, 3, and 10 mg/kg	Maximum BP-lowering effects of -12, -33, -45, and -45 mmHg, respectively	4.2.1.1.13 PH-39266
Cardio-vascular effects	Conscious normotensive rats	Oral, Transcutol/ cremophor/water (10/20/70)	Vehicle, 0.3, 1, and 3 mg/kg	BP lowering by 15% (up to 20%) (1 and 3 mg/kg) associated with transient tachycardia; BP reduction plateaued for 10 hours after top dose	4.2.1.1.14 PH-36223
Cardio-vascular effects	Conscious SHR	Oral, Transcutol/ cremophor/water (10/20/70)	Vehicle, 0.03, 0.1, 0.3, 1, and 3 mg/kg	BP lowering by 15 - 30% (0.3 - 3 mg/kg) associated with transient tachycardia; BP reduction for at least 24 hours after top dose	4.2.1.1.15 PH-36290
Cardio-vascular effects (long-term treatment)	Conscious SHR	Oral, Transcutol/ cremophor/water (10/20/70)	Vehicle, 3, and 10 mg/kg once-daily for 12 days	Persistent decrease in MAP for 16 - 20 hours (3 mg/kg) and >24 hours (10 mg/kg) associated with transient tachycardia	4.2.1.1.16 PH-36245
Cardio-vascular effects	L-NAME treated renin transgenic rats (rat model of hypertension and heart failure)	Oral, Transcutol/ cremophor/water (10/20/70)	L-NAME in the drinking water; Vericiguat: vehicle, 3, and 10 mg/kg once-daily for 21 days	Significant decrease of mortality rates: Placebo: 75% 3 mg/kg; 33% 10 mg/kg; 7%	4.2.1.1.17 PH-39100
Cardio-vascular effects	Anesthetized dogs	IV bolus, Transcutol/NaCl (70/30)	Vehicle, 10, 30, 100, and 300 µg/kg	Decrease in mAoP, sLVP, LVEDP, CVP, and SVR and a moderate reflex increase in HR and +dP/dt; at 100 and 300 µg/kg, long lasting decrease in PAP; dose-dependent increase in CO, CBF, and SVO_2	4.2.1.1.18 PH-36460

Title	Test system (including species)	Method of administration, vehicle formulation	Dosing information (dose, schedule)	Noteworthy findings	Module/ Report
Cardio-vascular effects	Anesthetized dogs with autonomic blockade and induced acute pulmonary arterial hypertension	IV bolus, Transcutol/NaCl (70/30)	Vehicle, 10, 30, 100, and 300 μg/kg	Dose-dependent maximum initial decrease in mAoP by 5.2, 4.1, 6.6, 11.8, and 21.6%, respectively; dose-dependent decrease in sLVP and LVEDP; dose-dependent decrease in PAP (≥30 μg/kg)	4.2.1.1.19 PH-36437
Cardio-vascular effects	Anesthetized piglets with induced acute pulmonary arterial hypertension (continuous infusion of the thromboxane A2 analog U 46619)	IV bolus, Transcutol/NaCl (70/30)	Vehicle, 3, 10, 30, 100, and 300 μg/kg	Dose-dependent preferential decrease in PAP in contrast to a weaker reduction in BP and a concomitant increase in HR	4.2.1.1.20 PH-36743
Cardio-vascular effects	Conscious dogs with rapid-pacing-induced heart failure and pulmonary hypertension	Oral, ethanol/PEG 400/ water (10/40/50)	Vehicle, 0.3, 1, and 3 mg/kg	Pronounced pressure-lowering effect on the pulmonary artery side with balanced reduction of afterload	4.2.1.1.21 PH-36757
Antifibrotic effects	Mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis	Oral, 0.5% aqueous Tylose	Vehicle, 0.3, 1, and 3 mg/kg	Reduced dermal thickening, decreased number of α-SMA positive myofibroblasts, deceased hydroxyproline content of the skin	4.2.1.1.22 PH-37810

BP	blood pressure	sLVP	systolic left ventricular pressure
CBF	coronary blood flow	SBP	systolic blood pressure
CO	cardiac output	SHR	spontaneously hypertensive rats
Cremophor	polyethoxylated castor oil	SMA	smooth muscle actin
CVP	central venous pressure	SVO_2	oxygen saturation in the coronary sinus
HR	heart rate	SVR	systemic vascular resistance
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester (NO synthase inhibitor)	Transcutol	diethylene glycol monoethyl ether
		Tylose	hydroethyl cellulose
LVEDP	left ventricular enddiastolic pressure	U 46619	9,11-dideoxy-9α,11α-methanoepoxy prostaglandin F2α (thromboxane A2 analog)
MAP	mean arterial blood pressure		
mAoP	mean aortic blood pressure		
PAP	pulmonary artery pressure	+dP/dt	first derivative of ventricular pressure (left ventricular contractility)
PEG	polyethylene glycol		

2.6.2.2.2.1　麻酔正常ラットにおける作用

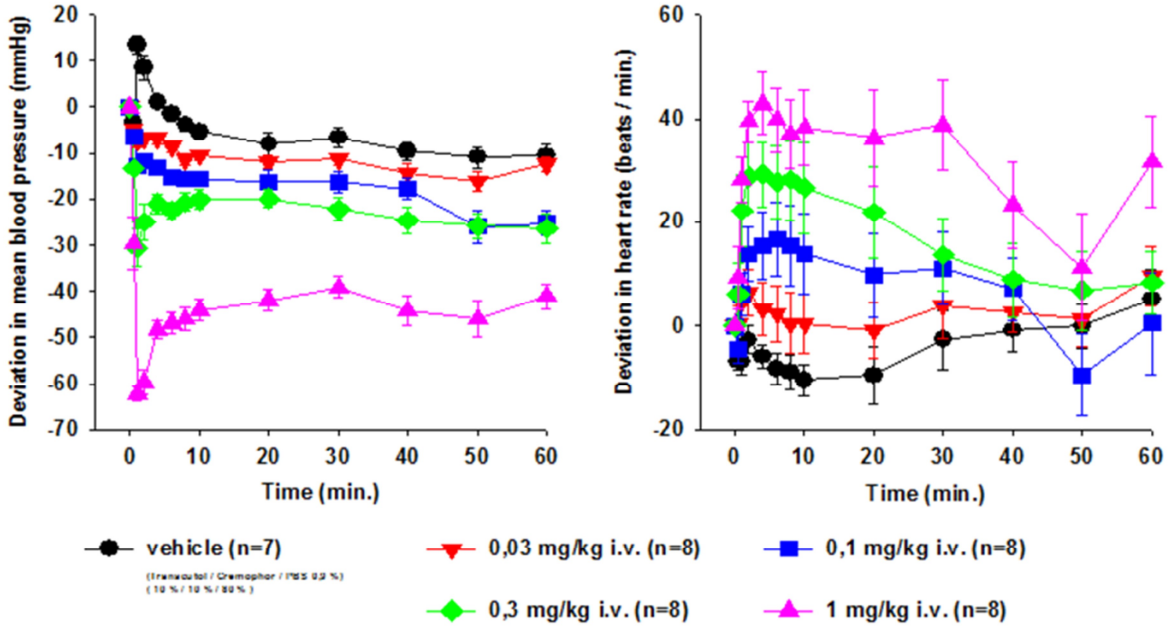
参照項目：　4.2.1.1.13 PH-39266
4.2.1.1.12 PH-39101

麻酔下のラット（雄性 Wistar、各群 7～8 例）にベルイシグアトを 0.3、1、3 及び 10mg/kg 単回経口投与又は 0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg 急速静脈内投与し、大腿動脈に挿入したカテーテルを介して血行動態パラメータ（動脈圧、心拍数）を測定し、ベルイシグアトの血行動態に及ぼす作用を検討した。溶媒として、経口投与は Transcutol/cremophor/water（10/20/70）、静脈内投与は Transcutol/cremophor/PBS（10/10/80）を用いた。

ベルイシグアトの経口投与により、用量依存的かつ持続的に動脈圧が低下し、0.3、1、3 及び 10mg/kg の投与で動脈圧はそれぞれ、ベースラインから最大-12、-33、-45 及び-45mmHg 低下した（4.2.1.1.13 PH-39266）。また、心拍数の増加が高用量で認められた。ベルイシグアトの降圧作用は、経口投与後 50～60 分までに最大となった。

ベルイシグアト 0.03、0.1、0.3 及び 1mg/kg の急速静脈内投与でも動脈圧の低下が認められ、それぞれ、ベースラインから最大-16、-26、-31 及び-62mmHg 低下した（図 2.6.2.2- 2）（4.2.1.1.12 PH-39101）。経口投与時と同様に心拍数の増加が高用量で認められた。ベルイシグアトの降圧作用は、静脈内投与では投与後 1 分以内に最大となった。

図 2.6.2.2- 2　　麻酔下のラットにおける血圧、心拍数に対するベルイシグアト急速静脈内投与の作用



Mean ± SEM
Source: PH-39101

2.6.2.2.2.2　覚醒正常ラットにおける作用

参照項目：　4.2.1.1.14 PH-36223

テレメータを装着した覚醒下の正常血圧ラット（雌性 HSD CPB、各群 4～5 例）に、ベルイシグアトを 0.3、1 及び 3mg/kg 経口投与し、動脈圧及び心拍数の変化を測定した。変化率%は被験

物質投与前 2 時間の値からの変動として算出した。溶媒として Transcutol/cremophor/water（10/20/70）を用いた。

ベルイシグアトはラットの平均動脈圧を用量依存的及び持続的に低下させた。ベルイシグアト 0.3mg/kg では血圧にほとんど影響が認められなかったが、1 及び 3mg/kg では約 15%の血圧低下が認められ、投与後 1 時間以内に最大に達した。1mg/kg 投与時の最大作用は、その後 1 時間以内に減弱し、緩徐に消失したのに対し、3mg/kg 投与後の最大作用は、10 時間持続し、その後緩徐に消失した。降圧作用の消失までの全持続時間は 20 時間の範囲内であった。投与に伴う一過性の頻脈が、全ての用量で認められた。心拍数の純増加率は用量に伴い増大し、最大で 20%であった。頻脈は 10 時間以内に消失した。

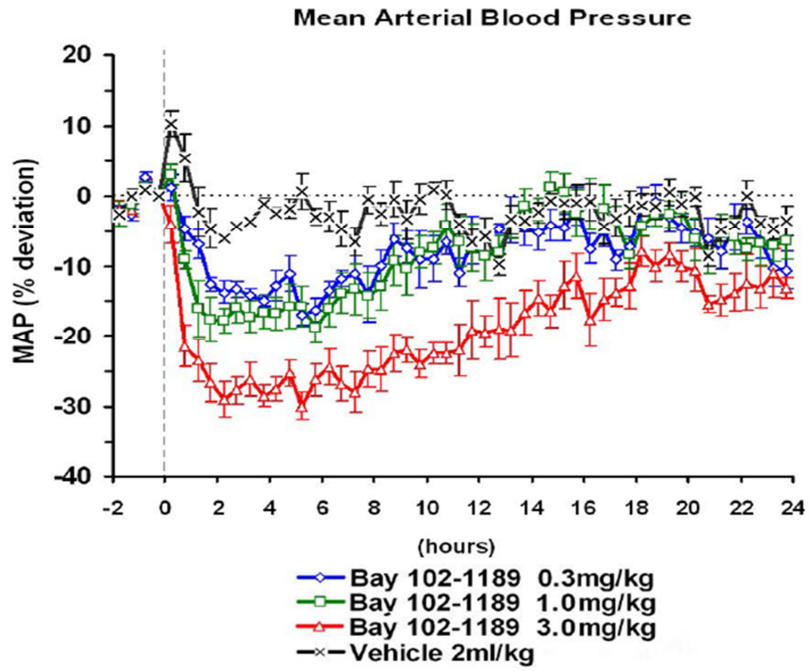
2.6.2.2.2.3　自然発症高血圧ラットにおけるベルイシグアト単回経口投与の作用

参照項目： 4.2.1.1.15 PH-36290

テレメータを装着した覚醒下の自然発症高血圧ラット（SHR）（雌性、各群 6 例）にベルイシグアト 0.03、0.1、0.3、1 及び 3mg/kg を単回経口投与したときの血行動態（動脈圧及び心拍数）への影響を、前項（2.6.2.2.2.2）と同様の方法で検討した。

SHR において、ベルイシグアトは平均動脈圧を用量依存的及び持続的に低下させた（図 2.6.2.2- 3、0.3～3mg/kg の図）。0.1mg/kg までは、動脈圧に対する明らかな影響は認められなかったが、0.3～3mg/kg では、用量依存的に動脈圧が 15%～30%低下し、投与後 2 時間以内に最大に達した。0.3 及び 1mg/kg 投与時の低下作用は、その後 4～6 時間持続した後、投与 12 時間後までに消失した。最高用量の 3mg/kg では、動脈圧の低下時間が延長し、24 時間以上継続した。投与に伴う一過性の頻脈が、全ての用量で認められた。心拍数は用量依存的に 15%～30%増加した。頻脈は 24 時間以内に消失した。

図 2.6.2.2- 3　　自然発症高血圧ラットの血圧に対するベルイシグアトの作用



Mean±SEM (n=6)
Source: PH-36290

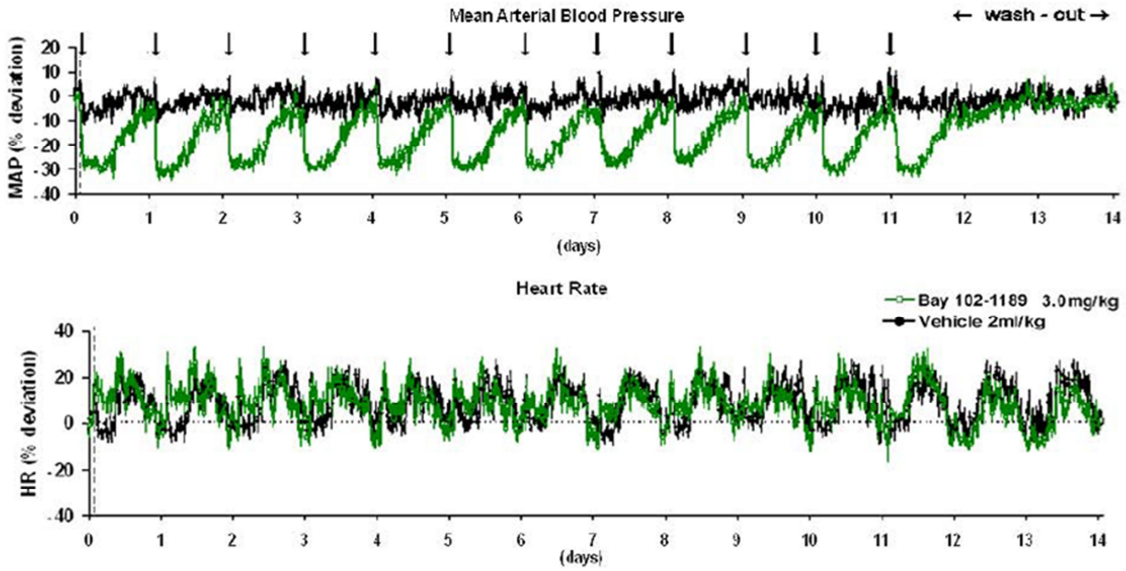
2.6.2.2.2.4　自然発症高血圧ラットにおけるベルイシグアト反復経口投与の作用

参照項目： 4.2.1.1.16 PH-36245

テレメータを装着した SHR（雌性、各群 6 例）にベルイシグアトを 3 及び 10mg/kg 1 日 1 回 12 日間経口投与し、その後 2 日間休薬した。その間の血行動態パラメータ（動脈圧、心拍数）をモニタリングした。溶媒として Transcutol/cremophor/water（10/20/70）を用いた。

ベルイシグアトは平均動脈圧を持続的に低下させ、各回の投与後には一過性の心拍数増加が認められた（図 2.6.2.2- 4、3mg/kg の図）。動脈圧低下作用は約 16～20 時間持続し、10mg/kg では持続時間が 24 時間を上回った。頻脈の程度も用量依存的であった。投与期間を通じて降圧作用が継続して認められた。投与を中止すると、血行動態作用はいずれも休薬 1 日目にほぼ消失した。

図 2.6.2.2- 4　　自然発症高血圧ラットの血圧及び心拍数に対するベルイシグアト 3mg/kg 反復経口投与の作用



Mean values of n=6 animals
Source: PH-36245

2.6.2.2.2.5　高血圧及び心不全ラットにおける作用

参照項目： 4.2.1.1.17 PH-39100

レニンーアンジオテンシン系の活性化による高血圧を呈するレニントランスジェニックラット〔TGR(mRenR2)27〕（雄性、各群開始時 15～20 例）に、NO 合成酵素阻害薬 NG-nitro-L-arginine methyl ester（L-NAME）を飲水投与（50mg/L）し、内皮機能低下及び低 NO 産生の状態にして、高血圧及び心不全のモデル動物を作製した。この病態モデルを用いて、血行動態パラメータ等に及ぼすベルイシグアト（3 及び 10mg/kg）1 日 1 回反復経口投与の影響を検討し、ベルイシグアトの sGC 刺激作用による心血管への影響を評価した。血圧は試験の開始前、7、14 及び 21 日目に tail-cuff 法で測定した。体重と生存を試験１、8、15 及び 22 日目（最終日）にモニタリン

グし、最終日に剖検を行い、心臓及び腎臓の臓器重量と血漿・尿パラメータを測定した。溶媒として、Transcutol/cremophor/water（10/20/70）を用いた。

レニントランスジェニックラットに L-NAME を投与すると、21 日間の観察期間中に収縮期血圧（平均値±標準誤差）が 164±8mmHg から 197±5mmHg に上昇した。ベルイシグアトを 3 及び 10mg/kg 1 日 1 回経口投与すると、収縮期血圧の上昇が抑制されたが、21 日間の観察期間中で完全な抑制には至らなかった。ベルイシグアト 10mg/kg 投与群の試験終了時の心臓の相対重量は、対照群に比べ有意に低かった。また、尿タンパク質排泄が有意に低下したことから、ベルイシグアトによる腎保護作用が示唆された。心不全に対する治療効果と関連する本動物モデルにおける重要な観察所見として、対照群では 20 例中 15 例が死亡（5 例生存）したのに対し、ベルイシグアト 3mg/kg 投与群では 15 例中 10 例、10mg/kg 投与群では 15 例中 14 例が生存した。

2.6.2.2.2.6　麻酔イヌにおける作用

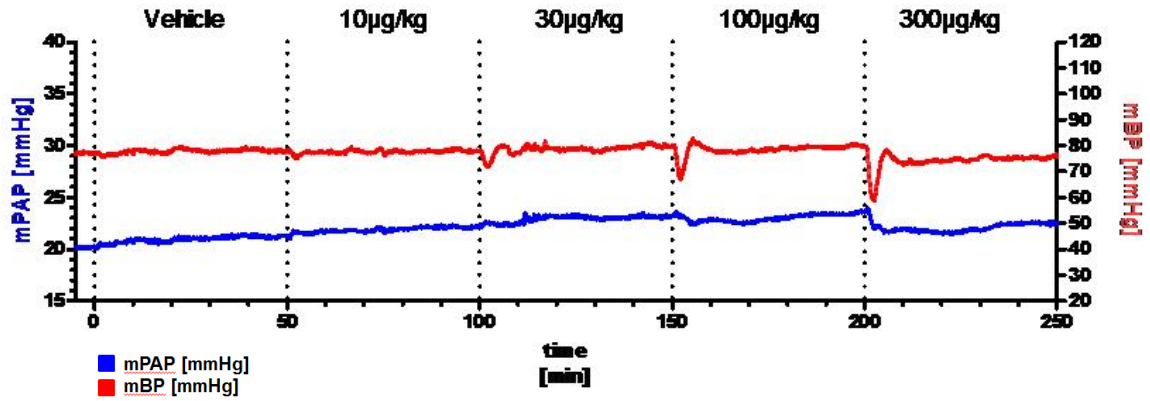
参照項目： 4.2.1.1.18 PH-36460

麻酔下のイヌ（雄性 Mongrel、各群 5 例）にベルイシグアト 10、30、100 及び 300μg/kg を急速静脈内投与し、血行動態に及ぼす作用を検討した。血行動態パラメータとして、動脈圧（AoP）、心電図（第Ⅱ誘導）、左室圧（LVP）、左室圧一次微分値（+dP/dt）、心拍数（HR）、肺動脈圧（PAP）、中心静脈圧（CVP）、心拍出量（CO）、冠血流量（CBF）、肺動脈の酸素分圧（$\%O_2$）、冠静脈洞血酸素飽和度（SVO_2）を測定し、全身血管抵抗（SVR）及び肺血管抵抗（PVR）を計算により算出した。この試験では、各動物にベルイシグアトの用量を累積的に漸増して急速静脈内投与した。溶媒として、Transcutol／生理食塩液（70/30）を用いた。比較対象として GTN 0.3、1 及び 3μg/kg を用量漸増的に急速静脈内投与した。

イヌにベルイシグアト（10、30、100 及び 300μg/kg）を累積的に漸増して急速静脈内投与すると、mAoP は用量依存的に低下し、投与直後にそれぞれ最大で 2.1%、3.4%、8.6%、17.0%及び 28.2%低下した（図 2.6.2.2- 5）。mAoP の低下に伴い、左室収縮期圧（sLVP）、左室拡張末期圧（LVEDP）、CVP 及び SVR が低下し、HR 及び左室の収縮力を示す+dP/dt の反射性増加が中程度に認められた。高用量（100 及び 300μg/kg）では PAP が持続的に低下した。また、ベルイシグアト投与により、CO、CBF 及び SVO_2 が用量依存的に増加し、心筋酸素バランスの改善が示唆された。ベルイシグアト静脈内投与の作用は速やかに発現し、2～3 分以内に最大に達した。心血管作用は数分間持続し、100 及び 300μg/kg では全観察時間の 50 分間持続した。

ベルイシグアトは、NO ドナーの GTN と同様の血行動態プロファイルを示したが、GTN に比べ効果が長時間持続した。ベルイシグアトの PAP 及び CBF に対する作用は、CVP 及び HR に対する作用に比べより顕著であった。

図 2.6.2.2- 5　　麻酔下のイヌにおける血行動態に対するベルイシグアトの作用



mBP=mAoP
Source: PH-36460

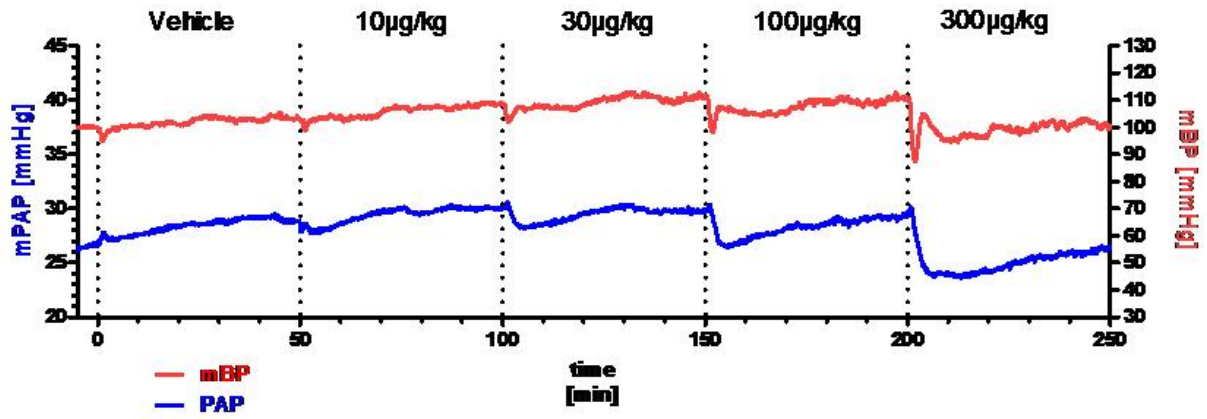
2.6.2.2.2.7　低酸素誘発急性肺高血圧イヌモデルにおける作用

参照項目： 4.2.1.1.19 PH-36437

低酸素誘発急性肺高血圧モデルにおいて、ベルイシグアトの血行動態パラメータに及ぼす心血管作用、特に体循環系及び肺循環系に対する血管弛緩作用を検討した。麻酔下のイヌ（雄性 Mongrel、各群 3 例）を低酸素下に置き、急性肺動脈性肺高血圧を誘発した。ベルイシグアトの用量を 10、30、100 及び 300μg/kg まで累積的に漸増して急速静脈内投与し、血行動態パラメータを測定した。溶媒として、Transcutol／生理食塩液（70/30）を用いた。反射性頻脈による影響を抑制するために、アトロピンとプロプラノロールの持続静注により自律神経を遮断した。血行動態パラメータとして、前項（2.6.2.2.2.6）と同様のパラメータを測定した。比較対象として GTN 0.3、1 及び 3μg/kg を用量漸増的に急速静脈内投与した。

ベルイシグアト（10、30、100 及び 300μg/kg）を急速静脈内投与すると、mAoP は用量依存的に低下し、投与直後にそれぞれ最大で 5.2%、4.1%、6.6%、11.8%及び 21.6%低下した（図 2.6.2.2- 6）。mAoP の低下に伴い、sLVP 及び LVEDP の用量依存的低下が認められた。自律神経が遮断されているため、高用量（100 及び 300μg/kg）においてのみ、HR のわずかな上昇が一過性に認められ、これに伴う+dP/dt の一過性の増加も認められた。30μg/kg 以上で溶媒対照群に比べ PAP 及び CVP の用量依存的な低下が認められた。また、用量依存的に CO を増加させ、同時に SVR 及び PVR を減少させ、SVO_2 を増加させた。ベルイシグアトの作用は急速に発現し、2～3 分以内に最大に達した。心血管作用は全観察時間の 50 分間持続した。

図 2.6.2.2- 6　　麻酔下の低酸素誘発急性肺高血圧イヌモデルにおけるベルイシグアトの作用



mBP=mAoP
Source: PH-36437

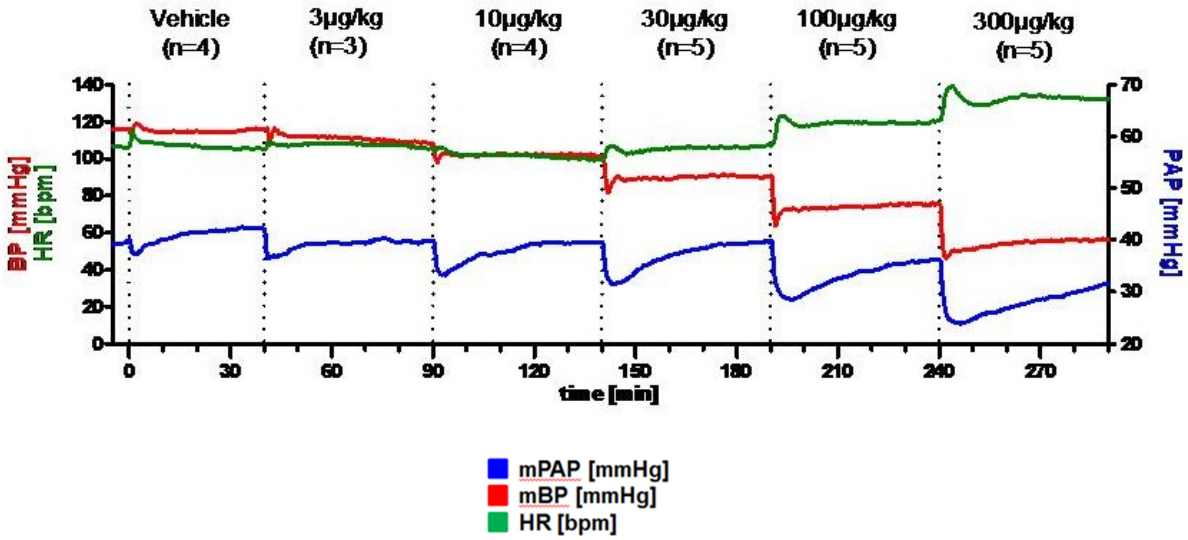
2.6.2.2.2.8　トロンボキサン誘発急性肺高血圧ブタモデルにおける作用

参照項目： 4.2.1.1.20 PH-36743

麻酔下のミニブタ（雌性 Gottingen、各群 3～5 例）にトロンボキサン A2 アナログである U 46619（0.12～0.14μg/kg/分）を持続静脈内投与し、急性肺動脈性肺高血圧を誘発した。肺高血圧が安定的に 30 分間持続した後、ベルイシグアトの用量を 3、10、30、100 及び 300μg/kg まで累積的に漸増して急速静脈内投与し、血行動態に及ぼす作用を検討した。血行動態パラメータとして、BP、ECG、LVP、+dP/dt、HR、CVP 及び PAP を測定した。溶媒として Transcutol/生理食塩液（70/30）を用いた。

この確立された急性肺動脈性肺高血圧モデルにおいて、ベルイシグアトは用量依存的に PAP を低下させた。また、BP も低下させたが、これに伴う HR 上昇の程度は小さかった（図 2.6.2.2-7）。

図 2.6.2.2- 7　　麻酔下のトロンボキサン誘発急性肺高血圧ブタモデルにおける血行動態に対するベルイシグアトの作用



Source: PH-36743

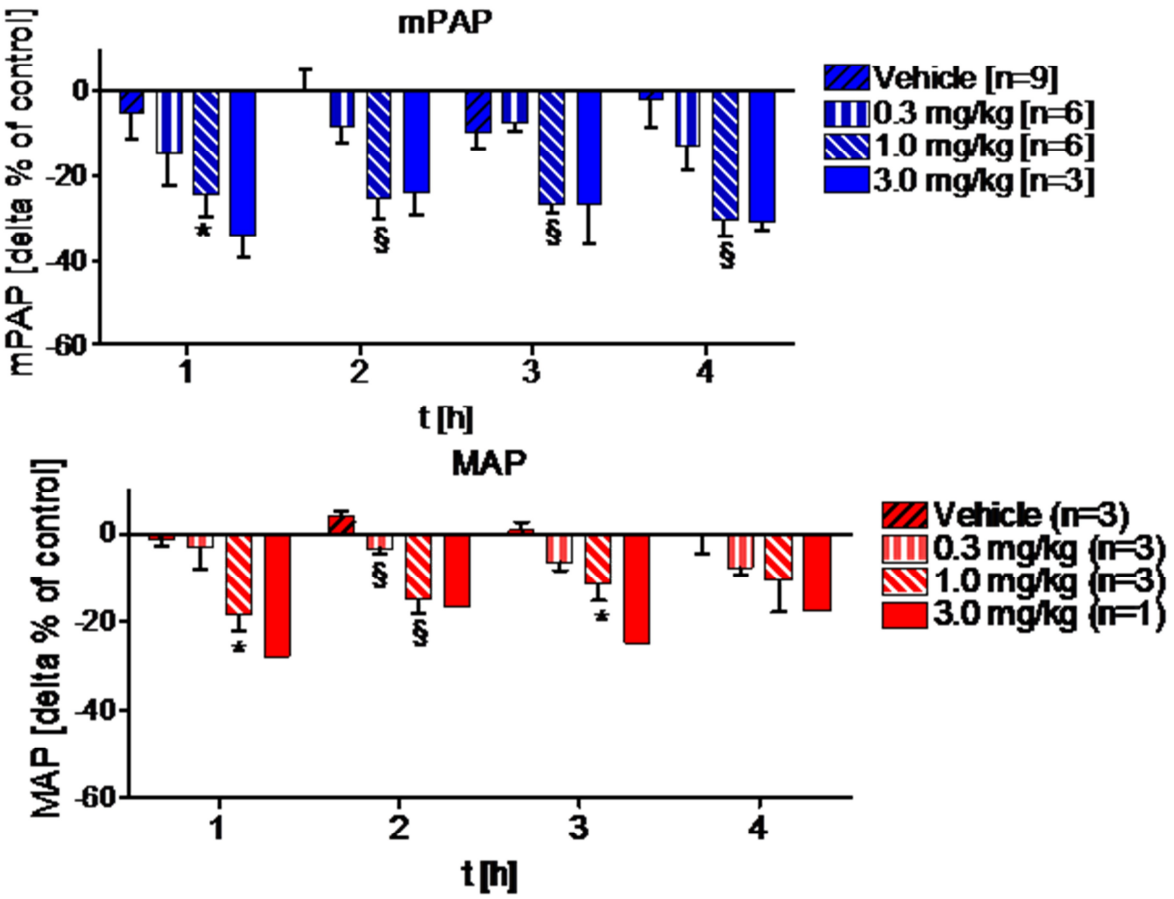
2.6.2.2.2.9　肺高血圧を有する頻回ペーシング心不全イヌモデルにおける作用

参照項目： 4.2.1.1.21 PH-36757

頻回ペーシングによる左室機能不全に伴う二次性肺高血圧（PH-LVD）を呈する心不全イヌモデルにおいて、ベルイシグアトの肺動脈圧及び全身血圧に及ぼす影響を覚醒下で検討した。イヌ（雄性 Mongrel、3 例の心不全イヌ）にステロイド溶出型ペースメーカー電極を植え込み、肩甲骨間部の小さな皮下ポケットに留置したペースメーカーに接続した。CardioMEMS 心不全センサーを心臓カテーテル法により挿入した。この高周波ワイヤレス圧センサーを植え込んだ状態で留置し、これを用いることで、鎮静又は侵襲的な血管アクセスを必要とせず、肺動脈圧（PAP）及び体循環血圧（頸動脈圧、MAP）を測定可能である。220 beats/分で 14 日間の右心室ペーシングを開始し、各血圧測定実施日の 1 回目測定前にペーサーを 1 時間停止した。溶媒〔エタノール／PEG／水（10/40/50）〕及びベルイシグアト（0.3、1 及び 3mg/kg）を各血圧測定日に約 4 時間ごとに漸増的に経口投与し、投与前及び投与後 1 時間ごと 4 時間まで、CardioMEMS システムを用いて血圧を測定した。その後ペーサーを再起動して、次回の測定まで 2～3 日間頻回ペーシングを継続し、同様の血圧測定を計 3 回繰り返した。なお、技術的問題及び嘔吐発生により、各群各測定の n 数は 1～9 であった。

結果を図 2.6.2.2- 8 に示す。この頻回ペーシングによる PH-LVD を伴う心不全モデルにおいて、ベルイシグアトは体循環血圧よりも肺動脈に対してより顕著な降圧作用を示したことから、後負荷をバランスよく減少させることが示唆された。

図 2.6.2.2- 8　　肺高血圧を有する頻回ペーシング心不全イヌモデルにおける肺動脈圧及び動脈圧に対するベルイシグアトの作用



＊ = p<0.05; § = p<0.01 (unpaired t-test vs vehicle)
Source: PH-36757

2.6.2.2.2.10　ブレオマイシン誘発皮膚線維化マウスモデルにおける作用

参照項目： 4.2.1.1.22 PH-37810

全身性強皮症の動物モデルであるブレオマイシン誘発局所的皮膚線維化マウスモデルを用いて、ベルイシグアトが線維化防止作用を有し、全身性強皮症に対する治療薬となり得る可能性についても検討した。マウス（DBA/2、各群 8 例）にブレオマイシンを 2 日に 1 回 3 週間皮下投与した。ブレオマイシン投与開始と同時にベルイシグアト（0.3、1 及び 3mg/kg）を 1 日 1 回反復経口投与した。溶媒として 0.5%タイロースを用いた。評価項目として、皮膚厚、筋線維芽細胞数〔平滑筋型αアクチン（α-SMA）陽性細胞数〕及び病変コラーゲン（ヒドロキシプロリン）含量を測定した。

ベルイシグアト 1 及び 3mg/kg の投与により、いずれの線維化指標においても低下が認められたことから、ベルイシグアトの経口投与によりブレオマイシン誘発皮膚線維化が一貫して防止されることが示された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 *In vitro* 試験

参照項目： 4.2.1.2.1 A60163
4.2.1.2.2 A60164
4.2.1.2.3 A60165
4.2.1.2.4 R-11955
4.2.1.2.5 PH-36472
4.2.1.2.6 PH-36737

放射性リガンド結合試験（標的数 68）（4.2.1.2.1 A60163 及び 4.2.1.2.2 A60164）及び酵素試験（標的数 42）（4.2.1.2.3 A60165）により、広範なオフターゲットに対するベルイシグアトの作用を検討し特異性を評価した。ベルイシグアトは、ヒトドパミントランスポーターを阻害（IC_{50}=2.9μM）したことを除き、10μM の濃度まで、オフターゲットに対する阻害作用（＞50%の阻害）は認められなかった。ヒトでの有効用量 10mg 1 日 1 回経口投与での定常状態血漿中非結合型最高濃度（MRHD 投与時 $C_{max,u}$）は 17.9nM〔7.6μg/L（2.6.6.9、2.7.2.3.1.6）から算出〕であることから、ベルイシグアトのドパミントランスポーター阻害は臨床的に問題にならないと考えられる。

ヒト主要代謝物 M-1（BAY 1222707）のオフターゲット作用を放射性リガンド結合試験及び酵素試験において検討した結果、検討した 77 種類のオフターゲットに対し、10μM の濃度まで阻害作用（＞50%の阻害）を示さなかった（4.2.1.2.4 R-11955）。

ベルイシグアトは 10μM までの濃度で、環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ（PDE1～PDE11）の活性に影響を及ぼさなかった（4.2.1.2.5 PH-36472）。

健康人から採取した多血小板血漿及び洗浄血小板を用いて、ベルイシグアト（0.3～100μM）の血小板凝集に及ぼす影響を検討した（4.2.1.2.6 PH-36737）。ベルイシグアトは、ADP、TRAP-6、コラーゲン又はトロンボキサンによって誘発された血小板凝集に対して抑制作用（IC_{50}：多血小板血漿で 18.9～＞100μM、洗浄血小板で 1.24～2.22μM）を示したものの、MRHD 投与時の $C_{max,u}$ を考慮すると臨床的に意義のある影響とは考えられなかった。

2.6.2.3.2 *In vivo* 試験

ベルイシグアトの *in vivo* の副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A（安全性薬理試験ガイドライン）及び ICH S7B〔ヒト用医薬品の心室再分極遅延（QT 間隔延長）の潜在的可能性に関する非臨床的評価〕に従い、ベルイシグアトの中枢神経系（神経行動学的評価を含む）、心血管系、呼吸器系及び胃腸管系に及ぼす影響を検討するため、安全性薬理試験を実施した（表 2.6.2.4- 1）。安全性薬理試験はすべて医薬品安全性試験実施基準（GLP）の原則に従い実施した。ラットを用いた呼吸器系に関する試験は [redacted] 社（Edinburgh、英国）で実施し、その他の安全性薬理試験は Bayer 社（Wuppertal、ドイツ）で実施した。

ベルイシグアトの臨床での有効用量（最高推奨臨床用量；MRHD）は 10mg/日経口投与であり、その定常状態 C_{max} は 350μg/L（非結合型 $C_{max,u}$ として 7.6μg/L 又は 17.9nM）である（2.6.6.9、2.7.2.3.1.6）。安全性薬理試験における単回経口投与後の血漿中 $C_{max,u}$ は、MRHD 投与時のヒトの $C_{max,u}$ に比べ、ラットで最高約 37 倍（2.6.2.4.2.1）、イヌで最高約 26 倍（2.6.2.4.2.3）であった。したがって、十分高い血漿中濃度が得られる用量で検討していると考えられる。

表 2.6.2.4- 1 ベルイシグアトの安全性薬理試験一覧

Report No. (GLP Status)	Study Title	Concentration or Dose Levels
In Vitro		
4.2.1.3.1 A51447 (GLP)	Effects on the hERG K^+ current in Stably Transfected HEK293 Cells	0, 0.1, 1, 10 μM
In Vivo		
4.2.1.3.2 A51506 (GLP)	Effect of a Single Oral Administration on CNS Function (Behavior, Locomotor Activity, Body Temperature) of Rats (with Drug Plasma Concentrations)	0, 1.5, 5, 15 mg/kg
4.2.1.3.3 A52936 (GLP)	Effects of a Single Oral Administration on the Motor Coordination of Rats	0, 1.5, 5, 15 mg/kg
4.2.1.3.4 A51561 (GLP)	Effects of a Single Oral Administration on the Convulsive Threshold Dose of Pentylenetetrazole in Rats	0, 1.5, 5, 15 mg/kg
4.2.1.3.5 A53045 (GLP)	Measurement of Respiratory Parameters in Conscious Rats by Whole Body Plethysmography after Single Oral Administration	0, 1.5, 5, 15 mg/kg
4.2.1.3.6 A51489 (GLP)	Effects on Gastric Emptying and Intestinal Transit of $BaSO_4$ in Male Rats after Single Oral Administration	0, 1.5, 5, 15 mg/kg
4.2.1.3.7 A50538 (GLP)	Effects of a Single Oral Administration on Cardiovascular Function in Conscious, Telemetered Beagle Dogs (with Drug Plasma Concentrations)	0, 0.6, 2, 6 mg/kg

$BaSO_4$=barium sulfate; CNS=central nervous system; GLP=Good Laboratory Practice; HEK=human embryonic kidney; hERG=human ether-a-go-go related gene; ICH=International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; K^+=potassium ion.

2.6.2.4.1 *In vitro* 試験

2.6.2.4.1.1 hERG 電流に対する影響

参照項目： 4.2.1.3.1 A51447

ヒト胎児腎細胞 HEK293 に発現させた hERG カリウム（K+）チャンネルに対するベルイシグアトの影響を検討するため、オーガンバス溶液（Tyrode）中にベルイシグアト（DMSO に溶解、最終 DMSO 濃度≦0.1%）を最終濃度 0、0.1、1 及び 10μM となるよう添加し、標準的なホールセルボルテージクランプ法を用いて hERG 介在性内向きテール電流を測定した。ベルイシグアトの影響を、添加前の対照値及び陽性対照 E-4031（1μM）の結果と比較した。

hERG K+チャンネルを安定的に発現する HEK293 細胞をベルイシグアトに曝露すると、濃度依存的に hERG 介在性テール電流の振幅が抑制された。ベルイシグアトによる影響の閾値濃度（IC_{20}）は 1.9μM、50%阻害濃度（IC_{50}）は 9.9μM であった。陽性対照の E-4031 は、hERG 介在性テール電流の振幅を添加前の対照値の 10%未満に低下させた。

2.6.2.4.2 *In vivo* 試験

2.6.2.4.2.1 ラットの中枢神経系に及ぼす影響

2.6.2.4.2.1.1 ラットにおける行動、自発運動及び体温

参照項目： 4.2.1.3.2 A51506

ラット（雄性 Wistar、各群 6 例）にベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を単回経口投与したときの中枢神経系（CNS）機能（行動、自発運動及び体温）に及ぼす影響を検討した。溶媒対照群にはエタノール／Solutol HS15／水（10/40/50）を投与した。また、サテライト群の雄性ラット（各投与群 3 例）において、投与後 1、4、6 及び 24 時間後の血漿中濃度を測定した。

行動：1.5 及び 5mg/kg 群では、ベルイシグアトによる明らかな行動異常は認められなかった。溶媒が原因と考えられる軟便が認められ、また、中用量の 1 例で軽微な後肢開脚が認められたが、その他には溶媒対照群との差は認められなかった。15mg/kg 群ではベルイシグアトによる以下の行動変化が 6 例中 1～3 例に認められた。眼瞼下垂（1 例）、軽微な後肢開脚（2 例）、緩徐な随意歩行（2 例）、活動性低下（2 例）、正向反射の軽微な遅延（3 例）。これらの所見の多くは投与後 4～6 時間に認められ、24 時間以内に完全に消失した。

自発運動：ベルイシグアトは、ラットのオープンフィールドの自発運動に影響を及ぼさなかった。体重／体重増加にも影響は認められなかった。

体温：高用量の 15mg/kg 群において、溶媒投与群と比べ統計学的に有意な（$p<0.05$）体温低下〔投与前値からの変化の比較で 0.7℃の差（6 時間）〕が認められた。

ベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を経口投与したときの平均血漿中最高濃度（C_{max}）は、それぞれ、350、1,040 及び 6,224μg/L〔$C_{max,u}$ として 15.9、47.3 及び 283.2μg/L、非結合型分率：4.55%（2.6.4.4.3）〕であった。ベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を投与したときの平均 t_{max} は、それぞれ 1.59、1.0 及び 2.52 時間であった。24 時間後の平均血漿中濃度は C_{max} の 18%（低用量）及び 7%（高用量）に低下した。

2.6.2.4.2.1.2 ラットにおける協調運動

参照項目： 4.2.1.3.3 A52936

ラット（雄性 Wistar、各群 12 例）にベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を単回経口投与した時の協調運動に及ぼす影響を検討した。溶媒対照群にはエタノール／Solutol HS15／水（10/40/50）を投与した。

ベルイシグアト投与約 4 時間後に加速回転 RotaRod 試験において落下までの潜時を評価した。ベルイシグアト 1.5～15mg/kg を経口投与後の加速回転 RotaRod 試験において、潜時に統計学的に有意な影響は認められなかった。したがって、ベルイシグアトは検討した用量範囲でラットの協調運動に影響を及ぼさないと考えられる。

2.6.2.4.2.1.3 ラットにおける化学物質誘発痙攣

参照項目： 4.2.1.3.4 A51561

ラット（雄性 Wistar、各群 7 例）に、ベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を単回経口投与した時の化学物質〔ペンチレンテトラゾール（PTZ）〕誘発痙攣の閾値に及ぼす影響を検討した。溶媒対照群にはエタノール／Solutol HS15／水（10/40/50）を投与した。

ラットにベルイシグアト 1.5, 5 及び 15mg/kg を単回経口投与しても、ペンチレンテトラゾール誘発痙攣に対する抑制作用は認められなかった。高用量群では PTZ の痙攣誘発用量が、他の 3 群よりもわずかに増加した。ベルイシグアトはラットの化学物質誘発痙攣閾値を上昇させたものの、高用量群（15mg/kg）でのわずかな変化であることから、生理学的な意義のない変化であると判断された。

2.6.2.4.2.2 ラットの呼吸機能に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.5 A53045

覚醒・非拘束下のラット（雄性 Wistar、各群 8 例）に、ベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を単回経口投与し、呼吸機能に及ぼす影響を全身プレチスモグラフィにより検討した。溶媒対照群にはエタノール／Solutol HS15／水（10/40/50）を投与した。追加の 1 群には陽性対照物質のバクロフェンを 15mg/kg 経口投与した。肺機能パラメータ（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）を投与後 5 時間記録した。

ラットにベルイシグアトを 1.5、5 及び 15mg/kg 単回経口投与しても、1 回換気量、呼吸数及び分時換気量に、ベルイシグアトと関連しないと判断された幾つかの時点での変化を除き、投与後 5 時間まで、いずれの時点においても有意な影響は認められなかった。バクロフェン投与後に認められた影響（1 回換気量増加、呼吸回数低下及び分時換気量増加）は、既知の結果と一致していたことから、この試験系は呼吸機能に対する薬剤の影響を検出するための十分な感度を有していたと考えられる。

2.6.2.4.2.3 テレメータ装着覚醒イヌの心血管系に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.7 A50538

テレメータを装着した覚醒下のイヌ（雌雄ビーグル、各群 4 例）にベルイシグアト 0.6、2 及び 6mg/kg を単回経口投与し、血圧、心拍数及び ECG に及ぼす影響を 16 時間モニターした。溶媒

対照群にはエタノール／PEG400（10/90）を投与した。血行動態パラメータとして、収縮期動脈圧、拡張期動脈圧及び心拍数を測定し、標準的な第Ⅱ誘導 ECG から、PQ、QRS 及び QT 間隔を求めた。Fridericia、Van de Water 及び Matsunaga の式を用いて QT 間隔を心拍数で補正（QTc）した。サテライト群（雌雄、各群 3 例）において、投与後 1、3、7 及び 24 時間後の血漿中濃度を測定した。

ベルイシグアトは平均動脈圧を用量依存的に低下させた（高用量群で収縮期血圧は最大 23%、拡張期血圧は最大 17%低下）。血圧低下は低用量の 0.6mg/kg でも認められ（収縮期血圧は最大 11%、拡張期血圧は最大 12%低下）、高用量 6mg/kg では 16 時間の観察時間中に完全に回復しなかった。血圧低下に対する反射的調節応答として心拍数が増加した（高用量群で最大 68%増加）と考えられる。心拍数の増加に従って、PQ 及び QT の短縮が認められた。心拍数で補正すると QTc 間隔は延長していなかった。体温に対するベルイシグアトの影響は認められなかった。

ベルイシグアト 0.6、2 及び 6mg/kg を単回経口投与したときの平均 C_{max} は、それぞれ 270、848 及び 1949 μg/L であった〔$C_{max,u}$ として、27.5、86.5 及び 198.8 μg/L、非結合型分率 10.2%（2.6.4.4.3）〕。ベルイシグアトを 0.6、2 及び 6mg/kg 投与したときの平均 t_{max} は、それぞれ 2.08、3.0 及び 3.0 時間であった。24 時間後の血漿中トラフ濃度は C_{max} の 10%未満であった。

2.6.2.4.2.4　ラットの胃内容排出及び腸管排出に及ぼす影響

参照項目： 4.2.1.3.6 A51489

ラット（雄性 Wistar、各群 6 例）にベルイシグアト 1.5、5 及び 15mg/kg を単回経口投与したときの硫酸バリウム（$BaSO_4$）の胃内容排出及び腸管排出に及ぼす影響を検討した。溶媒として 0.5%タイロースを用いた。$BaSO_4$ 懸濁液は、ベルイシグアト又は溶媒投与後約 4 時間に経口投与した。その 30 分後に動物を屠殺し、小腸の硫酸バリウムで覆われた長さ、並びに胃内容の重量を測定し、それぞれ小腸通過（腸管排出）及び胃からの排出（胃内容排出）の指標とした。

ベルイシグアトは、ラット小腸における $BaSO_4$ 排出を用量依存的に抑制し、中用量（5mg/kg）及び高用量（15mg/kg）では有意差が認められたことから、検討した用量の範囲においてベルイシグアトは小腸通過を抑制すると判断された。胃内容排出についてはベルイシグアトによる用量依存的な影響は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

2.6.2.5.1 麻酔ラットにおけるベルイシグアトとニトログリセリンとの相互作用

参照項目： 4.2.1.4.1 PH-39099

NO ドナーである GTN と併用したときのベルイシグアトの血圧に及ぼす影響について検討するために、麻酔下のラット（雄性 Wistar、各群 5～6 例）にベルイシグアト（3 及び 30μg/kg/分で持続静脈内投与）を単独又は GTN と併用投与した。GTN（10μg/kg）は、ベルイシグアト又は溶媒投与開始前 10 分、並びに投与開始後 10 及び 20 分に急速静脈内投与した。溶媒として、Transcutol/cremophor/PBS（10/10/80）を用いた。

ベルイシグアト投与により、血圧は用量依存的に低下した。低用量及び高用量のベルイシグアト持続静脈内投与開始 10 及び 20 分後に GTN を急速静脈内投与しても、ベルイシグアト及び GTN の単独投与時と比べて相加効果を超える血圧低下作用は認められなかった。

2.6.2.5.2 テレメータ装着自然発症高血圧ラットにおけるサクビトリル及びバルサルタンとベルイシグアトとの相互作用

参照項目： 4.2.1.4.2 PH-38881

テレメータを装着した覚醒下の自然発症高血圧ラット（雌性 SHR、各群 5～6 例）において、中性エンドペプチダーゼ（NEP）阻害薬であるサクビトリル（AHU377）とアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬（ARB）であるバルサルタンの併用が、ベルイシグアト投与後の血圧及び心拍数に及ぼす影響を検討した。溶媒として、Transcutol/cremophor/水（10/20/70）を用いた。ベルイシグアト（0.1 又は 0.3mg/kg）は単回経口投与した。サクビトリル（30mg/kg）及びバルサルタン（10mg/kg）はベルイシグアトと同時に経口投与した。血圧及び心拍数の記録は、薬剤投与前 2 時間から開始し、24 時間サイクル完了後に終了した。

サクビトリル及びバルサルタンに加えてベルイシグアト（0.1mg/kg；無作用量）を投与しても、血圧及び心拍数に対する相乗効果は認められなかった。サクビトリル及びバルサルタンにベルイシグアト 0.3mg/kg を投与すると、血圧の低下及び心拍数の上昇に相加効果が認められたが、相加効果を超える効果は認められなかった。

2.6.2.5.3 テレメータ装着イヌにおけるニトログリセリンとベルイシグアトとの相互作用

参照項目： 4.2.1.4.3 PH-38604

テレメータを装着した覚醒下のイヌにおいて、GTN とベルイシグアトの併用による心血管作用（血圧、心拍数及び ECG）に及ぼす影響を検討した。テレメータを装着したイヌ（雌雄ビーグル、各群 6 例）に、ベルイシグアトを 0mg/kg（溶媒）、0.6 及び 2mg/kg 単回経口投与し、その 1.5 及び 6 時間後に GTN 0.5mg/kg をそれぞれ経口投与した。ベルイシグアト投与後の血行動態パラメータ（心拍数、収縮期動脈圧及び拡張期動脈圧）、ECG 間隔（PQ、QRS 及び QT/QTc）並びに体温及び自発運動を、24 時間モニターした。試験にはイヌ 6 例を用い、クロスオーバー投与デザインにより、6 用量群〔溶媒対照、ベルイシグアト単独；0.6 及び 2mg/kg、GTN 単独；0.5mg/kg（2 回）、併用投与；ベルイシグアト 0.6mg/kg＋GTN 0.5mg/kg（2 回）、ベルイシグアト 2mg/kg＋GTN 0.5mg/kg（2 回）〕について検討した。溶媒として、エタノール／PEG400（10/90）及び 0.5%グルコースを用いた。

ベルイシグアト単剤経口投与（0.6 及び 2mg/kg）により収縮期血圧がそれぞれ最大 11%及び 19%低下し、心拍数がそれぞれ最大 26%及び 54%増加した。GTN 単剤経口投与（0.5mg/kg を 2 回）では、収縮期血圧が約 10%低下したが、心拍数には影響はなかった。ベルイシグアト（0.6 又は 2mg/kg）に GTN（0.5mg/kg を 2 回）を併用投与すると、心拍数に付加的な影響はなく、収縮期血圧に相加的な減少がみられた。GTN 単剤又は GTN 及びベルイシグアト併用投与で、拡張期血圧及び心電図には明らかな影響は認められなかった。体温及び自発運動に影響は認められなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

効力を裏付ける試験

新規の sGC 刺激薬であるベルイシグアトは、選択的かつ特異的に sGC と結合し、濃度依存的に cGMP の産生を増強する。ベルイシグアトの薬理学的プロファイルを、種々の動物種における血行動態試験及び心不全モデル等の心血管疾患モデル試験を含む *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験により評価し、sGC 刺激薬であるベルイシグアトが慢性心不全に対する新規治療薬となり得る可能性を検討した。

In vitro において、ベルイシグアトは sGC を刺激し、cGMP 産生を増加させた。ベルイシグアトは NO 非依存的に cGMP を増加させるが、NO 供与体との併用で、それぞれの単独効果の和を上回る効果を示したことから相乗効果が示唆され、類薬の知見等 [2)] も勘案すると、ベルイシグアトは低濃度の NO に対する sGC の感受性を高めると考えられた。一方、ヒト血漿中主要代謝物である M-1 は、sGC に対して明らかな作用を示さなかった。また、ベルイシグアトは、種々の動物種由来の血管を弛緩させ、硝酸耐性伏在動脈に対してもフェニレフリン誘発収縮を阻害した。

麻酔下のラットにベルイシグアトを単回経口投与（0.3～10mg/kg）又は単回急速静脈内投与（0.03～1mg/kg）すると、血圧が用量依存的かつ持続的に低下し、これは反射性の心拍数増加を伴った。覚醒下の自然発症高血圧ラット（SHR）においても、ベルイシグアトを経口投与（0.3～3mg/kg）すると、血圧が用量依存的かつ持続的に低下し、反射性の心拍数増加を伴った。

高血圧、心臓・腎臓損傷、心不全及び高死亡率を示すラットモデル（L-NAME 投与レニントランスジェニックラット）において、覚醒下でベルイシグアト（3 及び 10mg/kg 1 日 1 回）を経口投与すると、心臓の相対重量低下及び尿タンパク質排泄低下が認められ、ベルイシグアトによる心腎保護作用が示唆されるとともに、死亡率が低下した。

麻酔下のイヌにベルイシグアト（10～300μg/kg）を急速静脈内投与すると、mAoP が用量依存的に低下した。高用量（100 及び 300μg/kg）では、PAP が持続的に低下した。また、ベルイシグアトは CO、CBF 及び SVO_2 を用量依存的に増加させ、心筋酸素バランスを改善することが示された。

低酸素状態で肺高血圧を来したイヌに、麻酔下でベルイシグアト（10～300μg/kg）を急速静脈内投与すると、mAoP が用量依存的に低下したが、PAP 及び CVP の低下は 30μg/kg 以上で認められた。また、ベルイシグアトは CO を用量依存的に増加させ、並行して SVR 及び PVR を用量依存的に減少させたが、SVO_2 は増加した。

覚醒下の PH-LVD イヌモデルにおいて、ベルイシグアトは全身血圧よりも肺動脈に対して顕著な降圧作用を示し、後負荷をバランスよく減少させた。

以上のように、ベルイシグアトは *in vitro* において、強力かつ選択的な sGC 刺激薬であり、NO 非依存的に sGC を刺激するだけでなく、内因性の NO との相乗効果により cGMP の産生を増加させる可能性がある。内皮機能障害及び NO 利用能低下を伴う心不全の病態において、ベルイシグアトは直接的に sGC を刺激することに加え、低濃度の NO に対して sGC の感受性を高めて cGMP の産生を更に増加させることで血管を拡張させ、降圧作用などの血行動態の改善をもたらすと考えられる。この作用機序により、ベルイシグアトは心不全動物モデルである、L-NAME 投与レニントランスジェニックラットモデルでは、心肥大、並びに心機能及び腎機能低下を抑制して、死亡率を低下させ、また、頻回ペーシングイヌモデルでは、肺動脈圧を低下させ心臓の後負荷を減少させたと考えられる。ベルイシグアトはこのような作用機序及び薬理学的効果により、心血管

系に有益な効果をもたらすと考えられることから、慢性心不全に対する治療薬となることが期待される。

副次的薬理試験

広範なオフターゲット作用を探索する *in vitro* スクリーニング試験の結果、臨床的又は毒性学的に意味のある濃度において、検討した標的とベルイシグアト又はそのヒト主要代謝物 M-1 との相互作用は認められなかった。また、ベルイシグアトは、ADP、TRAP-6 及びコラーゲン誘発ヒト血小板凝集に対しても、*in vitro* で明らかな抗凝集作用を示さなかった。

安全性薬理試験

ラットの呼吸機能に対するベルイシグアトの作用を検討した試験において、ヒトの MRHD 投与時の $C_{max,u}$ である 7.6μg/L の約 37 倍に相当する高用量〔15mg/kg 投与時の $C_{max,u}$：283.2μg/L（2.6.2.4.2.1.1）〕を投与しても影響は認められなかった。

ラットの中枢神経系に及ぼすベルイシグアトの影響（行動、自発運動、体温、協調運動及び化学物質誘発痙攣）を検討した試験において、MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 6 倍に相当する中用量〔5mg/kg 投与時の $C_{max,u}$：47.3μg/L（2.6.2.4.2.1.1）〕で影響は認められなかった。約 37 倍に相当する高用量（15mg/kg）では、ラットに体温低下、活動性低下、歩行／姿勢異常が認められたが、自発運動、協調運動及び化学物質誘発痙攣に、生理学的に意味のある影響は認められなかった。体温低下は、オンターゲット作用による末梢／皮膚血管拡張の二次的な影響と考えられた[8)]。覚醒下の正常血圧ラットを用いた効力を裏付ける試験においても、低用量のベルイシグアト単回経口投与後に血圧低下を伴う血管拡張が認められている（2.6.2.2.2.2）。したがって、血管拡張及びそれに続く体温低下により、活動性低下又は歩行／姿勢異常などの行動に非特異的影響が認められた可能性がある。中枢神経系に対する安全性薬理試験において、歩行異常が認められた用量である 15mg/kg（MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 37 倍）で、協調運動及び化学物質誘発痙攣に対するベルイシグアトの影響は認められなかった。また、ベルイシグアトは P-gp の基質であり、ラットにおける脳移行性は低かった（2.6.4.4.1.1）。これらのことから、高曝露下で認められた散発的で可逆性の歩行異常所見は、ベルイシグアトの CNS に対する直接作用ではなく、過度の薬理作用に基づく血管拡張並びに血圧低下及び／又は体温低下による二次的な影響であると考えられる。更に、心不全患者の臨床試験において、有効用量で歩行に関する有害事象は認められていない（2.7.4.2.1）ことも、前述の所見は正常血圧ラットにおいて過度の薬理作用が発現する曝露量下でみられたものであり、臨床曝露量を考慮するとヒトで発現する可能性は低いことを支持している。

ラットにおいて、ベルイシグアトは MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 6 倍に相当する中用量で胃腸管運動を抑制した。これはベルイシグアトのオンターゲット作用である平滑筋弛緩作用による胃腸管弛緩に起因すると考えられる。MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 2 倍に相当する低用量〔1.5mg/kg 投与時の $C_{max,u}$：15.9μg/L（2.6.2.4.2.1.1）〕では、ラットの胃腸管運動に影響を及ぼさなかった。

テレメータを装着した覚醒イヌにおいて、ベルイシグアトの経口投与により動脈圧の持続的低下とそれに伴う心拍数増加等のオンターゲット作用による心血管作用が最低用量から認められたが、その $C_{max,u}$〔27.5μg/L（2.6.2.4.2.3）〕は MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 4 倍に相当した。QT 間隔延長のリスクを検討したイヌの心血管系試験において、ECG 測定で心拍数の増加に伴う PQ 及び QT の短縮が認められたが、最高用量まで QT/QTc 間隔延長の徴候は認められなかった。この時の $C_{max,u}$〔198.8μg/L（2.6.2.4.2.3）〕は MRHD 投与時 $C_{max,u}$ の約 26 倍に相当した。また、hERG 電流の IC_{20}（1.9 μM）及び IC_{50}（9.9μM）は、MRHD 投与時 $C_{max,u}$（17.9nM）のそれぞれ約 106 及び約 553 倍に相当した。したがって、ベルイシグアトに催不整脈作用はないと考えられる。

以上より、ベルイシグアトの安全性薬理試験において認められた影響は、sGC 刺激薬として予想される薬理作用機序に基づくもののみであり、ベルイシグアトの平滑筋弛緩作用による血管拡張及び胃腸管弛緩に起因するものであった。

薬力学的薬物相互作用

ラット及びイヌにおいて、ベルイシグアトと cGMP を増加させる他の薬剤との併用効果を検討した。ベルイシグアトを NO ドナーである GTN 又は NEP 阻害薬であるサクビトリル及び ARB であるバルサルタンと併用投与した。麻酔ラット及び覚醒ラットでそれぞれ併用投与したところ、血圧の低下及び心拍数の増加に相加効果が認められた。また、覚醒イヌで併用投与したところ、血圧低下の相加効果のみが認められ、心拍数に対する付加的な影響はみられなかった。また、相加効果を超える効果は認められなかった。

以上のように、ベルイシグアトの薬理学的プロファイルが一連の非臨床薬理試験から明らかにされた。これらの試験結果は、ベルイシグアトの推定作用機序と合致するものであり、慢性心不全に対する治療薬としてのベルイシグアトの製造販売承認申請を裏付けるものである。

2.6.2.7　図表

図表は本文中の適切な場所に記載した。

引用文献一覧

1) Stasch JP et al., Handb Exp Pharmacol 2009:191:277-308 (4.3.1)
2) Stasch JP et al., Circulation 2011:123:2263-2273 (4.3.2)
3) Sandner P et al., Handb Exp Pharmacol 2019:doi: 10.1007/164_2018_197 (4.3.3)
4) Gheorghiade M et al., Heart Fail Rev 2013:18:123-134 (4.3.59)
5) Marti CN et al., J Am Coll Cardiol 2012:60:1455–1469 (4.3.60)
6) Michalak M et al., Circ Heart Fail 2018:11:e004813 (4.3.61)
7) Wobst J et al., Nitric Oxide 2018:76:105-112 (4.3.62)
8) Redfern WS et al., J Pharmacol Toxicol Methods 2005:52:77-82 (4.3.4)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Primary Pharmacodynamics – In Vitro					
[redacted]BAY 1021189: Stimulation of the purified soluble guanylate cyclase, [redacted]-20[redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36490	4.2.1.1.1
[redacted]BAY 1021189: Stimulation of sGC enzyme activity (in vitro test applying a luminometric GTP consumption assay), [redacted]-20[redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36740	4.2.1.1.2
[redacted]Effects of BAY 1021189 on the soluble guanylate cyclase reporter cell line, [redacted]-20[redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36199	4.2.1.1.3
[redacted]Effects of BAY 1222707 on the soluble guanylate cyclase reporter cell line; [redacted]-20[redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-38991	4.2.1.1.4
[redacted]BAY 1021189: Stimulation of the porcine pulmonary artery endothelial cells (PEC), [redacted]-20[redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-39102	4.2.1.1.5

BAY 1021189=vericiguat; GTP=guanosine triphosphate; N/A=not applicable; PEC=pulmonary endothelial cells; sGC=soluble guanylate cyclase.

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Primary Pharmacodynamics – In Vitro					
[redacted]Effects of BAY 1021189 on the receptor guanylyl cyclase GC-A measured in a recombinant reporter cell line, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36559	4.2.1.1.6
[redacted] Effects of BAY 1021189 on the Receptor Guanylyl Cyclase GC-B measured in a Recombinant Reporter Cell Line, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36570	4.2.1.1.7
[redacted]Vasorelaxant effect of BAY 1021189 on isolated rings of rabbit saphenous artery, rabbit aorta, canine femoral vein and porcine coronary artery, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36442	4.2.1.1.8
[redacted] Effects of BAY 1021189 on isolated Langendorff-perfused rat heart, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36473	4.2.1.1.9
[redacted]The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP): Mediator of BAY 1021189 and nitric oxide effects in human platelets, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36444	4.2.1.1.10
[redacted]Effect of BAY 1021189 on nitrate-tolerant rabbit saphenous artery, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36443	4.2.1.1.11

BAY 1021189=vericiguat; GC-A=guanylyl cyclase receptor A; GC-B=guanylyl cyclase receptor B; N/A=not applicable; VASP=vasodilator-stimulated phosphoprotein

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Primary Pharmacodynamics – In Vivo					
[redacted]Effects of BAY 1021189 on blood-pressure in anaesthetized rats, [redacted]	Rat, anesthetized	IV	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-39101	4.2.1.1.12
[redacted] Effects of BAY 1021189 on blood pressure in anaesthetized rats, [redacted]	Rat, anesthetized	IV; oral	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-39266	4.2.1.1.13
[redacted]BAY 1021189: Influence of single oral administrations on blood pressure and heart rate of conscious rats, [redacted]	Rat, conscious	Oral, single administration	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36223	4.2.1.1.14
[redacted]BAY 1021189: Influence of single oral administrations on blood pressure and heart rate in conscious rats with spontaneous hypertension (SHR), [redacted]	Rat, conscious, spontaneous hypertension	Oral, single administration	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36290	4.2.1.1.15

BAY 1021189=vericiguat; IV=intravenous; SHR=spontaneous hypertensive rats

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Primary Pharmacodynamics – In Vivo					
[redacted]BAY 1021189: Influence of 12 consecutive once daily oral administrations on blood pressure and heart rate of conscious rats with spontaneous hypertension (SHR), [redacted]	Rat, conscious	Oral, once daily, x12	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36245	4.2.1.1.16
[redacted]Long-term effects of BAY 1021189 in a high renin low NO rat model, [redacted]	Rat, hypertensive, low NO model	Oral	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-39100	4.2.1.1.17
[redacted]Cardiovascular effects of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 1021189 after intravenous bolus injections in anesthetized dogs, [redacted]	Dog, anesthetized	IV	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36460	4.2.1.1.18

BAY 1021189=vericiguat; IV=intravenous; NO=nitric oxide; SHR=spontaneous hypertensive rats

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Primary Pharmacodynamics – In Vivo					
[redacted]Cardiovascular effects of the soluble guanylate cyclase stimulator BAY 1021189 after intravenous bolus injections in acute hypoxic anaesthetized dogs under autonomic blockade, [redacted]	Dog, anesthetized, acute hypoxic	IV	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36437	4.2.1.1.19
[redacted]Effects of the sGC-Stimulators BAY 1021189 and BAY 60 4552 on hemodynamic parameters in acute pulmonary hypertension in anaesthetized piglets, [redacted]	Pig, anesthetized, acute pulmonary hypertension model	IV	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36743	4.2.1.1.20
[redacted]Effects of BAY 1021189 on blood pressure in the pulmonary artery and systemic arterial of conscious dogs with heart failure due to tachypacing and secondary pulmonary hypertension (telemonitored dogs), [redacted]	Dog, conscious, heart failure model	Oral	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36757	4.2.1.1.21
[redacted]Effects of sGC stimulators in the bleomycin-induced skin fibrosis model in mice -Prevention of skin fibrosis, [redacted]	Mouse, skin fibrosis model	Oral, once daily x 21	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-37810	4.2.1.1.22

BAY 1021189=vericiguat; BID=twice daily; IV=intravenous sGC=soluble guanylate cyclase

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Secondary Pharmacodynamics					
Off-target Screening: [redacted] Pharmacology Data Report on Compounds SCG-295, CHH64-2009 for Bayer Schering Pharma AG, [redacted]	*In vitro*	N/A	[redacted] Taiwan R.O.C.	A60163	4.2.1.2.1
Off-target Screening: [redacted] Pharmacology Data Report on Compounds SCG-295, CHH64-2009 for Bayer Schering Pharma AG, IC50 evaluation, [redacted]	*In vitro*	N/A	[redacted] Taiwan R.O.C.	A60164	4.2.1.2.2
Off-target Screening: [redacted] Pharmacology Data Report on Compounds SCG-295, CHH64-2009 for Bayer Schering Pharma AG, Adverse enzyme reaction, [redacted]	*In vitro*	N/A	[redacted] Taiwan R.O.C.	A60165	4.2.1.2.3

N/A=not applicable;

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Secondary Pharmacodynamics					
Off-target Screening: [redacted] Data Report for Pharmacology Services (Bayer SafetyScreen) on Compound CHH102-2017; [redacted]	*In vitro*	N/A	[redacted] Taiwan R.O.C.	R-11955	4.2.1.2.4
[redacted] Investigation of sGC stimulator BAY 1021189 in phosphodiesterase assays, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36472	4.2.1.2.5
[redacted] BAY 1021189: Inhibition of Human Platelet Aggregation in vitro, [redacted]	*In vitro*	N/A	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-36737	4.2.1.2.6

BAY 1021189=vericiguat; N/A=not applicable; sGC=soluble guanylate cyclase

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Safety Pharmacology					
hERG Assay: [redacted] Effects of BAY 1021189 on the hERG K^+ current in stably transfected HEK293 cells, [redacted]	hERG K^+ channels stably expressed in HEK293 cells	In vitro	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	A51447	4.2.1.3.1
CNS Function: [redacted] Effect of a single oral administration of BAY 1021189 on CNS function (behavior, locomotor activity, body temperature) of rats, and determination of drug plasma concentrations in satellite animals, [redacted]	Rat	Oral, single dose	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	A51506	4.2.1.3.2
CNS Function: [redacted] Effect of a single oral administration of BAY 1021189 on the motor coordination of rats, [redacted]	Rat	Oral, single dose	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	A52936	4.2.1.3.3
CNS Function: [redacted] Effects of a single oral administration of BAY 1021189 on the convulsive threshold dose of pentylenetetrazole in rats, [redacted]	Rat	Oral, single dose	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	A51561	4.2.1.3.4

BAY 1021189=vericiguat; CNS=central nervous system; hERG=human ether-a-go-go gene; K^+=potassium ion

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Safety Pharmacology					
Respiratory Function: [redacted]Measurement of Respiratory Parameters in Conscious Rats by Whole Body Plethysmography, [redacted]-20[redacted]	Rat	Oral, single dose	[redacted], United Kingdom	A53045	4.2.1.3.5
Gastrointestinal Function: [redacted]Effects of BAY 1021189 on gastric emptying and intestinal transit of $BaSO_4$ in male rats after single oral administration, [redacted]-20[redacted]	Rat	Oral, single dose	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	A51489	4.2.1.3.6
Cardiovascular Function: [redacted]Effects of a single oral administration of BAY 1021189 on cardiovascular function in conscious, telemetered Beagle dogs, [redacted]-20[redacted]	Dog	Oral, single dose	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	A50538	4.2.1.3.7

$BaSO_4$ =barium sulfate; BAY 1021189=vericiguat

Test Article: Vericiguat

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location
Pharmacodynamic Drug Interactions					
[redacted]Effects of bolus injections of glyceroltrinitrat (GTN) and concomitant infusion of BAY 1021189 on arterial blood pressure in anaesthetized rats, [redacted]-20[redacted]	Rat	IV	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-39099	4.2.1.4.1
[redacted]BAY 1021189 (vericiguat): Influence on blood pressure and heart rate of conscious spontaneously hypertensive rats on top of a double combination of NEP inhibitor AHU377 and ARB valsartan, [redacted]-20[redacted]	Rat	Oral, single daily doses	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-38881	4.2.1.4.2
[redacted]Effects of single oral administration of BAY 1021189 with additional oral administration of glyceryl trinitrate on cardiovascular function and ECG in conscious, telemetered dogs, [redacted]-20[redacted]	Dog	Oral, single dose	Bayer Pharma AG Wuppertal, Germany	PH-38604	4.2.1.4.3

BAY 1021189=vericiguat; ECG=electrocardiogram; GTN=glycerol trinitrate; NEP=neutral endopeptidase

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

詳細は、薬理試験：一覧表（2.6.3.1）及び効力を裏付ける試験（2.6.2.2）に記載した。

2.6.3.3 副次的薬理試験

詳細は、薬理試験：一覧表（2.6.3.1）及び副次的薬理試験（2.6.2.3）に記載した。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: **Vericiguat**

Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Admin-istration**	**Dose/Concen-tration Level**	**Gender and No.**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compli-ance**	**Report Number**
hERG voltage clamp assay	Stably transfected HEK293 cell line	*In vitro*	0, 0.1, 1, 10 µmol/L	N/A	Inhibition of the hERG-mediated tail current amplitude IC_{20}: 1.9 µmol/L IC_{50}: 9.9 µmol/L	Yes	4.2.1.3.1 A51447
CNS Function (behavior, locomotor activity, body temperature)	Rat/ Wistar	Oral, single dose	0, 1.5, 5, 15 mg/kg	Male, 6 per group	At all dose groups: no effects on locomotor activity in the open-field No relevant effects on behavior at 1.5 and 5 mg/kg. At 15 mg/kg: gait/posture abnormalities (ptosis, splayed hind limbs, and slow deliberate gait), hypoactivity, and minor delay of the righting reflex at 4 to 6 hours posttreatment; which completely resolved within 24 hours At 15 mg/kg: significant (p<0.05) decrease in body temperature between 1 and 6 hours after treatment	Yes	4.2.1.3.2 A51506

hERG=human ether-a-go-go gene; N/A=not applicable.

Test Article: Vericiguat

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin-istration	Dose/Concen-tration Level	Gender and No.	Noteworthy Findings	GLP Compli-ance	Report Number
CNS Function (Motor coordination)	Rat/ Wistar	Oral, single dose	0, 1.5, 5, 15 mg/kg	Male, 12 per group	No alteration of motor coordination	Yes	4.2.1.3.3 A52936
CNS Function (effects on convulsive threshold dose of pentylenetetra-zole)	Rat/ Wistar	Oral, single dose	0, 1.5, 5, 15 mg/kg	Male, 7 per group	No interference with pentylenetetrazole-induced convulsions	Yes	4.2.1.3.4 A51561
Respiratory Function (Whole Body Plethysmo-graphy)	Rat/ Wistar	Oral, single dose	0, 1.5, 5, 15 mg/kg Reference compound: 15 mg/kg baclofen	Male, 8 per group	No effects on tidal volume, respiration rate and minute volume at any of the time points tested up to 5 hours post-dose Effects following administration of baclofen (e.g. increase in tidal volume and minute volume, decrease in respiratory frequency) are consistent with its mode of action	Yes	4.2.1.3.5 A53045

CNS=central nervous system

Test Article: Vericiguat

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin-istration	Dose/Concen-tration Level	Gender and No.	Noteworthy Findings	GLP Compli-ance	Report Number
Gastrointestinal Function (Barium-sulfate propulsion test)	Wistar Rat	Oral, single dose	0, 1.5, 5, 15 mg/kg	Male, 6 per group	No significant effect at 1.5 mg/kg At 5 and 15 mg/kg significant (p<0.05) inhibition of intestinal transit Gastric emptying was not affected at all dose groups	Yes	4.2.1.3.6 A51489
Cardiovascular Function (blood pressure, heart rate, electrocardio-gram, body temperature)	Dog/ Beagle	Oral, single dose (Latin square treatment design)	0, 0.6, 2, 6 mg/kg	Male & female, 4 per group	At all dose groups: decrease in arterial blood pressure 0.6 mg/kg: DBP -12%; SBP -11% 2.0 mg/kg: DBP -16%; SBP -17% 6.0 mg/kg: DBP -17%; SBP -23% At all dose groups: increase in heart rate 0.6 mg/kg: +33% 2.0 mg/kg: +39% 6.0 mg/kg: +68% When corrected for heart rate, QTc intervals were not prolonged No effect on body temperature	Yes	4.2.1.3.7 A50538

DBP=diastolic blood pressure; SBP=systolic blood pressure

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

詳細は、薬理試験：一覧表（2.6.3.1）及び薬力学的薬物相互作用（2.6.2.5）に記載した。