

オラデオカプセル 150 mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

株式会社オーファンパシフィック

1 緒言

遺伝性血管性浮腫（HAE）は、遺伝によって接触系活性化経路の調節異常を発現する疾患である（Kaplan and Joseph 2014）。HAE は臨床的に、皮膚、咽頭、喉頭、消化管、生殖器、四肢の血管性浮腫の発作を繰り返すことを特徴とする（Longhurst and Cicardi 2012）。

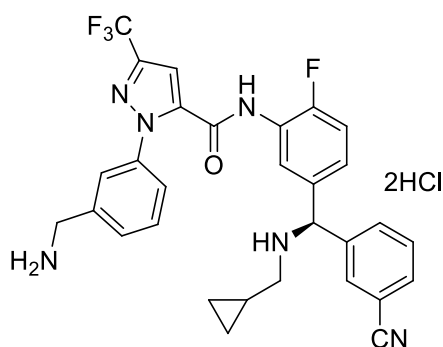
血漿カリクレインは接触系活性化経路に不可欠なセリンプロテアーゼである（Saxena, Thompson et al. 2011）。血漿カリクレインは酵素前駆体、プレカリクレイン（PKK）として血漿中を循環し、その主要基質の 1 つである高分子量キニノーゲン（HK）に結合する。接触系活性化の間、PKK は活性化された第 XIIa 因子によって切断され、活性型プロテアーゼカリクレインを形成する。カリクレインは次に HK を切断し、ブラジキニン（BK）を産生する（Kaplan and Ghebrehiwet 2010）。BK による BK B2 受容体の活性化は血管拡張、血管透過性亢進、平滑筋収縮をもたらす、いずれも HAE の特徴である組織腫脹をもたらす（Kaplan 2010）。

大多数の症例は、接触系活性化経路の主要な調節因子である C1 エステラーゼインヒビター（C1-INH）の遺伝子である SERPING1 の変異によって引き起こされ、BK の調節不全に至る（Cicardi and Zuraw 2018）。HAE の急性発作を特徴づける徴候や症状の主要なメディエーターとしての BK の役割は、これまでの動物モデル及び臨床試験での広範な結果から明らかにされている（Kaplan 2010、Zuraw and Christiansen 2011）。HAE 患者では、C1-INH 遺伝子の調節領域又はコード領域の変異により、C1-INH の産生不全又は機能しない C1-INH の産生のいずれかが生じる（Pappalardo, Cicardi et al. 2000）。その結果、カリクレインの産生及び活性化は、HAE 患者において症状が発現しないレベルの血管内皮接触活性化でも、誘導される（Cicardi and Johnston 2012）。無症状の HAE 患者では、血漿 HK 濃度は正常よりもおそらく低く、BK は検出可能である（Cugno, Hack et al. 1993, Nussberger, Cugno et al. 1998, Kaplan, Joseph et al. 2002, Nussberger, Cugno et al. 2002, Suffritti, Zanichelli et al. 2014）。外傷、感染症、ホルモン濃度の変化（例えば、経口避妊薬の使用又は月経の変化）、又は情緒的ストレスによって誘発される症状のある発作は、非制御の接触系活性化を特徴とし、カリクレイン産生の増加、HK 切断、及び循環 BK の劇的な増加を伴う（Cugno, Nussberger et al. 2003, Bork, Meng et al. 2006, Cicardi and Johnston 2012, Martello, Woytowish et al. 2012）。

ベロトラルスタット（BCX7353）は、BioCryst Pharmaceuticals, Inc. で発見された血漿カリクレインの強力な低分子阻害剤であり、HAE 患者における急性血管浮腫発作の治療（Investigational New Drug [IND] application 142,879）と同様に、HAE 患者における発作の予防のために研究開発されている（IND 135,058）。HAE 発作の治療のために市販されている非経口投与の選択肢とは対照的に、ベロトラルスタットによるカリクレインの阻害は経口投与の利点を提供する。

ベロトラルスタット（二塩酸塩）の構造を図 1-1 に示す。

図 1-1 構造式



ベロトラルスタット (BCX7353) は、(1-[3-(アミノメチル)フェニル]-*N*-(5-{(1*R*)-(3-シアノフェニル)[(シクロプロピルメチル)アミノ]メチル}-2-フルオロフェニル)-3-(トリフルオロメチル)-1*H*-ピラゾール-5-カルボキシアミド二塩酸塩である。

ベロトラルスタットのような経口投与可能な低分子によるカリクレインの慢性阻害は、血管性浮腫の発作頻度を減少させることにより、HAE 患者に大きな治療上の恩恵をもたらすものと期待される。予定している本剤の適応症、製剤及び用法・用量は、HAE 患者における血管性浮腫の発作抑制を目的としたベロトラルスタット 1 カプセル 150 mg 1 日 1 回投与である。

参考文献

- 1) Bork, K., G. Meng, P. Staubach and J. Hardt (2006) . "Hereditary angioedema: new findings concerning symptoms, affected organs, and course." *Am J Med* 119 (3) : 267-274.
- 2) Cicardi, M. and D. T. Johnston (2012) . "Hereditary and acquired complement component 1 esterase inhibitor deficiency: a review for the hematologist." *Acta Haematol* 127 (4) : 208-220.
- 3) Cicardi, M. and B. L. Zuraw (2018) . "Angioedema Due to Bradykinin Dysregulation." *J Allergy Clin Immunol Pract* 6 (4) : 1132-1141.
- 4) Cugno, M., C. E. Hack, J. P. de Boer, A. J. Eerenberg, A. Agostoni and M. Cicardi (1993) . "Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema." *J Lab Clin Med* 121 (1) : 38-43.
- 5) Cugno, M., J. Nussberger, M. Cicardi and A. Agostoni (2003) . "Bradykinin and the pathophysiology of angioedema." *Int Immunopharmacol* 3 (3) : 311-317.
- 6) Kaplan, A. P. (2010) . "Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: the role of C1 inhibitor therapy." *J Allergy Clin Immunol* 126 (5) : 918-925.
- 7) Kaplan, A. P. and B. Ghebrehiwet (2010) . "The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement." *Mol Immunol* 47 (13) : 2161-2169.
- 8) Kaplan, A. P. and K. Joseph (2014) . "Pathogenic mechanisms of bradykinin mediated diseases: dysregulation of an innate inflammatory pathway." *Adv Immunol* 121: 41-89.
- 9) Kaplan, A. P., K. Joseph and M. Silverberg (2002) . "Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease." *J Allergy Clin Immunol* 109 (2) : 195-209.
- 10) Longhurst, H. and M. Cicardi (2012) . "Hereditary angio-oedema." *Lancet* 379 (9814) : 474-481.
- 11) Martello, J. L., M. R. Woytowish and H. Chambers (2012) . "Ecallantide for treatment of acute attacks of hereditary angioedema." *Am J Health Syst Pharm* 69 (8) : 651-657.
- 12) Nussberger, J., M. Cugno, C. Amstutz, M. Cicardi, A. Pellacani and A. Agostoni (1998) . "Plasma bradykinin in angio-oedema." *Lancet* 351 (9117) : 1693-1697.
- 13) Nussberger, J., M. Cugno and M. Cicardi (2002) . "Bradykinin-mediated angioedema." *N Engl J Med* 347 (8) : 621-622.
- 14) Pappalardo, E., M. Cicardi, C. Duponchel, A. Carugati, S. Choquet, A. Agostoni and M. Tosi (2000) . "Frequent de novo mutations and exon deletions in the C1 inhibitor gene of patients with angioedema." *J Allergy Clin Immunol* 106 (6) : 1147-1154.
- 15) Saxena, P., P. Thompson, Y. d'Udekem and I. E. Konstantinov (2011) . "Kallikrein-kinin system: a surgical perspective in post-aprotinin era." *J Surg Res* 167 (1) : 70-77.
- 16) Suffritti, C., A. Zanichelli, L. Maggioni, E. Bonanni, M. Cugno and M. Cicardi (2014) . "High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin mediated angioedema due to hereditary c1-inhibitor deficiency." *Clin Exp Allergy*.
- 17) Zuraw, B. L. and S. C. Christiansen (2011) . "Pathophysiology of hereditary angioedema." *Am J Rhinol Allergy* 25 (6) : 373-378.

オラデオカプセル 150 mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.2 薬理試験の概要文

株式会社オーファンパシフィック

目次

略語及び略号一覧.....	5
1 まとめ.....	7
1.1 安全性薬理試験.....	9
2 効力を裏付ける試験.....	10
2.1 <i>In Vitro</i> における効力を裏付ける試験.....	10
2.1.1 BCX7353 の血漿カリクレインの強力かつ選択的な阻害作用	10
2.1.2 BCX7353 のヒト臍帯静脈内皮細胞における高分子量キニノーゲン／プレカリク レイン依存性ブラジキニン産生阻害作用.....	10
2.1.3 BCX7353 の健康被験者及び HAE 患者の活性化ヒト血漿中のカリクレイン活性阻 害作用	11
2.2 <i>In Vivo</i> 効力を裏付ける試験.....	12
3 副次的薬理試験.....	13
3.1 <i>In Vitro</i> 副次的薬理試験.....	13
3.1.1 BCX7353 のヒト及び各種動物種の血漿におけるプロトロンビン時間延長作用 .13	
3.1.2 BCX7353 のヒト及び各種動物種の血漿における活性化部分トロンボプラスチン 時間延長作用	14
3.2 <i>In Vivo</i> 副次的薬理試験.....	15
4 安全性薬理試験.....	16
4.1 <i>In Vitro</i> 試験.....	16
4.1.1 G-タンパク質共役受容体 (GPCR) スクリーニング (■26402 試験)	16
4.1.2 ヒト胎児腎 (HEK293) 細胞に発現させたクローン化 hERG チャネルに対する BCX7353 の影響の評価 (■125 試験)	16
4.1.3 ウサギ摘出心筋プルキンエ線維における活動電位に対する BCX7353 の影響 (141030■ 試験)	17
4.1.4 CHO 細胞に発現させたヒトクローン化イオンチャネルに対する BCX7353 の影響 (150123■ 試験)	17
4.1.5 ヒト幹細胞由来心筋細胞に対する BCX7353 の影響 (150217■ 試験)	18
4.1.6 ヒト胎児腎細胞に発現するクローン化ヒト ether-á-go-go 関連遺伝子カリウムチャ ネルに対する BCX7353 の作用 (190720■ 試験)	19
4.1.7 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hNav1.5 の遅延性ナトリウム電流に対す る BCX7353 の作用 (190718■ 試験)	19
4.1.8 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hNav1.5 のピークナトリウム電流に対す る BCX7353 の作用 (190721■ 試験)	20
4.1.9 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hCav1.2 カルシウムチャネルを介する電 流に対する BCX7353 の影響 (190719■ 試験)	22

4.1.10	BCX7353 の催不整脈リスクのシミュレーション (TD-DEV-20-7353-001 試験)	23
4.2	<i>In Vivo</i> 試験	27
4.2.1	ラットを用いた BCX7353 経口投与による呼吸器系への影響の評価 (124 試験)	27
4.2.2	ラットを用いた BCX7353 経口投与による神経行動学的評価 (123 試験)	27
4.2.3	カニクイザルを用いた BCX7353 経口投与による心血管系への影響 (135 試験)	28
5	薬力学的薬物相互作用	30
6	考察及び結論	31
7	表及び図	35
8	参考文献	36

表一覧

表 1-1	BCX7353 の非臨床薬理試験の概要	7
表 2.1.1-1	血漿カリクレインと他のセリンプロテアーゼに対する BCX7353 の選択性指数の比較 (BR-7353-002 試験)	10
表 3.1.1-1	動物種別プロトロンビン時間の 2 倍延長に要した BCX7353 濃度 (BR-7353-003 試験)	13
表 3.1.2-1	動物種別活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) の 2 倍延長に要した BCX7353 濃度 (TD-BR-18-5353-010 試験)	15
表 4.1.6-1	hERG に対する BCX7353 及び陽性対照物質の IC ₅₀ 及び Hill 係数の推定値 (190720 試験)	19
表 4.1.7-1	遅延性 Nav1.5 電流に対する BCX7353 及び陽性対照物質の IC ₅₀ 及び Hill 係数の推定値	20
表 4.1.8-1	Nav1.5 ピーク電流に対する BCX7353 及び陽性対照物質の IC ₅₀ 及び Hill 係数の推定値	21
表 4.1.9-1	BCX7353 及び陽性対照物質の Cav1.2 に対する IC ₅₀ 及び Hill 係数の推定値	22
表 4.1.10-1	試験及び FDA データから得た pIC ₅₀ 及び Hill 係数	24
表 4.1.10-2	BCX7353 及び対照物質の TMS データ	26
表 6-1	各種 <i>in vitro</i> イオンチャネル試験における BCX7353 の IC ₅₀ 及びアッセイ情報の概要	32
表 6-2	BCX7353 心臓電気生理学的データ	33
表 6-3	BCX7353 の安全性薬理試験の用量において想定される安全域	34

図一覧

図 2.1.2-1 BCX7353 の HUVEC におけるブラジキニン遊離阻害作用 (BR-7353-004 試験)	11
図 2.1.3-1 BCX7353 の HAE 患者血漿中のカリクレイン阻害作用 (BR-7353-006-REV-01 試験)	12
図 3.1.1-1 BCX7353 のプロトロンビン時間への影響：動物種間の比較	14
図 3.1.2-1 ヒト及び動物の aPTT に対する BCX7353 の影響 (TD-BR-18-5353-010 試験)	15
図 4.1.5-1 代表的な細胞外電位の記録	18
図 4.1.10-1 血漿中遊離薬物濃度の関数としての BCX7353 の TMS	25
図 4.1.10-2 臨床的に意義のある濃度での BCX7353 (遊離薬物) 及び対照物質の TMS	26

略語及び略号一覧

略語・略号	省略しない表現（英語）	省略しない表現（日本語）
APA	action potential amplitude	活動電位振幅
APD	action potential duration	活動電位持続時間
APD ₆₀	action potential duration at 60% repolarization	60%再分極時の活動電位持続時間
APD ₉₀	action potential duration at 90% repolarization	90%再分極時の活動電位持続時間
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC ₀₋₂₄	area under the plasma concentration vs. time curve from time 0 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
BCL	basic cycle length	基本周期長
BCX7353	Berotrastat (INN) ((+)-1-(3-(aminomethyl)phenyl)-N-(5-((3-cyanophenyl)((cyclopropylmethyl)amino)methyl)-2-fluorophenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide) is a potent, synthetic, small-molecule inhibitor of kallikrein	Berotrastat (INN：ベロトラルスタット) (+) -1- (3- (アミノメチル) フェニル) -N- (5- ((3-シアノフェニル) ((シクロプロピルメチル) アミノ) メチル) -2-フルオロフェニル) -3- (トリフルオロメチル) -1H-ピラゾール-5-カルボキシアミド) カリクレインの強力な合成低分子阻害剤。
BioCryst	BioCryst Pharmaceuticals, Inc.	BioCryst Pharmaceuticals, Inc.
BK	bradykinin	ブラジキニン
BP	blood pressure	血圧
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C _{max}	maximum (peak) plasma drug concentration	最高血漿中薬物濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
DRF	dose-range finding	用量（範囲）設定
dV/dt	instant rate of voltage change	瞬間的電圧変化速度
EC ₅₀	half-maximal effect dose	50%効果濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
FOB	functional observational battery	機能観察バッテリー
FPD	field potential duration	細胞外電位持続時間
FPD _c	corrected field potential duration	補正細胞外電位持続時間
GPCR	G-protein coupled receptor	G タンパク質共役受容体
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
hCav1.2	cloned human L-type calcium channel 1.2 expressed in CHO cells	CHO 細胞に発現させたクローン化ヒト L 型カルシウムチャネル 1.2

略語・略号	省略しない表現（英語）	省略しない表現（日本語）
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル 関連遺伝子
HK	High-molecular-weight kininogen	高分子量キニノーゲン
hNav1.5	cloned human sodium channel 1.5 expressed in CHO cells	CHO 細胞に発現させたクローン化ヒトナ トリウムチャネル 1.5
HR	heart rate	心拍数
HUVEC	human umbilical vein endotherial cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
IC ₅₀	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation (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
NOEL	no observable effect level	無影響量
PD	pharmacodynamics	薬力学
PKK	Prekallikrein	プレカリクレイン
PSS	physiological salt solution	生理食塩液
PT	Prothrombin time	プロトロンビン時間
QRS	the combination of three of the graphical deflections seen on a typical ECG, corresponds to the depolarization of the right and left ventricles of the human heart and contraction of the large ventricular muscles	典型的な心電図上で認められる 3 つの波 形の振れを組み合わせたもので、ヒト心 臓の左右心室の脱分極及び大きな心室筋 の収縮に対応する。
QT	electrocardiographic interval between the beginning of the Q wave and termination of the T wave, representing the time for both ventricular depolarization and repolarization to occur	Q 波の開始から T 波の終了までの心電図 上の間隔。両心室の脱分極及び再分極の 両方が生じた時間を表す。
QTc	QT interval corrected for heart rate	心拍数補正 QT 間隔
RMP	resting membrane potential	静止膜電位
SE	standard error of the mean	平均値の標準誤差
WH	Wistar-Han	Wistar-Han（ラット系統名）

1 まとめ

BCX7353 (berotralstat) の薬理作用は、効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験で十分に評価され、血漿カリクレイン阻害剤としての効力及び選択性が評価されている。医薬品規制調和国際会議 (ICH) ガイドライン S7A に準拠して、*in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験の標準的なバッテリー試験を実施した。BCX7353 は *in vitro* でヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル関連遺伝子 (hERG) イオンチャネルを阻害し、テレメトリー装置を装着した覚醒下のサルにおいて (50 mg/kg 以上の用量で) 心拍数補正 QT 間隔 (QTc) を含む心電図 (ECG) 上の間隔を増加させることが示された。このため、追加の *in vitro* 試験を実施して、ウサギ心筋プルキンエ線維における活動電位持続時間 (APD)、自律拍動するヒト心筋細胞における細胞外電位、及びチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に発現させたクローニン化ヒトカルシウム及びナトリウムイオンチャネルに対する BCX7353 の影響を評価した。開発プログラムとして実施された非臨床薬理試験の概要を表 1-1 に示す。また、これらの試験の概要表を m2.6.3 に示す。

表 1-1 BCX7353 の非臨床薬理試験の概要

試験の種類/説明	試験系	投与方法	試験番号
効力を裏付ける試験			
ヒト血漿カリクレインの阻害	<i>In vitro</i> ; 精製酵素アッセイ	<i>In vitro</i>	BR-7353-001
ヒトセリンプロテアーゼの阻害	<i>In vitro</i> ; 精製酵素アッセイ	<i>In vitro</i>	BR-7353-002
ヒトカリクレイン活性の阻害を評価するためのアッセイの開発	<i>In vitro</i> ; 血漿アッセイ	<i>In vitro</i>	TD-BR-18-002-DEV
ヒトカリクレイン活性の阻害を評価するためのアッセイの適格性確認	<i>In vitro</i> ; 血漿アッセイ	<i>In vitro</i>	TD-BR-18-002-VAL
クエン酸血漿中の BCX7353 の安定性及びカリクレインの安定性	<i>In vitro</i> ; 血漿アッセイ	<i>In vitro</i>	TD-BR-18-7353-011
ヒト及び動物血漿中のカリクレイン活性の阻害	<i>In vitro</i> ; 血漿アッセイ	<i>In vitro</i>	BR-7353-005-改訂 01
HAE 患者の血漿中のカリクレインの阻害	<i>Ex vivo</i> ; ヒト血漿アッセイ	経口	BR-7353-006-改訂 01
ブラジキニン遊離阻害	<i>In vitro</i> ; ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)	<i>In vitro</i>	BR-7353-004
副次的薬理試験			
ヒト及び動物血漿における PT に対する作用 (ヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ブタ)	<i>In vitro</i> ; 血漿アッセイ	<i>In vitro</i>	BR-7353-003
ヒト及び動物血漿における aPTT に対する作用 (ヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ウサギ)	<i>In vitro</i> ; 血漿アッセイ	<i>In vitro</i>	TD-BR-18-7353-010

試験の種類／説明	試験系	投与方法	試験番号
安全性薬理試験			
GPCR スクリーニング	細胞株に発現させたヒト GPCR	<i>In vitro</i>	██████6402
hERG チャネル	hERG 発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	██████125 ^a
心血管系	ウサギ摘出心筋 ブルキンエ線維	<i>In vitro</i>	141030██████ ^a
イオンチャネル	CHO 細胞に発現させた L 型カルシウムチャネル hCav1.2 及びナトリウムチャネル hNav1.5	<i>In vitro</i>	150123██████
心血管系	ヒト幹細胞由来心筋細胞	<i>In vitro</i>	150217██████
心血管系	hERG カリウムチャネル発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	190720██████ ^a
心血管系	hNav1.5 発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	190718██████ ^a
心血管系	hNav1.5 発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	190721██████ ^a
心血管系	hCav1.2 発現 CHO 細胞	<i>In vitro</i>	190719██████ ^a
心血管系	モデリング	N/A	TD-DEV-20-7353-001
神経行動学的作用	雄 WH(Crl:WI[Han])ラット	強制経口	██████123 ^a
呼吸器系	雄 WH(Crl:WI[Han])ラット	強制経口	██████124 ^a
心血管系	雌カニクイザル	強制経口	██████135 ^a

略語:aPTT=活性化部分トロンボプラスチン時間; CHO=チャイニーズハムスター卵巣 (細胞); GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準; GPCR=G タンパク質共役受容体; HAE=遺伝性血管性浮腫; hCav1.2=CHO 細胞に発現させたクローン化ヒト L 型カルシウムチャネル 1.2; hERG=ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル関連遺伝子; HEK=ヒト胎児腎; hNav1.5=CHO 細胞に発現させたクローン化ヒトナトリウムチャネル 1.5; HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞; N/A=該当なし; NHP=非ヒト霊長類; PT=プロトロンビン時間; WH=Wistar-Han

^a GLP 適用試験を示す。

効力を裏付ける試験及び副次的薬理試験において、BCX7353 はヒト 血漿カリクレイン活性の強力かつ特異的な阻害剤であることが示され、単離酵素に対する阻害定数 (K_i) は 0.44 nM であった。また、BCX7353 は、ヒト、サル及びラット活性化血漿中のカリクレイン活性も阻害し、50%効果濃度 (EC_{50}) の平均値は、それぞれ 5.4、5.2 及び 7.2 nM であった。その他の各種セリンプロテアーゼに対する BCX7353 の 50%阻害濃度 (IC_{50}) は、血漿カリクレインに対する BCX7353 の IC_{50} (0.88 nM) の約 4500 倍～56000 倍超であった。さらに、BCX7353 は遺伝性血管性浮腫 (HAE) と診断された患者 14 例から採取したヒト血漿中の血漿カリクレイン活性の強力な阻害剤であり、 EC_{50} の範囲は 11.7～20.0 nM、 EC_{50} の平均値 ($\pm$ 平均値の標準誤差 [SE]) は 15.9 ± 0.57 nM であった。

BCX7353 はヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における高分子量キニノーゲン／プレカリクレイン (HK/PKK) 依存性ブラジキニン (BK) 産生の強力な阻害剤で、平均 ($\pm$ SE) EC_{50} は 5.56 ± 1.2 nM である。

BCX7353 は凝固経路の上流調節因子を阻害するため、ヒト血漿及び様々な動物種の血漿を用いた血漿凝固アッセイ (プロトロンビン時間 [PT] 及び活性化部分トロンボプラスチン時間 [aPTT]) で凝固に対する影響を評価した。ヒト血漿を用いた標準的な凝固アッセイにおいて、BCX7353 で処理した結果、治療用量を超える非常に高い濃度でのみ PT 及び aPTT の延長が生じた (100 μ M [56.2 μ g/mL] 以下の濃度では PT の 2 倍延長は認められず、73.4 μ M [41.3 μ g/mL] では aPTT の 2 倍延長が認められた)。

1.1 安全性薬理試験

全ての動物試験で溶媒として水を使用した。また、BCX7353 の用量は遊離塩基型（フリー一体）の値として表示した。ヒト心筋細胞、ヒト G タンパク質共役受容体（GPCR）、並びにヒトクロン化カルシウム及びナトリウムイオンチャネルを用いた *in vitro* 試験を除き、全ての安全性薬理試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice ; GLP）を遵守し、経済協力開発機構加盟国において実施した。

103 種の異なる GPCR との相互作用を評価した放射性リガンド結合試験において、BCX7353 は、カンナビノイド CB1、メラノコルチン MC5 及びソマトスタチン SST1 受容体を除く全ての標的受容体に対する親和性（ K_i ）が $3\ \mu\text{M}$ を上回った。これらの受容体に対する親和性は、それぞれ 1.56 、 1.92 及び $2.09\ \mu\text{M}$ であった。標的酵素における BCX7353 の阻害定数（ K_i ）が $0.44\ \text{nM}$ である（すなわち選択性が 3545 倍以上である）ことから、これらの GPCR との相互作用に関する懸念は低い。

BCX7353 はヒト胎児腎（HEK）293 細胞にトランスフェクション技術により発現させた hERG チャネルを阻害することが示され、 IC_{50} は $0.29\ \mu\text{M}$ であった。しかし、ウサギ心筋プルキンエ線維における APD は、 $93.7\ \mu\text{M}$ では明らかな増加を示さなかった。BCX7353 はチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞に発現させたクロン化ヒト L 型カルシウムチャネル 1.2（hCav1.2）を阻害し、 IC_{50} は $1.30\ \mu\text{M}$ であった。BCX7353 は CHO 細胞に発現させたクロン化ヒトナトリウムチャネル 1.5（hNav1.5 ; ピーク）を阻害し、 IC_{50} は $4.79\ \mu\text{M}$ であった。細胞外電位持続時間（FPD）を含めて、 $0.3\ \mu\text{M}$ （遊離体濃度）を上回る濃度では自律拍動するヒト心筋の電気波形への影響が生じたことから、心室の脱分極及び再分極の両方が生じた時間を表す心電図上の Q 波開始から T 波終了までの間隔（QT）を延長させる可能性があることが示唆された。

米国食品医薬品局（FDA）が公表した手法に従って、詳細なイオンチャネル試験を実施した（FDA 2019）。イオンチャネル試験は GLP を遵守し、全て生理的温度付近（ $32\sim 34^\circ\text{C}$ ）で実施した。BCX7353 によって hERG、遅延性 Nav1.5、ピーク Nav1.5 及び Cav1.2 が阻害され、 IC_{50} はそれぞれ 0.2 、 0.1 、 2.4 及び $2.8\ \mu\text{M}$ であった。*In silico* モデルを用いて後者のデータを解析した結果、BCX7353 が臨床的に意義のある血漿中濃度で不整脈を引き起こすリスクは低いことが示された。

覚醒サルを用いた安全性薬理試験では、 $15\ \text{mg/kg}$ の単回投与による心血管系への有害な影響はなかった。 50 及び $150\ \text{mg/kg}$ の用量では血圧（拡張期、収縮期及び平均）がやや低下し、RR、PR、QRS 及び QTc を含む心電図上の間隔がやや延長した。これらの血圧及び心電図への影響は、延長が対照の平均値と比較して、最大でも概ね 11%未満であったことから、有害ではないと考えられた。カニクイザルを用いた反復投与毒性試験では、BCX7353 の $80\ \text{mg/kg/日}$ 投与は、9 ヶ月間の投与期間中及び投与終了時に心電図パラメータに対して定量的又は定性的な影響を及ぼさなかった。

ラットを用いた中枢神経系（CNS）及び呼吸器系安全性薬理試験では、BCX7353 が CNS 及び呼吸器系に影響を及ぼす可能性が低いことが示されている。各試験で評価した最高用量は $450\ \text{mg/kg}$ であり、いずれの評価項目にも影響を及ぼさなかった。

結論として、非臨床薬理試験では、BCX7353 が血漿カリクレインの強力かつ特異的な阻害剤であることが確認され、十分な治療域を有することが示されている。まとめると、薬理試験及び安全性薬理試験のデータは、HAE を有する成人及び青年患者における血管性浮腫発作を抑制する治療としての BCX7353 の承認を支持するものである。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In Vitro* における効力を裏付ける試験

2.1.1 BCX7353 の血漿カリクレインの強力かつ選択的な阻害作用

BCX7353 は精製ヒト血漿カリクレインの強力な阻害剤で、 K_i は 0.44 nM (BR-7353-001 試験) である。他の関連セリンプロテアーゼに対する阻害作用を上回り、BCX7353 は血漿カリクレインに対する選択性を維持した。表 2.1.1-1 に示すように、9 種類のセリンプロテアーゼに対する BCX7353 の IC_{50} は、血漿カリクレインに対する BCX7353 の IC_{50} (0.88 nM) の約 4500 倍～56000 倍超であった (BR-7353-002 試験)。

表 2.1.1-1 血漿カリクレインと他のセリンプロテアーゼに対する
BCX7353 の選択性指数の比較 (BR-7353-002 試験)

酵素 ^a	平均 $IC_{50} \pm SE$ (nM)	効力の低下倍率 (血漿カリクレインの IC_{50} との比較)
トリプシン	11000 $\pm$ 555	12500
トロンビン	> 50000	> 56818
プラスミン	3967 $\pm$ 1139	4508
組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)	> 50000	> 56818
活性化タンパク質 C (APC)	> 30000	> 34091
補体 C1s	> 50000	> 56818
活性化第 X 因子	> 50000	> 56818
活性化第 XIIa 因子	> 50000	> 56818
組織カリクレイン	> 30000	> 34091

略語: IC_{50} =50%阻害濃度; SE=平均値の標準誤差。

^a 全ての酵素について、96 ウェルプレートを用いて反応を 2 回行った。3 つの独立した実験から得られた IC_{50} の平均値 $\pm$ SE。血漿カリクレインに対する BCX7353 の IC_{50} は 0.88 nM である。

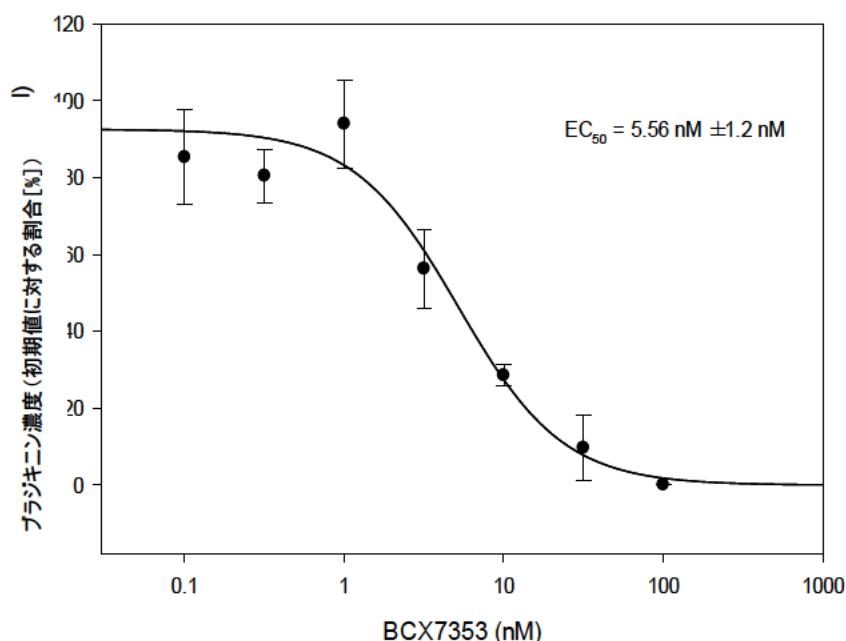
2.1.2 BCX7353 のヒト臍帯静脈内皮細胞における高分子量キニノーゲン／プレカ

リクレイン依存性ブラジキニン産生阻害作用

上述のように、BCX7353 のヒト内皮細胞における HK/PKK 依存性 BK 産生抑制能について検討した (Kolte 2011)。

BCX7353 存在下でのインキュベーションによりカリクレイン依存性 BK 産生が阻害され、平均 ($\pm$ SE) EC_{50} は 5.56 $\pm$ 1.2 nM (図 2.1.2-1) であったことから、BCX7353 は内皮細胞による、接触因子系の活性化後の BK 産生を強力に抑制することが示された (BR-7353-004 試験)。

図 2.1.2-1 BCX7353 の HUVEC におけるブラジキニン遊離阻害作用 (BR-7353-004 試験)



略語: BK=ブラジキニン; HK=高分子量キニノーゲン; EC₅₀=50%効果濃度; ELISA=酵素結合免疫吸着法; HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞; PKK=プレカリクレイン; SE=平均値の標準誤差
コンフルエントな HUVEC を HK でコーティングし、PKK 及び各種濃度の BCX7353 の存在下でインキュベートした。PKK は活性化されてカリクレインとなり、HK を切断して上清に BK を遊離する。リシノプリルを添加することにより、BK の分解が防止される。ブラジキニン濃度は ELISA キットを用いて定量し、BCX7353 による BK 遊離阻害の EC₅₀は、Sigma Plot ソフトウェアを用いて対応する BCX7353 濃度に BK 遊離 (初期値に対する割合 [%]) を当てはめることにより決定した。ここに示した EC₅₀データは、2つの独立した試験で得られた4つの別々のアッセイの平均値±SEである。

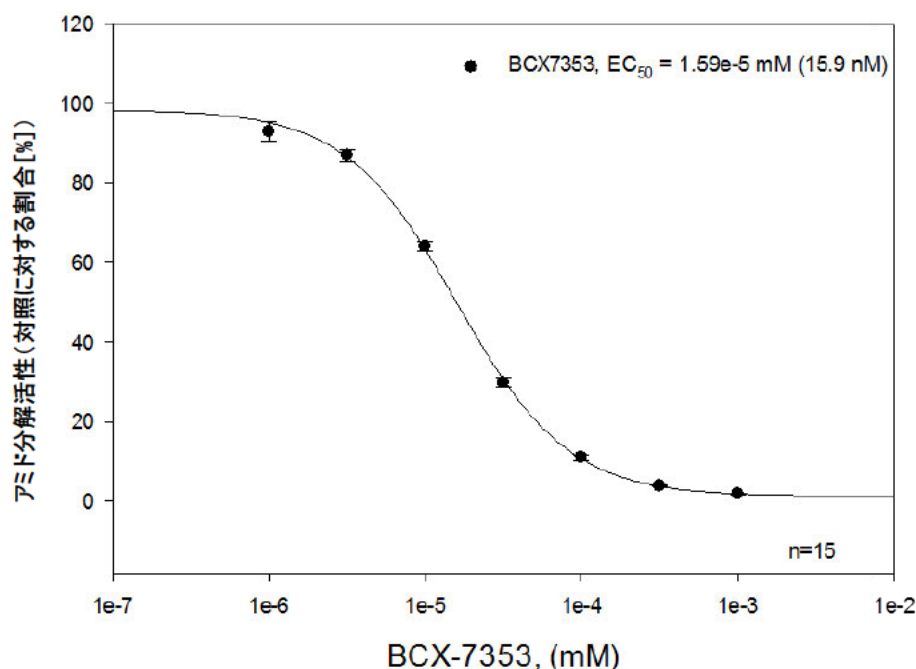
2.1.3 BCX7353 の健康被験者及び HAE 患者の活性化ヒト血漿中のカリクレイン

活性阻害作用

BioCryst Pharmaceuticals, Inc. (BioCryst) で開発された血漿カリクレイン活性の蛍光アッセイ法を用いて、ヒト血漿中の BCX7353 の効力を測定した (TD-BR-18-002-DEV 試験; TD-BR-002-VAL 試験; TD-BR-18-7353-011 試験)。

正常ヒト血漿中の血漿カリクレインの BCX7353 による阻害の平均 EC₅₀は 5.4 nM であった (BR-7353-005-REV-01 試験)。サル及びラットの血漿カリクレインの阻害についても評価したところ、BCX7353 の平均 EC₅₀はそれぞれ 5.2 及び 7.2 nM であった (BR-7353-005-REV-01 試験)。HAE と確定診断された患者 14 例から採取した血漿中の血漿カリクレイン活性についても評価し、各被験者における EC₅₀を測定した。Ex vivo での活性化 HAE 患者血漿における BCX7353 の個々の EC₅₀は、正常ヒト血漿における値よりもわずかに高く 11.7 ~20.0 nM の範囲であり、平均 (±SE) EC₅₀は 15.9±0.57 nM であった (BR-7353-006-REV-01 試験) (図 2.1.3-1)。

図 2.1.3-1 BCX7353 の HAE 患者血漿中のカリクレイン阻害作用
(BR-7353-006-REV-01 試験)



略語: BCX-7353=BCX7353 ; EC_{50} =50%効果濃度 ; EAA=エラグ酸活性化剤 ; HAE=遺伝性血管性浮腫 ; PKK=プレカリクレイン ; V_{mean} =酵素反応の平均速度 ; SE=平均値の標準誤差

EAA によって血漿が刺激されることにより PKK がカリクレインに変換され、これにより特異的な蛍光発生基質である Z-FR-AMC (N-カルボベンジルオキシ-フェニルアラニン-アルギニン-7-アミノ-4-メチルクマリン) が切断される。カリクレイン活性は、蛍光性の 7-アミノ-4-メチルクマリン基の測定により定量することができる。BCX7353 などのカリクレイン阻害剤の存在下では蛍光 (強度) が減弱する。上記実験では、HAE 患者の EAA 活性化血漿と各種濃度の BCX7353 をインキュベートした。血漿試料は 2 回分析し、データを 1 分間当たりの相対蛍光単位でエクスポートした。カリクレイン活性率は、 V_{mean} (酵素反応の平均速度) として報告し、アミド分解活性の割合 (%) に変換した。全ての HAE 患者の濃度-反応曲線から EC_{50} を算出した (血漿試料数 $n=15$; 被験者 1 例から別々の 2 回の来院時に試料を採取)。図示したデータは対照に対する割合 (%) の平均値 ($\pm SE$) である。

2.2 In Vivo 効力を裏付ける試験

BCX7353 の効力を裏付ける *in vivo* 試験は実施されていない。

3 副次的薬理試験

3.1 *In Vitro* 副次的薬理試験

3.1.1 BCX7353 のヒト及び各種動物種の血漿におけるプロトロンビン時間延長作用

BCX7353 は内因性凝固経路の上流調節因子を阻害するため、ヒト血漿及び各種動物種の血漿を用いた血漿凝固アッセイ（すなわち PT [プロトロンビン時間] 測定）により、BCX7353 の凝固に対する作用を評価した（BR-7353-003 試験）。

BCX7353 の濃度の増加に伴う PT 延長が示され、BCX7353 の処理により凝固時間は濃度依存的に増加した。ただし、PT 阻害の効力は動物種によって異なった（表 3.1.1-1）。本アッセイで検討した最高濃度（100 μ M）で認められた PT 延長は、30%（イヌ）、67%（ウサギ）、68%（ラット）、80%（ヒト）、86%（マウス）、123%（ブタ）、及び 144%（サル）であった。

PT の著しい延長は、異常出血のリスクの増大（すなわち抗凝固作用）と関連している可能性がある。但し、プールされたヒト血漿中で PT の 2 倍延長に必要と推定される BCX7353 濃度（100 μ M 超）は、*in vitro* でヒト血漿中のカリクレイン活性の 50% 阻害に必要な濃度の 17000 倍超高かった（ EC_{50} =5.4 nM；セクション 2.1.3）。

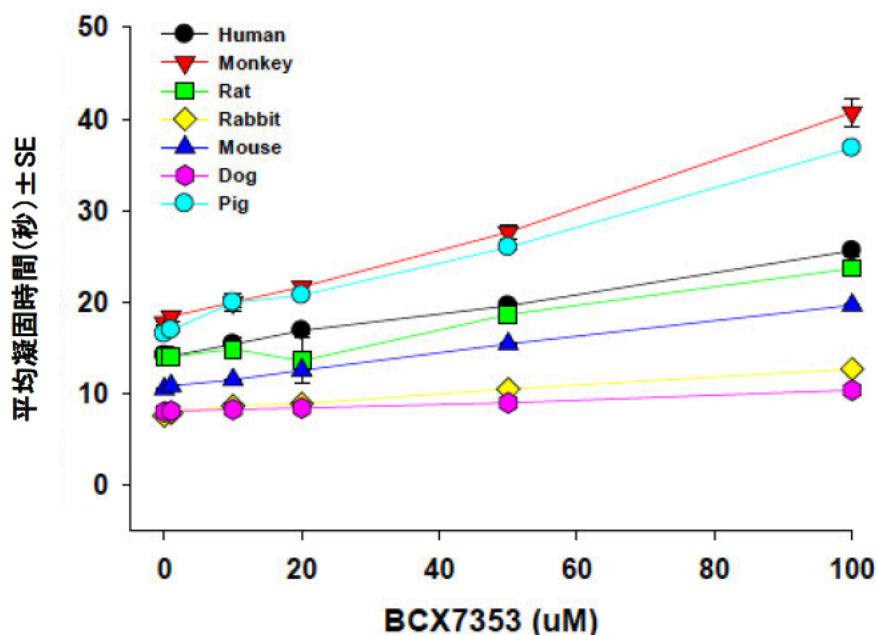
表 3.1.1-1 動物種別プロトロンビン時間の 2 倍延長に要した BCX7353 濃度（BR-7353-003 試験）

動物種 (血漿)	PT2 倍延長に要した BCX7353 濃度 (μ M)			
	アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3	平均値 $\pm$ SE
ヒト	>100	>100	>100	>100
サル	76.8	74.6	91.6	81.0 $\pm$ 5.3
ラット	>100	>100	>100	>100
ウサギ	>100	>100	>100	>100
マウス	>100	>100	>100	>100
イヌ	>100	>100	>100	>100
ブタ	80.1	79.7	86.7	82.2 $\pm$ 2.3

略語: PT=プロトロンビン時間；SE=平均値の標準誤差

乏血小板血漿を各種濃度（1~100 μ M）の BCX7353 存在下で 37°C で 3 分間ブレインキューベーションした後、トロンボプラスチン D 試薬（トロンボプラスチン、組織因子、カルシウム、緩衝液及び安定剤を含有）200 μ L を添加して凝固を開始した。凝固時間は Amelung 社製微量凝固測定装置を用いて測定し、秒数を記録した。各アッセイでは各濃度の試験を 2 回又は 3 回（ヒト）行い、対照であるベースラインのジメチルスルホキシド（DMSO）に対して PT が 2 倍延長となる各動物種における BCX7353 濃度を二次方程式を用いて算出した。

図 3.1.1-1 BCX7353 のプロトロンビン時間への影響：動物種間の比較
(BR-7353-003 試験)



略語: PT=プロトロンビン時間; sec=秒; SE=平均値の標準誤差

ヒト及び各種動物種で得られた PT に対する BCX7353 の作用を比較したグラフ; データは平均凝固時間 (秒 ±SE); アッセイ数 n=3。

3.1.2 BCX7353 のヒト及び各種動物種の血漿における活性化部分トロンボプラスチン時間延長作用

ヒト血漿及び各種動物種の血漿を用いた血漿凝固アッセイで、BCX7353 の活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) に対する作用を評価した (TD-BR-18-5353-010 試験)。

BCX7353 は濃度 6μM までヒトの aPTT を延長しなかったが、BCX7353 濃度 10~100μM ではヒト aPTT を濃度依存的に延長した。ヒト aPTT のベースラインの平均値は 53.9 秒で、対照と比較して aPTT を 2 倍延長する BCX7353 濃度の平均値は 73.4μM であった。ヒト血漿中で aPTT を 2 倍延長する BCX7353 濃度は、*in vitro* でヒト血漿中のカリクレイン活性の 50% 阻害に必要な濃度の 12000 倍超高かった ($EC_{50}=5.4$ nM; セクション 2.1.3)。

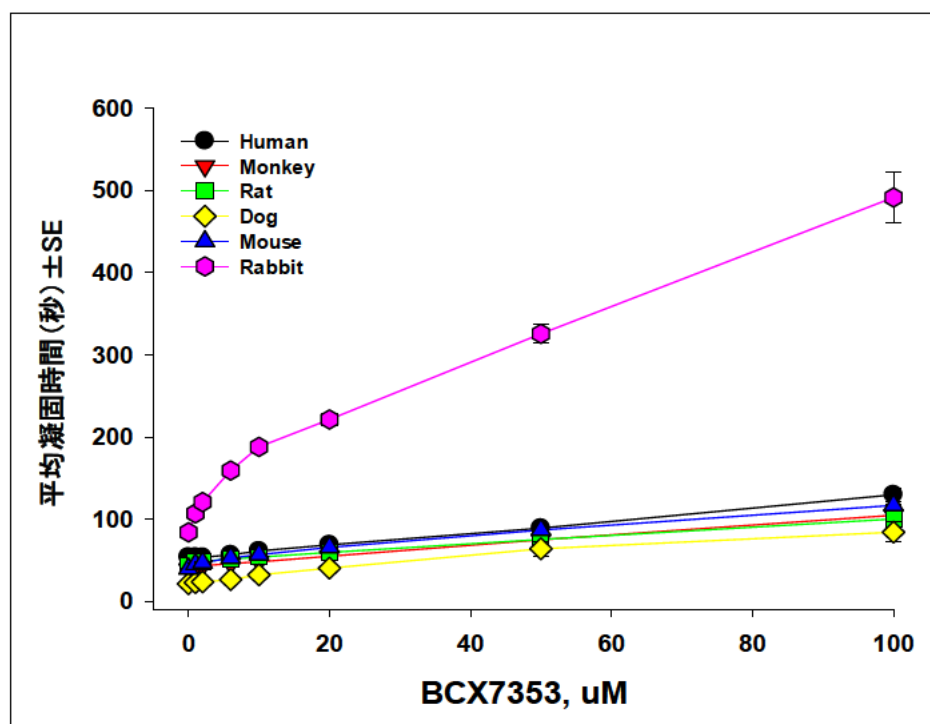
サル、ラット、マウス、イヌ及びウサギの血漿を BCX7353 で処理したところ、aPTT 延長が認められ、凝固時間は濃度依存的な延長を示した。サル、マウス、ラット、ウサギ及びイヌの血漿におけるベースライン aPTT の平均値は、それぞれ 38.6、39.9、44.1、84.0、21.5 秒である。サル、マウス、ラット、ウサギ及びイヌの血漿で aPTT の 2 倍の延長が生じた BCX7353 濃度はそれぞれ 53.5、327.7、73.6、10.3 及び 24.6 μM であった (表 3.1.2-; 図 3.1.2-1)。

表 3.1.2-1 動物種別活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT) の 2 倍延長に要した BCX7353 濃度 (TD-BR-18-5353-010 試験)

動物種 (血漿)	aPTT2 倍延長に要した BCX7353 濃度 (μM)			
	アッセイ 1	アッセイ 2	アッセイ 3	平均値 ± SE
ヒト	80.5	71.0	68.6	73.4 ± 3.6
サル	53.7	51.8	54.9	53.5 ± 0.9
ラット	73.8	72.7	74.2	73.6 ± 0.4
イヌ	17.7	35.6	20.6	24.6 ± 5.5
ウサギ	9.6	10.9	10.3	10.3 ± 0.4
マウス	38.0	35.7	39.5	37.7 ± 1.1

略語:aPTT=活性化部分トロンボプラスチン時間; DMSO=ジメチルスルホキシド; SE=平均値の標準誤差
aPTTを測定するため個別のアッセイを3回実施した。各アッセイでは反応を2回又は3回行った。各動物種について、対照であるベースラインの DMSO に対して aPTT が 2 倍延長するために要した BCX7353 濃度を二次方程式を用いて算出した。

図 3.1.2-1 ヒト及び動物の aPTT に対する BCX7353 の影響 (TD-BR-18-5353-010 試験)



略語:aPTT=活性化部分トロンボプラスチン時間; SE=平均値の標準誤差; sec=秒
グラフは凝固時間の平均値を示す (n=3)。データは二次方程式に当てはめた。

3.2 In Vivo 副次的薬理試験

BCX7353 の in vivo 副次的薬理試験は実施されていない。

4 安全性薬理試験

ICH ガイドライン S7A に従って、安全性薬理試験の標準的なバッテリー試験を実施し、BCX7353 を評価した。

In vitro 試験で、生理学的機能を調節する主要な GPCR に対する親和性を推定し、hERG イオンチャネルとの相互作用、及びウサギ心筋プルキンエ線維を用いて APD への影響を評価した。またその他の *in vitro* 試験において、ヒト心筋細胞機能及びヒトクローン化イオンチャネルに対する BCX7353 の影響を評価した。

心血管系、呼吸器系及び中枢神経系に対する BCX7353 の影響を *in vivo* 試験で評価した。

4.1 *In Vitro* 試験

4.1.1 G-タンパク質共役受容体 (GPCR) スクリーニング (■26402 試験)

本試験の目的は、アセチルコリン、アデノシン、アドレナリン、ヒスタミン、ドパミン、メラトニン、ノルアドレナリン、プロスタグランジン及びセロトニン受容体を含む主なヒト GPCR に対する BCX7353 の親和性の測定であった。

遺伝子組換えヒト GPCR (103 種類のサブタイプ) に対する BCX7353 の親和性 (K_i) を放射性リガンド結合法を用いて評価した。BCX7353 は、カンナビノイド CB1、メラノコルチン MC5 及びソマトスタチン SST1 受容体を除く、全ての標的受容体に対し K_i が 3 μM を上回った。カンナビノイド CB1、メラノコルチン MC5 及びソマトスタチン SST1 受容体に対する親和性は、それぞれ 1.56、1.92 及び 2.09 μM であった。試験結果の妥当性を確保するため、各アッセイの一部として標準品のアッセイも行ったところ、各標準品の K_i は既存対照と一致した。

標的酵素 (血漿カリクレイン) に対する BCX7353 の効力 (K_i) が 0.44 nM であることから、これらの GPCR との相互作用に関する懸念は低く、CB1、MC5 及び SST1 受容体に対する親和性と比較して、3545 倍以上の選択性が示唆される。概して、BCX7353 は治療濃度では正常なヒトの生理機能に変化を引き起こす可能性は低いと考えられる。

4.1.2 ヒト胎児腎 (HEK293) 細胞に発現させたクローン化 hERG チャネルに対する BCX7353 の影響の評価 (■125 試験)

本試験では、HEK293 細胞株に安定的に発現させた hERG チャネルによって伝導される内向き整流性カリウム電流の急速な活性化に対する BCX7353 の影響を評価した。hERG 関連カリウム電流に対する BCX7353 の影響を電気生理学的なホールセルパッチクランプ法を用いて評価し、濃度反応関係により定量化した。

生理食塩液 (PSS) 中の被験物質及び対照物質を 34.4°C~36°C で 2.8~6.3 分間にわたって表面灌流により適用した。処理群における BCX7353 の名目濃度は 0.03、0.1、1.0、3.0、10 及び 30 μM で、PSS 及び 0.1 μM シサプリドをそれぞれ溶媒対照及び陽性対照として用いた。

名目濃度 0.03~30 μM (実際の濃度; 0.037~27.72 μM) での BCX7353 の表面灌流により、平均 hERG 介在性カリウム電流阻害の平均値は濃度に依存して増加し、その阻害率は、約 14%~98% の範囲であった。実際の濃度を用いたデータ解析による IC_{50} は 0.29 μM であった。

4.1.3 ウサギ摘出心筋プルキンエ線維における活動電位に対する BCX7353 の影響 (141030 試験)

摘出したウサギプルキンエ線維における心筋活動電位に対する BCX7353 の影響を *in vitro* で測定した。2 つの刺激間隔（基本周期長 [BCL] 1 及び 0.5 秒）で線維標本 5 本に 3 濃度の BCX7353 (0.9、9.4、及び 93.7 μM) を逐次添加し、活動電位パラメータに対する BCX7353 の影響を同一時間に測定した溶媒対照群のパラメータと比較した。

被験物質液の安定性を分析法バリデーション試験で確認した。被験物質濃度を試験系に適用し、バリデートされた安定性期間内に用量溶液分析を行った。

1 μM の BCX7353 への曝露後、60%再分極時の APD (APD₆₀) で認められた短縮の程度 (-7.1%~-10.8%) は、いずれの刺激頻度でも (BCL 0.5 及び 1 秒) 統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。90%再分極時 (APD₉₀) の短縮 (-5.2%) も統計的に有意であったが、刺激頻度が BCL 1 秒の場合のみであった。静止膜電位 (RMP) に有意な変化はなかった。活動電位振幅 (APA) は、BCL 0.5 及び 1 秒でそれぞれ -6.6 及び -4.6 mV の有意な低下を示した。いずれの刺激頻度でも、最大立ち上がり速度 (瞬間的電圧変化速度 [dV/dt] max) が有意に低下した。

BCX7353 の濃度 9.4 μM では、APD の有意な変化はなかった。しかし、RMP は統計学的に有意な脱分極を示した (BCL 0.5 及び 1 秒で、それぞれ 1.7 mV 及び 1.3 mV)。APA はさらに低下し (BCL 1 及び 0.5 秒で、それぞれ -39.7 mV 及び -43.7 mV)、dV/dt max は有意に低下した (BCL 1 及び 0.5 秒で、それぞれ -71.4% 及び -86.5%)。

93.7 μM の BCX7353 への曝露後、APD は -14.1%~-31.5% 短縮した。APD₆₀ で認められた短縮の程度 (-16.9%~-31.5%) は、いずれの刺激頻度でも統計学的に有意であった ($p < 0.05$)。但し、APD₉₀ の短縮は BCL 0.5 秒 (-22.9%) においてのみ有意であった。しかし、RMP は統計学的に有意な脱分極を示した (BCL 0.5 及び 1 秒で、それぞれ 36.8 mV 及び 37.3 mV)。APA はさらに有意に低下し (BCL 0.5 及び 1 秒で、それぞれ -86.0 及び -92.2 mV)、dV/dt max のさらなる有意な低下が認められた (BCL 0.5 及び 1 秒で、それぞれ -83.7% 及び -91.0%)。

結論として、BCX7353 は検討した濃度では活動電位の再分極を延長しなかったが、摘出ウサギプルキンエ線維における APA の減少、RMP の脱分極及び dV/dt max の低下が認められた。APA の減少及び dV/dt max の低下は、hNav1.5 の阻害に起因する可能性があり、RMP の脱分極は hKir2.1 の阻害に因る可能性がある。

4.1.4 CHO 細胞に発現させたヒトクローン化イオンチャネルに対する BCX7353 の影響 (150123 試験)

CHO 細胞を用いて、hCav1.2 (ヒトカルシウム電位依存性チャネルサブユニット α_1C [CACNA1C] 遺伝子によってコードされる) 及び hNav1.5 (ピーク) ナトリウムチャネル (ナトリウム電位依存性チャネル α サブユニット 5 [SCN5A 遺伝子] によってコードされる) によって流れる電流に対する BCX7353 の影響を電気生理学的に評価した。全細胞膜電位は自動パッチクランプ法で記録した。各アッセイにおいて、3~5 個の細胞で QPatch HT プラットフォームを用いて BCX7353 の濃度 0.3、1、3、9 及び 28 μM で評価した。ニフェジピン (hCav1.2 ; 1.0 μM) 及びリドカイン (hNav1.5 ; 2000 μM) を陽性対照とした。

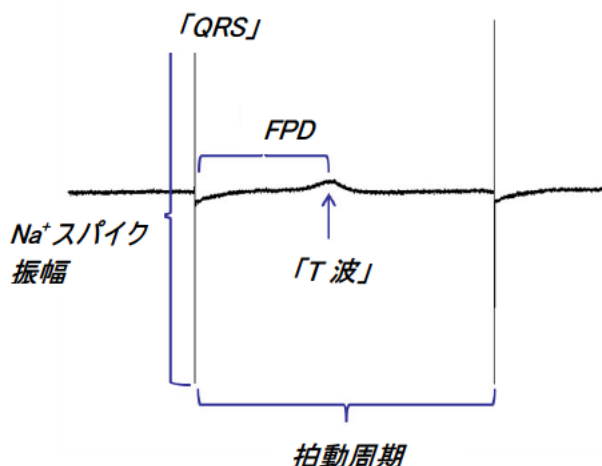
BCX7353 は CHO 細胞に発現させた hCav1.2 チャネルを阻害し、 IC_{50} は $1.296 \mu M$ であった。BCX7353 は hNav1.5 (ピーク) を阻害し、 IC_{50} は $4.79 \mu M$ であった。ニフェジピン及びリドカインによって生じたカルシウム及びナトリウムチャネルの阻害率の平均値は、それぞれ 95.0%及び 81.1%であった。

4.1.5 ヒト幹細胞由来心筋細胞に対する BCX7353 の影響 (150217 試験)

In vitro における幹細胞由来ヒト心筋細胞 (SC-hCM) に対する BCX7353 の影響を自律拍動する心筋細胞の細胞外電位を記録することにより、電気生理学的に評価した。ヒト誘導多能性幹 (hiPS) 細胞由来心筋細胞は、簡単にアクセス可能な電気活性のあるヒト細胞ソースである。複数電極アレイ装置は、これらの細胞から ECG 様の痕跡を記録するプラットフォームとなる。これら 2 つの技術を組み合わせることで、ヒト細胞培養モデルにおける薬剤誘発性電気生理学的変化のミディウムスループット評価が可能となる。

以下に示すように、この技術を用いて電気波形の複数のパラメータを評価できる。図 4.1.5-1 のフローチャートは、単一電極からの代表的な細胞外電位の記録を示している。FPD は Na^+ スパイクから再分極の「T 波」のピークまでの距離で、心電図の QT 間隔の代用値である。拍動周期は、連続した Na^+ スパイク間の距離である。

図 4.1.5-1 代表的な細胞外電位の記録



略語: ECG=心電図; FPD=細胞外電位持続時間; QRS=典型的な心電図上で認められる 3 つの波形の振れを組み合わせたもので、ヒト心臓の左右心室の脱分極及び大きな心室筋の収縮に対応する。

BCX7353 を濃度 0.3、1、3、9 及び $28 \mu M$ で評価した。ベラパミル ($0.01 \sim 1.0 \mu M$) 及びモキシフロキサシン ($10 \sim 1000 \mu M$) を陽性対照物質とした。

BCX7353 の濃度 $0.3 \mu M$ では FPD が有意な増加を示し、4.5%増加した。拍動周期は $1 \mu M$ で有意に延長し、14.2%の延長であった。 $0.3 \mu M$ で補正細胞外電位持続時間 (FPD_c) は有意に増加し、1.9%の増加であった。ナトリウムスパイクの振幅は $1 \mu M$ で 55.0%減少し有意な減少であった。BCX7353 の 3、9 及び $28 \mu M$ の適用後、電気信号は検出されなかった。

陽性対照物質であるモキシフロキサシンにより FPD、 FPD_c 及び拍動周期の延長並びにナトリウムスパイクの振幅の減少が生じ、これは既存データと一致した。陽性対照物質であるベラパミルにより FPD、 FPD_c 及び拍動周期の短縮が生じ、これは既存データと一致した。

これらのデータから、BCX7353 は (遊離体) 濃度 $0.3 \mu M$ (170 ng/mL) 以上で心伝導を変調する可能性が示唆される。

4.1.6 ヒト胎児腎細胞に発現するクローン化ヒト ether-á-go-go 関連遺伝子カリ

ウムチャネルに対する BCX7353 の作用 (190720 試験)

hERG チャネル電流 (急速活性型遅延整流性心臓カリウム電流 I_{Kr} の主たる成分) に対する BCX7353 の *in vitro* 作用を検討した。Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) イニシアチブが推奨する手順に基づき、生理的温度付近 (32~34°C) で濃度反応関係を評価した (CiPA 2019 ; FDA 2019)。陽性対照として、4 物質 (ベラパミル、ラノラジン、クロザピン及びクラリスロマイシン) の作用も評価した。

hERG をコードする遺伝子を導入した HEK-293 細胞を用いた。実験日に細胞を電気生理学記録チャンバーに移し、バッファを用いて 32~34°C で灌流した。電位プロトコールは CiPA イニシアチブに記載されたプロトコールに従った。BCX7353 又は陽性対照物質の各濃度につき 4~5 細胞のデータを記録した。

均一性を確認するため、被験液容器から試料を採取した。この試料を分析した結果、試験開始時点で被験液は全て均一であることが示された。灌流装置の流出物から採取した被験液試料を分析し、濃度を確認した。初めに濃度を 0.3 及び 0.1 μM に調整して分析したが、許容基準を満たさなかった (試料採取中の過失が疑われた)。そこで追加試料を採取し、0.03 及び 1 μM の試料も合わせて分析した結果、検討した全濃度で BCX7353 の濃度測定値は設定濃度の $\pm 15.0\%$ (相対誤差率 $\pm 15.0\%$) の範囲内であったことから、許容基準を満たすことが示された。

評価した BCX7353 及び陽性対照物質の濃度並びに IC_{50} 及び Hill 係数の推定値を表 4.1.6-1 に示す。陽性対照物質であるテルフェナジンの hERG カリウム電流に対する阻害率は、60 nM で $69.8 \pm 4.4\%$ (平均 $\pm$ 標準誤差、 $n=5$) であった。この結果から、本試験系は hERG 阻害に対する感度を有していることが確認された。

表 4.1.6-1 hERG に対する BCX7353 及び陽性対照物質の IC_{50} 及び Hill 係数の推定値
(190720 試験)

化合物 (濃度、 μM)	IC_{50} (μM)	Hill 係数
BCX7353 (0.03、0.1、0.3、1.0)	0.2	1.3
ベラパミル (0.03、0.1、0.3、1.0)	0.3	1.3
ラノラジン (3、10、30、100)	5.1	0.9
クロザピン (0.071、0.71、7.1、71)	1.1	0.9
クラリスロマイシン (0.1206、1.206、12.06、100)	49	0.9

略号：hERG=ヒト ether-á-go-go 関連遺伝子； IC_{50} =50%阻害濃度

4.1.7 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hNav1.5 の遅延性ナトリウム電流

に対する BCX7353 の作用 (190718 試験)

hNav1.5 を安定発現する哺乳類細胞を用いて、遅延性ナトリウム電流 ($I_{Na,L}$) に対する BCX7353 の *in vitro* 作用を検討した。CiPA イニシアチブが推奨する手順に基づき、生理的温度付近 (32~34°C) で濃度反応関係を評価した (CiPA 2019 ; FDA 2019)。陽性対照と

して4物質（ベラパミル、ラノラジン、クロザピン及びクラリスロマイシン）の作用も評価した。

SCN5A (hHNa) をコードする遺伝子を導入した HEK-293 細胞を用いた。実験日に細胞を電気生理学記録チャンバーに移し、バッファーを用いて 32～34℃ で灌流した。電位プロトコールは、CiPA イニシアチブに記載されたプロトコールに従った。BCX7353 又は陽性対照物質の各濃度につき 4～5 細胞のデータを記録した。

均一性を確認するため、被験液容器から試料を採取した。この試料を分析した結果、試験開始時点で被験液は全て均一であることが示された。灌流装置の流出物から採取した被験液試料を分析し、濃度を確認した。この試料の初めの分析結果からは、0.3 μM では BCX7353 の濃度測定値が許容基準を下回り、0.03 μM の試料は許容基準（設定濃度の ±15.0%以内）を上回ることが示された。表面への吸着を抑制するために別の方法を用いて 0.3 μM の試料を再度分析したところ影響は認められず、再分析の結果は許容基準を満たした。実測値濃度を濃度反応関係の確認に使用したため、0.03 μM でより高い濃度の結果による影響はなかった。

評価した BCX7353 及び陽性対照物質の濃度並びに IC₅₀ 及び Hill 係数の推定値を表 4.1.7-1 に示す。遅延性 Nav1.5 電流に対する BCX7353 の阻害作用の IC₅₀ は 0.1 μM (Hill 係数=1.0) であった。

表 4.1.7-1 遅延性 Nav1.5 電流に対する BCX7353 及び陽性対照物質の IC₅₀ 及び Hill 係数の推定値

化合物（濃度、μM）	IC ₅₀ （μM）	Hill 係数
BCX7353 (0.035, 0.1, 0.3, 1)	0.1	1.0
ベラパミル (0.03, 0.1, 0.3, 1.0)	NC ^a	—
ラノラジン (3, 10, 30, 100)	11.1	1.4
クロザピン (0.071, 0.71, 7.1, 71)	4.3	1.4
クラリスロマイシン (0.1206, 1.206, 12.06, 100)	NC ^b	—

略号：Nav1.5＝ナトリウムチャネル；IC₅₀＝50%阻害濃度；NC＝算出せず

^a ベラパミルの IC₅₀ は算出しなかったが、1 μM を超えると推定された。

^b クラリスロマイシンの IC₅₀ は算出しなかったが、100 μM を超えると推定された。

4.1.8 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hNav1.5 のピークナトリウム電流

に対する BCX7353 の作用（190721 試験）

hNav1.5 を安定発現する哺乳類細胞を用いて、ピークナトリウム電流（I_{Napeak}）に対する BCX7353 の *in vitro* 作用を検討した。CiPA イニシアチブが推奨する手順に基づき、生理的温度付近（32～34℃）で濃度反応関係を評価した（CiPA 2019；FDA 2019）。陽性対照として4物質（ベラパミル、ラノラジン、クロザピン及びクラリスロマイシン）の作用も評価した。

SCN5A (hHNa) をコードする遺伝子を導入した HEK-293 細胞を用いた。実験日に細胞を電気生理学記録チャンバーに移し、バッファーを用いて 32～34℃ で灌流した。電位プ

ロトコールは、CiPA イニシアチブに記載された手順に従った。BCX7353 又は陽性対照物質の各濃度につき 4～5 細胞のデータを記録した。

均一性を確認するため、被験液容器から試料を採取した。この試料を分析した結果、試験開始時点で被験液は全て均一であることが示された。灌流装置の流出物から採取した被験液試料を分析し、濃度を確認した。この試料を分析した結果、検討した全濃度で BCX7353 の濃度測定値は設定濃度の±15.0%の範囲内であったことから、許容基準を満たすことが示された。

評価した BCX7353 及び陽性対照物質の濃度並びに IC₅₀ 及び Hill 係数の推定値を表 4.1.8-1 に示す。ピーク Nav1.5 電流に対する BCX7353 の阻害作用の IC₅₀ は 2.4 µM (Hill 係数=1.3) であった。

表 4.1.8-1 Nav1.5 ピーク電流に対する BCX7353 及び陽性対照物質の IC₅₀ 及び Hill 係数の推定値

化合物 (濃度、µM)	IC ₅₀ (µM)	Hill 係数
BCX7353 (0.3、1、3、10)	2.4	1.3
ベラパミル (0.03、0.1、0.3、1.0)	NC ^a	-
ラノラジン (3、10、30、100)	107	0.9
クロザピン (0.071、0.71、7.1、71)	31.3	1.6
クラリスロマイシン (0.1206、1.206、12.06、100)	NC ^b	-

略号：IC₅₀=50%阻害濃度；Nav1.5=ナトリウムチャネル；NC=算出せず

^a ベラパミルの IC₅₀ は算出しなかったが、1 µM を超えると推定された。

^b クラリスロマイシンの IC₅₀ は算出しなかったが、100 µM を超えると推定された。

4.1.9 ヒト胎児腎細胞に発現させたクローン化 hCav1.2 カルシウムチャネルを紹介する電流に対する BCX7353 の影響 (190719 試験)

ヒト Cav1.2 カルシウムチャネルを過剰発現させた CHO 細胞を用いて、*in vitro* における BCX7353 の L 型カルシウム電流 (ICa_L) に及ぼす影響を評価した。CiPA イニシアチブの推奨方法 (CiPA 2019, FDA 2019) に基づき、生理的温度付近 (32~34°C) で濃度反応関係を評価した。4 種類の陽性対照物質 (ベラパミル、ラノラジン、クロザピン及びクラリスロマイシン) の影響も評価した。

hERG をコードする遺伝子をトランスフェクトした HEK-293 細胞を使用した。実験当日、細胞を電気生理学的記録チャンバーに移し、32~34°C の緩衝液で灌流した。電位プロトコールは CiPA イニシアチブの方法に従った。BCX7353 各濃度又は陽性対照物質それぞれについて、4~5 個の細胞のデータを記録した。

均一性を確認するため、被験液容器から試料を採取した。この試料を分析した結果、試験開始時点で被験液は全て均一であることが示された。灌流装置の流出物から採取した被験液試料を分析し、濃度を確認した。この試料を分析した結果、検討した全濃度で BCX7353 の濃度測定値は設定濃度の $\pm 15.0\%$ 以内であったことから、許容基準を満たすことが示された。

BCX7353 及び陽性対照物質の濃度並びに IC_{50} 及び Hill 係数の推定値を表 4.1.9-1 に示す。0.03 μM で認められた有意な負の阻害 (hERG 電流増強) は非定型的であり、特に高濃度で有意な阻害が認められた場合に顕著であった。ただし、hERG の負の阻害が生じて必ずしも QT 間隔が延長すると予測されるわけではない。BCX7353 が hCav1.2 電流に及ぼす阻害作用の IC_{50} は 2.8 μM であった (Hill 係数=2.9)。

表 4.1.9-1 BCX7353 及び陽性対照物質の $Ca_v1.2$ に対する IC_{50} 及び Hill 係数の推定値

化合物 (濃度、 μM)	IC_{50} (μM)	Hill 係数
BCX7353 (1、2、3、10)	2.8	2.9
ベラパミル (0.03、0.1、0.3、1.0)	0.5	0.9
ラノラジン (3、10、30、100)	NC ^a	-
クロザピン (0.071、0.71、7.1、71)	10.8	2.2
クラリスロマイシン (0.1206、1.206、12.06、100)	NC ^a	-

略語: $Ca_v1.2$ = L 型カルシウムチャネル; IC_{50} = 50%阻害濃度; NC = 算出せず

^a ラノラジン及びクラリスロマイシンの IC_{50} は算出しなかったが 100 μM 超と推定された。

4.1.10 BCX7353 の催不整脈リスクのシミュレーション (TD-DEV-20-7353-001 試験)

BCX7353 の 150 mg をヒトに 1 日 1 回 (QD) 投与して血漿中濃度が定常状態にあるとき、また 650 mg を単回投与して治療濃度を上回るときの BCX7353 の催不整脈リスクを評価した。本試験ではイオンチャネルデータの *in silico* モデルを用いた。ヒトイオンチャネル (4.1.7 項)、遅延性 Nav1.5 (4.1.9 項)、hERG (4.1.6 項)、ピーク Nav1.5 及び Cav1.2 (4.1.8 項) に及ぼす BCX7353 の電気生理学的作用を、それぞれ 190718 試験、190719 試験、190720 試験及び 190721 試験で報告されたデータを用いて評価した。イオンチャネルに関する各試験では、陽性対照として使用したベラパミル、ラノラジン、クロザピン及びクラルリスロマイシンのデータも評価した。各物質を濃度反応曲線に当てはめ、IC₅₀ の負の対数 (pIC₅₀) 及び Hill 係数を推定した。各実験につき 2 種類の回帰モデルに当てはめた。モデル 1 では、Hill 係数を 1 と仮定して pIC₅₀ を推定した。モデル 2 では、pIC₅₀ と Hill 係数の両者を当てはめた。濃度反応データポイント上のノイズは正規分布すると仮定したときの pIC₅₀ 及び Hill 係数のベイズ推定及び標準偏差の推定に基づき、PyHillFit ソフトウェア (Johnstone 2016 ; CardiacModelling2020) を用いて用量反応曲線への当てはめを実施した。

再分極電流による心室の正味電荷 (qNET) (Dutta 2017) 及び qNET の関数である Torsade metric score (TMS) (Li 2019) を算出するため、コンピュータモデルシミュレーションで pIC₅₀ と Hill 係数のデータを用いた。

qNET が心室活動電位の再分極相の間に活動中の様々な電流 (によりもたらされた総電荷) の積分であるとき (Li, Dutta et al. 2017)、所定濃度 [C] での TMS は、[C] ~ [4*C] の (線形) 範囲の平均 qNET である (Chang 2017 ; Li 2019)。様々な濃度の BCX7353 について算出した結果を図 4.1.10-1 に示す。血漿タンパク質に結合する薬物は通常イオンチャネルを遮断する部位へ到達できないと考えられる (hERG を含む多くのチャネルは、結合が細胞内ドメインから生じる傾向にあり、制約を受けずにポアドメインに達する必要がある) (Vandenberg 2017) ため、いずれの場合にも「遊離 C_{max}」 (最高薬物濃度) 又は「治療用量での血漿中遊離薬物濃度」をプロットしている。BCX7353 は血漿タンパク質に結合しやすい。

TMS が 1 µM 付近で増加する場合、hERG の強い遮断 (pIC₅₀ 6.79) は、ほぼ全体の濃度範囲 (0.01~0.3 µM) にわたり遅延性 Nav1.5 電流が遮断される (pIC₅₀ 6.98) ことで均衡が保たれる。その後、カルシウム遮断作用 (pIC₅₀ 5.56) も始まる。このような代償作用は hERG 遮断作用の相殺において極めて重要である。万が一 BCX7353 の作用が hERG 遮断のみであった場合、0.05 µM 付近で高リスクカテゴリーに入る。陽性対照物質の pIC₅₀ 及び Hill 係数を FDA データセット (FDA/CiPA 2018) から入手した。クラルリスロマイシン及びクロザピンについて、FDA データと試験から得られた pIC₅₀ 及び Hill 係数のデータはおおむね一致した (表 4.1.10-1) ことから、TMS 値及びリスク分類の点で両データセットは極めてよく一致する。ベラパミルは最新データで中リスクカテゴリーに属するが、信頼区間が広いことから、イオンチャネル作用の重複のため「低リスク」カテゴリーに入る可能性が高い。同様に、ラノラジンは FDA での pIC₅₀ 値によると低リスクであるが、本試験のデータからは高リスク (ただし、中リスクに近い) であると言える。逆に、臨床的に意義のある遊離薬物濃度 (HAE 予防に推奨される用法である 150 mg QD 投与を健康成人被験者に実施したときの遊離薬物濃度 0.0037 µM から、治療用量を超える 450 mg を投与したときの遊離薬物濃度である 0.013 µM まで) の BCX7353 は主に低リスクカテゴリーにあり、高リスク域には入っていない。また BCX7353 の TMS は、ラノラジン、クロザピ

ン及びクラリスロマイシンの FDA データ及び新たに得られたデータからのシミュレーションに比べ低リスク域にあることが示された。BCX7353 の TMS データを表 4.1.10-2 に要約し、図 4.1.10-2 に示す。

表 4.1.10-1 試験及び FDA データから得た pIC_{50} 及び Hill 係数

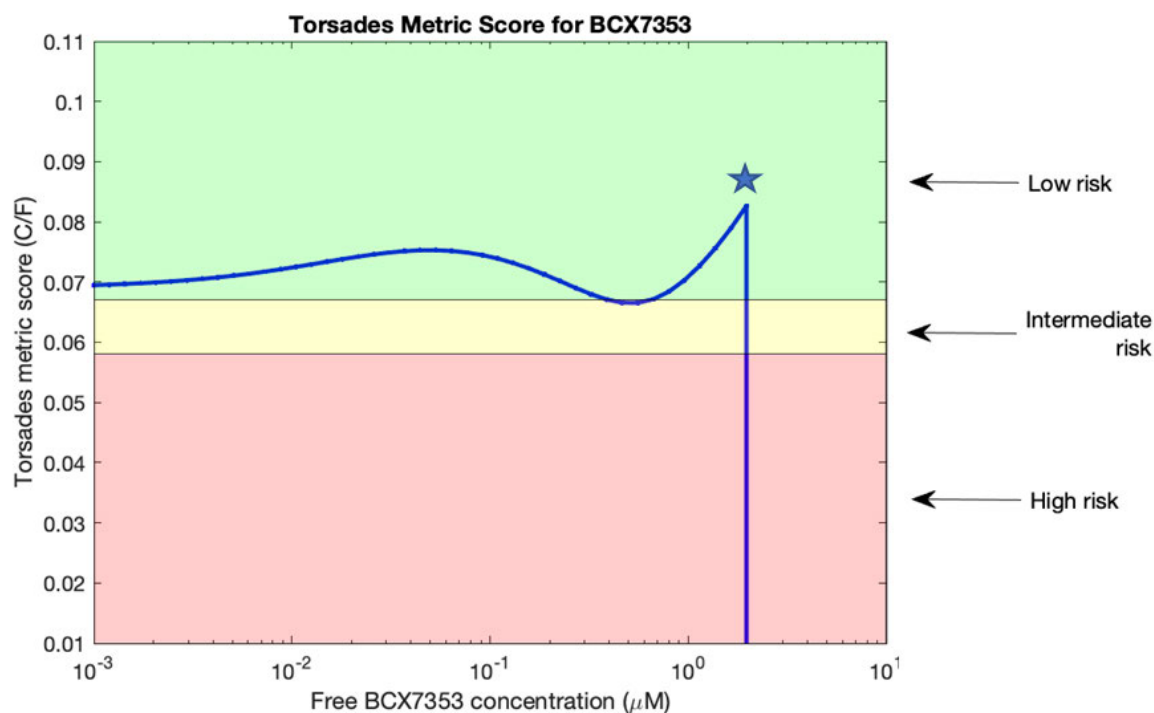
チャネル及び化合物	試験データ		FDA データ	
	pIC_{50}	Hill 係数	pIC_{50}	Hill 係数
hERG				
BCX7353	6.79	1	NA	NA
クラリスロマイシン	4.31	1	4.21	0.71
クロザピン	5.96	0.86	5.58	0.73
ラノラジン	5.28	1	5.19	0.84
ベラパミル	6.48	1.27	6.30	1.10
Cav1.2				
BCX7353	5.56	2.89		
クラリスロマイシン	3.56 ^a	1	4.42	0.87
クロザピン	4.86	1	5.26	0.92
ラノラジン	3.3 ^a	1	-	-
ベラパミル	6.3	1	6.70	1.10
Nav1.5 (ピーク)				
BCX7353	5.63	1		
クラリスロマイシン	3.24 ^a	1	2.96	0.89
クロザピン	4.5	1.6	3.59	0.58
ラノラジン	4.01	1	4.16	1.42
ベラパミル	5.21 ^a	1	-	-
Nav1.5 (遅延)				
BCX7353	6.98	1		
クラリスロマイシン	3.84 ^a	1	2.52	1.31
クロザピン	5.37	1.34	4.11	1.34
ラノラジン	4.95	1.35	5.10	0.94
ベラパミル	5.7	1	5.15	1.03

略語：Cav1.2 = L 型カルシウムチャネル；FDA = 米国食品医薬品局； IC_{50} = 50%阻害濃度；NA = 該当なし；

Nav1.5 = ナトリウムチャネル、 pIC_{50} = IC_{50} の負の対数

^a pIC_{50} は測定濃度を上回る（外挿）が、これらの値を用いたシミュレーションは全て、実際に測定した低濃度範囲内の濃度反応曲線からの評価（内挿）に基づく。

図 4.1.10-1 血漿中遊離薬物濃度の関数としての BCX7353 の TMS



略語：C/F = クーロン／ファラド；CiPA = 包括的 in vitro 催不整脈アッセイ；TMS = Torsade Metric Score

注：

0.5 Hz で O'Hara-Rudy CiPA v1 モデルを測定した結果に基づく。

星印は、この値の 1～4 倍の範囲（これは高リスクとみなす）内の 1 濃度で十分な活動電位が発生しなかったために TMS が算出できなかったポイントを示し、このポイントからの垂線は濃度を示す（2 μM、この濃度の 4 倍である 8 μM での失敗を示す）。

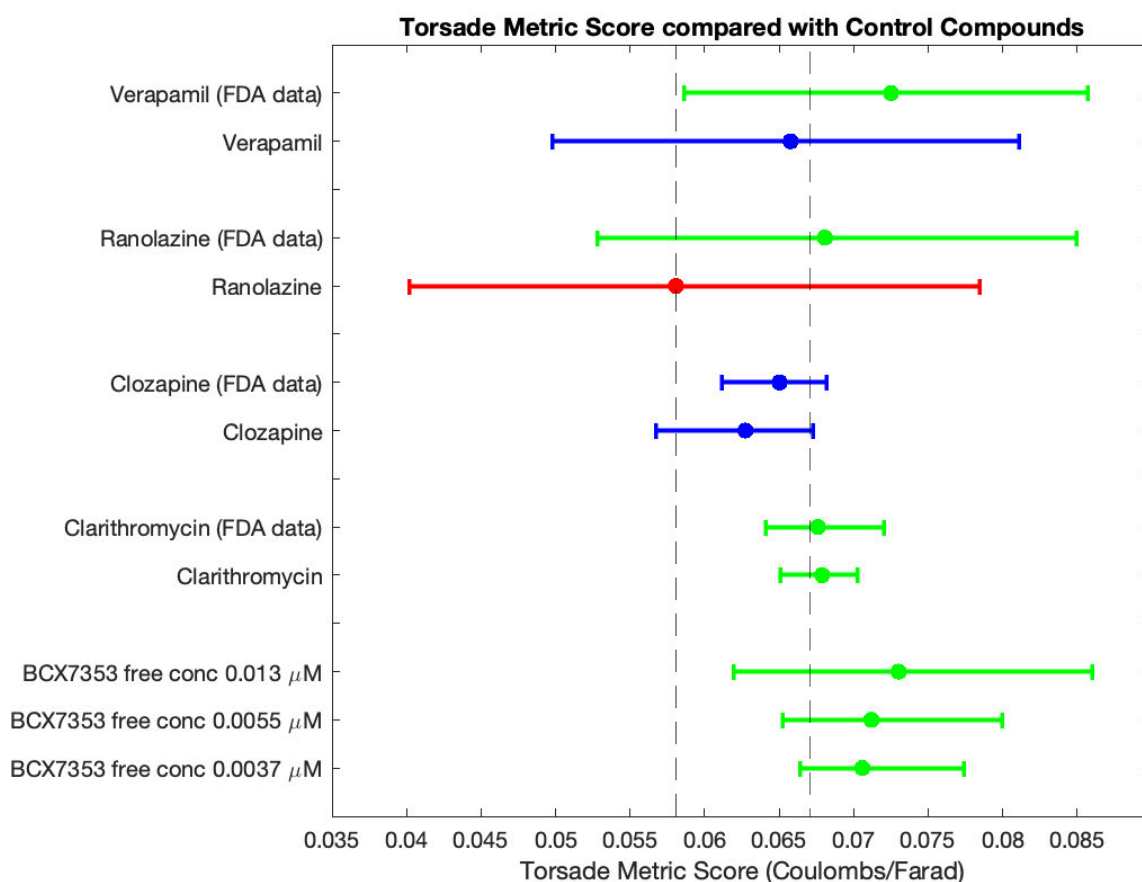
表 4.1.10-2 BCX7353 及び対照物質の TMS データ

試験物質	TMS (C/F)		
	中央値	95%信頼区間下限値	95%信頼区間上限値
ベラパミル (FDA データ)	0.0725	0.0586	0.0857
ベラパミル	0.0658	0.0498	0.0811
Ranolazine (FDA データ)	0.0681	0.0528	0.0850
Ranolazine	0.0581	0.0402	0.0785
クロザピン (FDA データ)	0.0650	0.0611	0.0682
クロザピン	0.0627	0.0567	0.0673
クラリスロマイシン (FDA データ)	0.0676	0.0641	0.0721
クラリスロマイシン	0.0679	0.0651	0.0703
BCX7353 遊離濃度 0.013 μ M	0.0730	0.0619	0.0860
BCX7353 遊離濃度 0.0055 μ M	0.0712	0.0653	0.0800
BCX7353 遊離濃度 0.0037 μ M	0.0706	0.0664	0.0774

略語：C/F = クーロン／ファラド；FDA = 米国食品医薬品局；TMS = Torsade Metric Score

注：FDA データとして示していないデータは全て試験データ。

図 4.1.10-2 臨床的に意義のある濃度での BCX7353（遊離薬物）及び対照物質の TMS



略語：CiPA = 包括的 in vitro 催不整脈アッセイ；conc = 濃度；FDA = 米国食品医薬品局；TMS = Torsade Metric Score

注：

- 各薬剤の 95%信頼区間を示す。
- 緑色は低リスクの平均値／期待値、青色は中リスク、赤色は高リスク。
- 縦の点線は、自動パッチランブに関する CiPA 検証論文 ([Li 2019](#)) で用いられている低リスクと中リスクの境界及び中リスクと高リスクの境界を示す。

結論として、BCX7353 は混合イオンチャネル遮断薬であるため、トルサード・ド・ポワント (TdP) リスク分類が重要であり、QT 間隔は完全な予測因子ではない ([Sager 2014](#)；[Colatsky 2016](#))。しかし、予想される臨床的に意義のある血漿中濃度（最高遊離薬物濃度 0.013 μM が予想される治療用量を超える用量である 450 mg QD を含む）において、BCX7353 の TMS は良好な信頼性で低リスクであった。高濃度（最高 1 μM の遊離薬物）では、シミュレーション出力は低リスクカテゴリー内か、低／中リスクの境界付近に留まっていることから、遅延／持続 $\text{NaV}1.5$ による hERG 遮断及び程度は低い L 型カルシウム遮断との相殺に強く依存している。

4.2 In Vivo 試験

4.2.1 ラットを用いた BCX7353 経口投与による呼吸器系への影響の評価（124 試験）

124 試験）

BCX7353 の呼吸器系への影響を評価するため、覚醒ラットを用いて呼吸機能に対する作用を検討する試験を実施した。雄 Wistar-Han (WH) ラット 1 群 8 例から成る 3 つの投与群に、被験物質を 25、100 又は 450 mg/kg の用量レベルで投与液量を 5 mL/kg として単回投与した。高用量は毒性試験 (111 試験) から選択した；450 mg/kg は単回投与時の最大耐容量であり、この用量で摂餌量及び体重増加のわずかな減少が認められた。雄ラット 8 例の 1 群を追加して対照群動物とし、溶媒の水を投与した。

全動物の死亡、病的状態、損傷、摂餌量及び摂水量について、1 日 2 回の観察を行った。一般状態の観察を投与前、投与後約 90 分及び呼吸器モニタリング期間終了後（投与後約 4 時間）に実施した。投与日の投与前に体重を測定し記録した。呼吸機能（呼吸数、一回換気量及び分時換気呼吸量）のモニタリングは、ベースライン値の確立のため、投与前 1 時間以上及び投与後 4 時間以上にわたって実施した。呼吸モニタリング期間後、全例を安楽死させ、それ以上の後の評価は行わず屍体は廃棄した。

雄ラットにおいて、BCX7353 の 25、100 又は 450 mg/kg の単回経口投与で、死亡例はなく、一般状態あるいは呼吸機能に影響を及ぼさなかった。

4.2.2 ラットを用いた BCX7353 経口投与による神経行動学的評価（123 試験）

本試験の目的は、覚醒ラットを用いて被験物質 BCX7353 の急性神経行動毒性の可能性を評価することであった。雄 WH ラット 1 群 10 例から成る 3 つの投与群に、BCX7353 を 25、100 又は 450 mg/kg の用量レベルで投与液量を 5 mL/kg として投与した。高用量は毒性試験

から選択した (■111 試験; 4.2.1 項参照)。雄性ラット 10 例の 1 群を追加して対照群動物とし、溶媒の水を投与した。

全動物で死亡、病的状態、損傷、摂餌量及び摂水量について、1 日 2 回の観察を行った。機能観察バッテリー (FOB) 評価を投与前 (Day 1) 及び投与後約 1.5 及び 24 時間に実施した。各 FOB 評価に続き、同時点で一般状態の観察を実施した。

FOB で評価したパラメータには、次のパラメータ (これ以外のパラメータも評価) が含まれた: 活動性及び覚醒、姿勢、養育、奇矯行動、間代性及び強直動動、歩行、運動性、常同行動、正向反射、刺激 (近づく、舌打ち、尾を挟む、触れる) に対する反応、眼瞼閉鎖状態、瞳孔反応、立毛、眼球突出、流涙、流涎及び呼吸。排便及び排尿量とその定性的及び/又は定量的な測定値も記録した。前肢及び後肢握力並びに後肢の開脚を定量的に測定した。各ラットを $52\pm 1^{\circ}\text{C}$ に設定したホットプレート装置に乗せた場合の侵害 (熱) 刺激に対する反応潜時を測定することにより痛覚を評価した。Day 1 の投与前に体重を測定し記録した。試験終了時に全例を安楽死させ、それ以上の評価は行わず屍体は廃棄した。

雄ラットにおいて、BCX7353 の 25、100 又は 450 mg/kg の単回経口投与により、死亡はなく、一般状態又は神経行動測定値に影響は認められなかった。

4.2.3 カニクイザルを用いた BCX7353 経口投与による心血管系への影響

(■115 試験)

本試験は、覚醒下無拘束のカニクイザルを用いて、BCX7353 の心血管系への影響を評価するために実施した。ラテン方格法に従って同一の雌サル 4 例に溶媒の水及び BCX7353 の 15、50 及び 150 mg/kg を 10~14 日間のウォッシュアウト期間を設け、各個体に全ての用量レベルの投与を行った。用量レベルは用量設定 (DRF) 毒性試験 (■116 試験) のデータに基づいて選択した。体温、血圧 (BP)、心拍数 (HR) 及び心電図測定のため、事前にサルに無線送信機を装着した。体温、収縮期、拡張期及び平均動脈血圧並びに心拍数、心電図パラメータ (QRS 幅及び RR、PR 及び QT 間隔) のモニタリングを投与の少なくとも 2 時間以上前から投与の少なくとも 72 時間以上後まで継続した。心電図トレースは指定された時点で心血管モニタリングデータから印刷し、委員会認定の心臓専門獣医によって定性的に評価された。試験における初回投与に先立ち、無投与のサルの心血管系評価項目の継続的なモニタリングを少なくとも 24 時間以上実施した。これらのデータは、試験期間を通して QTc 間隔の算出に用いた。

全動物で死亡、病的状態、損傷、摂餌量及び摂水量について 1 日 2 回以上の観察を行った。一般状態の観察を、投与前、投与後約 4 時間及び心血管モニタリング期間終了後に実施した。被験物質の血漿中濃度を測定するため、投与後約 4 時間に全動物から血液試料を採取した。

雌サルに 15、50 又は 150 mg/kg の BCX7353 を単回経口投与したところ、死亡例はなく、体重及び体温には影響を及ぼさなかった。試験期間を通して、被験物質に関連した一般状態として嘔吐/吐物及び水様便が認められた。150 mg/kg 投与後、嘔吐が投与後約 3 分に 4 例中 1 例で認められ、吐物が投与後 4 時間に 4 例中 2 例、投与後約 21 時間に 4 例中 1 例で認められた。150 mg/kg 投与後 4 時間には水様便も 4 例中 2 例で認められた。50 mg/kg 投与後、吐物が投与後 21 時間に 4 例中 2 例で認められた。

150 mg/kg 投与後の最初の 48 時間以内に、BP 及び HR の軽度減少並びに心電図上の間隔 (RR、PR、QT 間隔、QRS 幅及び QTc) の増大が認められた。Day 3 (投与後 48~72 時間) にも 1 例で心拍数、RR、PR 及び QT/QTc 間隔並びに QRS 幅に同様の変化が認められた。また、50 mg/kg 投与後の最初の 48 時間以内に PR 及び QT/QTc 間隔並びに QRS 幅の増大が

認められた。全ての変化は主に夜間に認められ、比較的軽微であった。平均血圧の減少又は ECG 間隔パラメータの上昇の最大値は、対照と比較して、概ね 11%未満であった。従って、本試験で検討した心血管系の評価項目については、BCX7353 の経口投与により 150 mg/kg 以下の用量ではサルに対して有害な影響はなかった。サル DRF 毒性試験 (■16 試験) では、150 mg/kg を単回投与したところ、平均血漿中曝露量 (最高血漿中薬物濃度 [C_{max}]) 及び 0~24 時間の濃度-時間曲線下面積 (AUC_{0-24}) が、それぞれ 852 ng/mL 及び 15600 ng·h/mL であった。

5 薬力学的薬物相互作用

BCX7353 を用いた薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施されていない。

6 考察及び結論

BCX7353 は、低分子のヒト血漿カリクレインの強力な阻害剤であり、HAE を有する成人及び青年患者における血管性浮腫の発作抑制を適応とした承認取得を目指している。BCX7353 のような経口投与可能な低分子によるカリクレインの長期間の阻害は、HAE 患者における血管性浮腫の急性発作の発現を減少させることにより、有意な治療効果をもたらすことが期待される。

薬理試験では、BCX7353 は血漿フリー溶液中の標準単離酵素アッセイにおいて、ヒト血漿カリクレイン活性の強力かつ特異的な阻害剤であることが示された ($K_i=0.44$ nM)。その他の各種セリンプロテアーゼに対する BCX7353 の IC_{50} は、血漿カリクレインに対する BCX7353 の IC_{50} (0.88 nM) の約 4500 倍～56000 倍超であった。さらに、BCX7353 はその標的環境であるヒト血漿中で活性を示し、カリクレイン活性を強力に阻害する ($EC_{50}=5.4$ nM)。BCX7353 は、ヒト、サル及びラットの血漿カリクレインを同様の効力で阻害し、これはカリクレイン系における薬理が動物種間で類似していることを示唆し、BCX7353 の毒性評価におけるラット及びサルの使用を裏付ける。

BCX7353 は HUVEC における HK/PKK 依存性 BK 産生の強力な阻害剤で (平均 $EC_{50}=5.56$ nM)、BCX7353 は内皮細胞による接触因子系の活性化後に BK 産生を強力に抑制することが示された。

HAE 患者 14 例から採取した個々の血漿試料中のカリクレイン活性の BCX7353 による阻害の IC_{50} は、11.7～20.0 nM の範囲であった (平均 $EC_{50}=15.9$ nM)。この蛍光アッセイは、薬物反応関係及び曝露量反応関係を判断するための標的薬物効果の PD バイオマーカーとしての BCX7353 の臨床開発プログラムで用いられてきた。

BCX7353 は内因性凝固経路の上流調節因子を阻害するため、血漿凝固アッセイにおいて BCX7353 の凝固に対する作用を評価した。ヒト血漿を用いた標準的な凝固アッセイにおいて、非常に高い濃度で PT 及び aPTT の延長が認められた (PT の 2 倍延長は 100 μ M [56.2 μ g/mL] までの濃度では認められなかった; aPTT の 2 倍延長は 73.4 μ M [41.3 μ g/mL] で認められた)。PT 及び aPTT の著しい延長は、異常出血のリスク増大 (すなわち抗凝固作用) と関連している可能性が高い。このような作用は毒性試験でも、臨床試験でも認められなかった (m2.7.4)。BCX7353-106 試験における BCX7353 150 mg 投与後の定常状態の C_{max} (算術平均値) は 162 ng/mL であった。BCX7353 10 μ M (5630 ng/mL) は *in vitro* で PT に対して全く影響を及ぼさず (BR 7353 003 試験)、PT へのいかなる影響に対しても広い安全域 (34 倍超) を示した。

安全性薬理試験では、BCX7353 が呼吸器系及び CNS に影響を及ぼす可能性が低いことが示されている。ラット中枢神経系及び呼吸器系の安全性薬理試験における BCX7353 の無影響量 (NOEL) は、評価した最高用量である 450 mg/kg であった。

BCX7353 の心血管系に対する作用、特に QT 間隔延長の可能性の評価について、一連の *in vitro* 試験を実施した。最初の試験 (150123 試験) で、BCX7353 は hERG チャンネルを $IC_{50} = 0.29$ μ M で阻害することが示された。続くイオンチャンネル実験 (150123 試験) でピーク $Nav1.5$ 及び $Ca_v1.2$ の阻害について検討したところ、BCX7353 はこれらのチャンネルをそれぞれ IC_{50} 4.79 及び 1.30 μ M で阻害した。従って、BCX7353 は混合イオンチャンネル阻害作用を有しており、ウサギ心筋プルキンエ線維試験で APD に影響がなかったことはこれで説明できる可能性がある。このプルキンエ線維試験において、BCX7353 は hERG チャンネルの遮断に要する濃度の 300 倍にあたる 93.7 μ M という高濃度においても影響を及ぼさなかった。APD に及ぼす影響の欠如は、hERG と L 型カルシウムチャンネル双方を阻害することによるものである可能性がある。これら 2 つのチャンネルの阻害は降圧剤ベラパミルにもみ

られる特性であり、ベラパミルが TdP を起こしやすいことはないようである (Redfern 2003)。

組換え細胞株を用いた薬物-心臓イオン変化相互作用の検討のための推奨電位プロトコールに関する新たな FDA ガイドライン (FDA 2019) に準拠するため、さらにイオンチャネル試験を実施した。これらの新しい試験では、hERG (190720) 、ピーク Nav1.5 (190721) 及び Cav1.2 (190719) に加えて、遅延性 Nav1.5 (190718) についても検討した。これらの試験により、BCX7353 のピーク Nav1.5 及び Cav1.2 阻害剤としての効力が確認され、BCX7353 が遅延性 Nav1.5 (IC₅₀ 0.1 μM) を hERG (IC₅₀ 0.2 μM) に対するよりもやや強く阻害することが示された。これら全てのイオンチャネル試験の概要を表 6-1 に示す。以上をまとめると、BCX7353 による hERG 阻害は QT 間隔を延長させる可能性があるものの、この作用は遅延性 Nav1.5 と Cav1.2 の阻害によって相殺される。このような特性は降圧剤ラノラジンと同様である (Antzelevitch 2004)。イオンチャネルデータの *in silico* モデルでは、BCX7353 が臨床的に意義のある血漿中濃度で不整脈を引き起こすリスクは低いことが確認された。

表 6-1 各種 *in vitro* イオンチャネル試験における BCX7353 の IC₅₀ 及びアッセイ情報の概要

チャネル	方法	電気生理学的手法	温度 (°C)	IC ₅₀ (μM)	試験番号
hERG	受託機関の SOP	全細胞パッチクランプ (Multiclamp 700A 増幅器)	34.4 - 36.0	0.3	125
	CiPA プロトコール変法 ^a	全細胞パッチクランプ (Axopatch 200B 増幅器)	32 - 34	0.2	190720
ナトリウム (hNav1.5) (ピーク) 電流	受託機関の SOP	全細胞パッチクランプ (QPatch HT システム)	RT	5.15	150123
	CiPA プロトコール変法 ^a	全細胞パッチクランプ (Axopatch 200B 増幅器)	32 - 34	2.4	190721
ナトリウム (hNav1.5) (遅延) 電流	CiPA プロトコール変法 ^a	全細胞パッチクランプ (Axopatch 200B 増幅器)	32 - 34	0.1	190718
L 型カルシウム (hCav1.2) 電流	受託機関の SOP	全細胞パッチクランプ (QPatch HT システム)	RT	1.3	150123
	CiPA プロトコール変法 ^a	全細胞パッチクランプ (Axopatch 200B 増幅器)	32 - 34	2.8	190719

略号: CHO = チャイニーズハムスターの卵巣; CiPA = 包括的 *in vitro* 催不整脈アッセイ; hERG = ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子; hNav1.5 = CHO 細胞に発現したクローン化ヒトナトリウムチャネル 1.5; IC₅₀ = 50%阻害濃度; NR = 報告なし; RT = 室温 (約 23°C); SOP = 標準操作手順書

^a 試験方法は現在の CiPA 電位チャネルプロトコール (2019 年 9 月 18 日発表版) に基づくもので、温度は生理的温度付近 (32~34°C) とした。

心臓の電気生理学的パラメータに対する BCX7353 の影響に関する薬理データを表 6-2 に要約する。選択性マージンは、ヒトカリクレイン酵素に対する親和性 (0.88 nM) 並びに健康被験者及び HAE 患者血漿中酵素の阻害 (それぞれ 5.4 及び 15.9 nM) に対して算出されている。これらの計算の結果、ヒト血漿中酵素阻害に対する選択性は、BCX7353 のタンパク結合率が 3 µM での測定から推定 98.7%と高く計算ができないため、大幅に過小評価されている可能性が高い (P1R2_試験 3)。

表 6-2 BCX7353 心臓電気生理学的データ

	IC ₅₀ (µM)	ヒト単離酵素親和性(0.88 nM)に対する選択性マージン	ヒト血漿中カリクレイン阻害 (5.4 nM) に対する選択性マージン	HAE 患者の血漿中カリクレイン阻害 (15.9 nM) に対する選択性マージン
hERG ^a	0.29-	329	53	18
APD ^b	> 93.7-	> 100,000	> 17,351	> 5,893
hCav1.2	1.3	1,477	240	82
hNav1.5 (ピーク)	4.79-	5,443	887	301
FPD ^c	0.3- ^d	341	55	18

略語: APD=活動電位持続時間; CHO=チャイニーズハムスター卵巣; FPD=細胞外電位持続時間; hCav1.2=CHO 細胞に発現させたクローン化ヒト L 型カルシウムチャンネル 1.2; hNav1.5=CHO 細胞に発現させたクローン化ヒト ナトリウムチャンネル 1.5; HAE = 遺伝性血管性浮腫; -HEK=ヒト胎児腎; hERG=ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル関連遺伝子; IC₅₀=50%阻害濃度

- a HEK293 細胞に発現させた hERG チャンネル。
- b ウサギ心筋プルキンエ線維における APD。
- c ヒト幹細胞由来心筋細胞の FPD。
- d アッセイにおける最小有効薬理濃度。

BCX7353 の心血管系に対する潜在的影響の詳細な評価が実施され、その結論は被験者に対する BCX7353 の安全な投与を裏付けるものである。テレメトリー装置を装着した覚醒下のサルにおける心血管系安全性の無毒性量は 150 mg/kg で、ヒト等価用量は 2903 mg であった。150 mg の単回又は反復投与後のヒトにおける曝露量 (C_{max} 及び AUC₀₋₂₄) を表 6-3 に示した。サル単回投与毒性試験 (116 試験) では、150 mg/kg の単回投与による C_{max} 及び AUC₀₋₂₄ は、それぞれ 852 ng/mL 及び 15600 ng·h/mL であった (表 6-3)。曝露量の比較検討から、ヒトへの投与における安全域が大きいことが示された。さらに、サルに 80 mg/kg/日の用量で 39 週間投与したときに、心電図所見に影響は認められなかった (162 試験)。39 週間投与後の C_{max} 及び AUC₀₋₂₄ はそれぞれ 692 ng/mL 及び 13500 ng·h/mL であった。従って、*in vitro* 及び *in vivo* の情報全体を勘案し、かつ *in silico* モデル解析の結果も併せて考えると、ヒトでの心電図に影響を及ぼす可能性は低く、ヒトを対象とした臨床試験で厳密に評価されている (m2.7.2 参照)。

表 6-3 BCX7353 の安全性薬理試験の用量において想定される安全域

動物種	用量 ^a	曝露量 C _{max} /AUC ₀₋₂₄ (ng/mL)/(ng.h/mL)	ヒト 150 mg SD 後の 曝露量に対する 曝露量比	ヒト 150 mg QD 後の 定常状態での曝露量 に対する曝露量比
ラット	450 mg/kg	557/11600 ^b	11.1/23.9	3.4/4.1
サル	150 mg/kg	852/15600 ^c	17.0/32.2	5.3/5.5
ヒト	150 mg SD	50/485 ^d	NA	NA
	150 mg QD × 14 日間	162/2850 ^e	NA	NA

略語：AUC₀₋₂₄ = 0～24 時間の濃度-時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、NOEL = 無影響量、QD = 1 日 1 回投与、SD = 単回投与

^a ラット及びサルの用量は NOEL

^b 806-111 試験の雄のデータ

^c 雌雄各 1 例の平均値 (■ 116 試験)

^d BCX7353-106 試験で得られた初回投与後のヒト曝露量 (算術平均値)

^e BCX7353-106 試験で得られた 14 回投与後のヒト曝露量 (算術平均値)

また、安全性薬理試験では、BCX7353 が呼吸器系及び中枢神経系に影響を及ぼす可能性が低いことも示唆されている。ラットでは、呼吸器系及び中枢神経系の安全性の NOEL は 450 mg/kg (ヒト等価用量 4355 mg) であった。曝露量の比較検討から (表 6-3)、ヒトに 150 mg を 1 日 1 回投与したときの安全域も十分である。

結論として、非臨床薬理試験では BCX7353 が血漿中カリクレインの強力かつ特異的な阻害剤であることが確認され、HAE 患者における BCX7353 の安全な投与を可能にする治療指数を有する可能性が示唆されている。また、BCX7353 は許容可能な薬理学的安全性プロファイルを有し、HAE を有する成人及び青年患者における血管性浮腫の発作抑制治療としての BCX7353 の承認を裏付ける。

7 表及び図

図表は上記本文中に組み込んだ。

8 参考文献

- 1) Antzelevitch, C., L. Belardinelli, A. C. Zygmunt, A. Burashnikov, J. M. D. Diego, J. M. Fish, J. M. Cordeiro and G. Thomas (2004). "Electrophysiological Effects of Ranolazine, a Novel Antianginal Agent With Antiarrhythmic Properties" Am Heart J Circulation 2004;110:904-910
- 2) CardiacModelling. (2020). "Cardiac Modelling/PyHillFit." Retrieved 11 June 2020, 2020, from www.github.com/CardiacModelling/PyHillFit
- 3) Chang, K. C., S. Dutta, G. R. Mirams, K. A. Beattie, J. Sheng, P. N. Tran, M. Wu, W. W. Wu, T. Colatsky, D. G. Strauss and Z. Li (2017). "Uncertainty Quantification Reveals the Importance of Data Variability and Experimental Design Considerations for in Silico Proarrhythmia Risk Assessment." Front Physiol 8: 917.
- 4) CiPA. (2019, 2019). "CiPA." Retrieved 11 June 2020, 2020, from <https://cipaproject.org/>
- 5) Colatsky, T., B. Fermini, G. Gintant, J. B. Pierson, P. Sager, Y. Sekino, D. G. Strauss and N. Stockbridge (2016). "The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative - Update on progress." J Pharmacol Toxicol Methods 81: 15-20.
- 6) Dutta, S., K. C. Chang, K. A. Beattie, J. Sheng, P. N. Tran, W. W. Wu, M. Wu, D. G. Strauss, T. Colatsky and Z. Li (2017). "Optimization of an In silico Cardiac Cell Model for Proarrhythmia Risk Assessment." Front Physiol 8: 616.
- 7) FDA. (2019, 18 September 2019). "Recommended voltage protocols to study drug-cardiac ion channel interactions using recombinant cell lines." Retrieved 10 June 2020, 2020, from <https://www.fda.gov/media/131157/download>.
- 8) FDA/CiPA. (2018). "CiPA/AP_simulation/data." Retrieved 11 June 2020, 2020, from https://github.com/FDA/CiPA/tree/Model-Validation-2018/AP_simulation/data.
- 9) Johnstone, R. H., R. Bardenet, D. J. Gavaghan and G. R. Mirams (2016). "Hierarchical Bayesian inference for ion channel screening dose-response data." Wellcome Open Res 1: 6.
- 10) Kolte D, Bryant JW, Holsworth D, Wang J, Akbari P, Gibson GW, Shariat-Madar Z. Biochemical characterization of a novel high-affinity and specific plasma kallikrein inhibitor. British Journal of Pharmacology. 2011;162:1639-49.
- 11) Li, Z., B. J. Ridder, X. Han, W. W. Wu, J. Sheng, P. N. Tran, M. Wu, A. Randolph, R. H. Johnstone, G. R. Mirams, Y. Kuryshv, J. Kramer, C. Wu, W. J. Crumb, Jr. and D. G. Strauss (2019). "Assessment of an In Silico Mechanistic Model for Proarrhythmia Risk Prediction Under the CiPA Initiative." Clin Pharmacol Ther 105(2): 466-475.
- 12) Li, Z., S. Dutta, J. Sheng, P. N. Tran, W. Wu, K. Chang, T. Mdluli, D. G. Strauss and T. Colatsky (2017). "Improving the In Silico Assessment of Proarrhythmia Risk by Combining hERG (Human Ether-a-go-go-Related Gene) Channel-Drug Binding Kinetics and Multichannel Pharmacology." Circ Arrhythm Electrophysiol 10(2): e004628.
- 13) Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R, Camm AJ, Hammond TG. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical qt interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: Evidence for a provisional safety margin in drug development. Cardiovasc Res. 2003;58:32-45.
- 14) Sager, P. T., G. Gintant, J. R. Turner, S. Pettit and N. Stockbridge (2014). "Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium." Am Heart J 167(3): 292-300.
- 15) Vandenberg, J. I., E. Perozo and T. W. Allen (2017). "Towards a Structural View of Drug Binding to hERG K(+) Channels." Trends Pharmacol Sci 38(10): 899-907.

オラデオカプセル 150 mg

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.3 薬理試験の概要表

株式会社オーファンパシフィック

1 薬理試験：一覧表

被験物質：BCX7353

試験の種類／説明	試験系	投与方法	試験実施施設	GLP ^a	試験／ 報告書番号
効力を裏付ける試験					
ヒト血漿カリクレインの阻害	<i>in vitro</i> ；精製酵素アッセイ	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	BR-7353-001
ヒトセリンプロテアーゼの阻害（選択性）	<i>in vitro</i> ；精製酵素アッセイ	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	BR-7353-002
ヒトカリクレイン活性の阻害を測定するアッセイの開発	<i>in vitro</i> ；ヒト血漿ベースアッセイ	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	TD-BR-18-002-DEV
ヒトカリクレイン活性の阻害を測定するアッセイの適格性確認	<i>in vitro</i> ；ヒト血漿ベースアッセイ	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	TD-BR-18-002-VAL
クエン酸緩衝液中のヒト HAE 患者の血漿における BCX7353 及びカリクレインの安定性	<i>in vitro</i> ；ヒト血漿ベースアッセイ	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	TD-BR-18-7353-011
ヒト及び動物血漿におけるカリクレイン活性の阻害	<i>in vitro</i> ；血漿ベースアッセイ[ヒト、非ヒト霊長類(サル)、ラット及びウサギ]	<i>in vivo</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	BR-7353-005-改訂第 01 版
HAE 患者の血漿におけるカリクレインの阻害	<i>ex vivo</i> ；ヒト血漿ベースアッセイ	経口	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	BR-7353-006-改訂第 01 版
ブラジキニン遊離阻害	<i>in vitro</i> ；HUVEC	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	BR-7353-004
副次的薬理試験					
ヒト及び動物血漿におけるプロトロンビン時間（PT）に対する作用	<i>in vitro</i> ；血漿ベースアッセイ [ヒト、非ヒト霊長類（サル）、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、及びブタ]	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	BR-7353-003

被験物質：BCX7353

試験の種類／説明	試験系	投与方法	試験実施施設	GLP ^a	試験／ 報告書番号
ヒト及び動物血漿における活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）に対する作用	<i>in vitro</i> ；血漿ベースアッセイ [ヒト、非ヒト霊長類（サル）、ラット、マウス、イヌ、及びウサギ]	<i>in vitro</i>	BioCryst Pharmaceuticals, Inc. Birmingham, AL 35244	非適用	TD-BR-18-7353-010
安全性薬理試験					
GPCR スクリーニング	細胞株に発現させたヒト GPCR	<i>in vitro</i>	████████████████████ ████████████████████ ████████, Taiwan, Republic of China	非適用	████████5402
hERG チャネル	HEK293 細胞に発現させた hERG カリウムチャネル	<i>in vitro</i> 表面灌流	████████████████████ ████████████████████	適用	████████125
心血管系	摘出ウサギ心筋 プルキンエ線維	<i>in vitro</i>	████████████████████ ████████████████████	適用	141030 ██████████
イオンチャネル	CHO 細胞に発現させたクローン化 L 型カルシウムチャネル（hCav1.2）及び hNav1.5 ナトリウムチャネル	<i>in vitro</i>	████████████████████ ████████████████████	非適用	150123 ██████████
心血管系	ヒト幹細胞由来心筋細胞	<i>in vitro</i>	████████████████████ ████████████████████	非適用	150217 ██████████
心血管系／hERG チャネル	hERG カリウムチャネル発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	████████████████████ ████████████████████ ████████████████████	適用	190720 ██████████
心血管系／hNav1.5 チャネル	hNav1.5 発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	████████████████████ ████████████████████ ████████████████████	適用	190178 ██████████
心血管系／hNav1.5 チャネル	hNav1.5 発現 HEK293 細胞	<i>In vitro</i>	████████████████████ ████████████████████ ████████████████████	適用	190721 ██████████

被験物質：BCX7353

試験の種類／説明	試験系	投与方法	試験実施施設	GLP ^a	試験／ 報告書番号
心血管系／hCav1.2 チャンネル	hCav1.2 発現 CHO 細胞	<i>In vitro</i>	████████████████████ ████████████████████ ████████████████████	適用	190719-████████
心血管系	モデリング	N/A	████████████████████ ████████████████████ ████████████████████ ████████████████████ UK	非適用	TD-DEV-20- 7353-001
呼吸器系	雄 Wistar Hannover [Crl:WI (Han)] ラット	強制 経口投与	████████████████████ ████████████████████	適用	████████124
神経行動学的作用	雄 Wistar Hannover [Crl:WI (Han)] ラット	強制 経口投与	████████████████████ ████████████████████	適用	████████123
心血管系	雌カニクイザル	強制 経口投与	████████████████████ ████████████████████	適用	████████135

aPTT=活性化部分トロンボプラスチン時間；CHO=チャイニーズハムスター卵巣；ECG=心電図；GLP=医薬品安全性試験実施基準；GPCR=G タンパク質共役受容体；HAE=遺伝性血管性浮腫；HEK=ヒト胎児腎臓；hCav1.2=ヒト L 型カルシウムチャンネル 1.2；hERG=ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル関連遺伝子；hNav1.5=ヒトナトリウムチャンネル 1.5；HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞；PT=プロトロンビン時間

^a 「適用」の記載は、試験が GLP に遵守して実施されたことを示す陳述が試験報告書にあることを示す。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理試験

被験物質：BCX7353

試験の種類	試験系	BCX7353 の適用濃度	注目すべき所見	試験／ 報告書番号
ヒト血漿カリクレインの阻害	精製酵素アッセイ	0.03-100 nM	IC ₅₀ ± SE : 0.88 ± 0.15 nM K _i : 0.44 nM	BR-7353-001
ヒトセリンプロテアーゼの阻害（選択性）	精製酵素アッセイ	トリプシン 0.098～50 μM トロンビン 0.098～50 μM プラスミン 0.098～50 μM tPA 0.098～50 μM APC 0.1～30 μM 補体 C1s 0.098～50 μM 活性化第 X 因子 0.098～50 μM 活性化第 XIIa 因子 0.098～50 μM 組織カリクレイン 0.1～30 μM	IC ₅₀ ± SE (nM) : トリプシン 11000 ± 555 トロンビン > 50000 プラスミン 3967 ± 1139 tPA > 50000 APC > 30000 補体 C1s > 50000 活性化第 X 因子 > 50000 活性化第 XIIa 因子 > 50000 組織カリクレイン > 30000	BR-7353-002
ヒトカリクレイン活性の阻害を測定するアッセイの開発	ヒト血漿ベースアッセイ	-	ヒト血漿カリクレイン活性の蛍光アッセイ法が確立された	TD-BR-18-002-DEV
ヒトカリクレイン活性の阻害を測定するアッセイの適格性確認	ヒト血漿ベースアッセイ	-	ヒト血漿カリクレイン活性の蛍光アッセイ法の適格性が確認された	TD-BR-18-002-VAL
クエン酸緩衝液中のヒト HAE 患者の血漿における BCX7353 及びカリクレインの安定性	ヒト血漿ベースアッセイ	125 ～ 350 mg/man	HAE 患者の血漿中カリクレイン活性及び BCX7353 による阻害作用は-70℃ 条件下で 19 カ月間安定であった	TD-BR-18-7353-011

被験物質：BCX7353

試験の種類	試験系	BCX7353 の適用濃度	注目すべき所見	試験／ 報告書番号
ヒト及び動物血漿におけるカリクレイン活性の阻害	血漿ベースアッセイ[ヒト、非ヒト霊長類(サル)、ラット及びウサギ]	1～1000 nM	BCX7353 による健康被験者及び動物の血漿中カリクレイン阻害 (EC ₅₀) : ヒト 5.4 nM サル 5.2 nM ラット 7.2 nM ウサギ >1000 nM	BR-7353-005-改訂第 01 版
HAE 患者の血漿におけるカリクレインの阻害	<i>ex vivo</i> ; ヒト血漿ベースアッセイ	1～1000 nM	BCX7353 による HAE 患者血漿中カリクレイン阻害 (EC ₅₀ 平均±SE) : 15.9 ± 0.57 nM	BR-7353-006-改訂第 01 版
ブラジキニン遊離阻害	HUVEC	0.1～100 nM	BCX7353 による BK 遊離阻害 (EC ₅₀ 平均±SE) : 5.56 ± 1.2 nM	BR-7353-004

HAE=遺伝性血管性浮腫；HUVEC=ヒト臍帯静脈内皮細胞；tPA=組織プラスミノゲン活性化因子；APC=活性化たんぱく質 C；BK=ブラジキニン

2.6.3 薬理試験の概要表
オラデオカプセル 150 mg

株式会社オーファンパシフィック

2.2 *In vivo* 薬理試験

BCX7353 の効力を裏付ける *in vivo* 試験は実施されていない。

3 副次的薬理試験

3.1 *In vitro* 副次的薬理試験

被験物質：BCX7353

試験の種類	試験系	適用濃度	注目すべき所見	GLP ^a	試験／報告書番号
ヒト及び動物血漿におけるプロトロンビン時間（PT）に対する作用	血漿ベースアッセイ [ヒト、非ヒト霊長類（サル）、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、及びブタ]	1～100 μM	PT 2 倍延長に要した BCX7353 濃度（μM；平均±SE）： ヒト >100 サル 81.0 ± 5.3 ラット >100 ウサギ >100 マウス >100 イヌ >100 ブタ 82.2 ± 2.3	非適用	BR-7353-003
ヒト及び動物血漿における活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）に対する作用	血漿ベースアッセイ [ヒト、非ヒト霊長類（サル）、ラット、マウス、イヌ、及びウサギ]	1～100 μM	aPTT 2 倍延長に要した BCX7353 濃度（μM；平均±SE）： ヒト 73.4 ± 3.6 サル 53.5 ± 0.9 ラット 73.6 ± 0.4 イヌ 24.6 ± 5.5 ウサギ 10.3 ± 0.4 マウス 37.7 ± 1.1	非適用	TD-BR-18-7353-010

GLP=医薬品安全性試験実施基準；PT=プロトロンビン時間；aPTT=活性化部分トロンボプラスチン時間

^a 「適用」の記載は、試験が GLP に遵守して実施されたことを示す陳述が試験報告書にあることを示す。

2.6.3 薬理試験の概要表
オラデオカプセル 150 mg

株式会社オーファンパシフィック

3.2 *In vivo* 副次的薬理試験

BCX7353 の *in vivo* 副次的薬理試験は実施されていない。

4 安全性薬理試験

被験物質：BCX7353							
評価対象の組織/臓器系	動物種/系統	投与方法	用量 ^a	性別及び動物数/群	注目すべき所見	GLP ^b	試験番号
GPCR	細胞株に発現させたヒト GPCR (103)	<i>in vitro</i>	0.03-30 μ M	n=2 細胞/ 濃度	全標的受容体において、以下を除き親和性 (K_i) >3 μ M。除外：カンナビノイド CB1 (1.56 μ M)、メラノコルチン MC ₅ (1.92 μ M)、及びソマトスタチン SST ₁ (2.09 μ M) 受容体	非適用	5402
hERG チャネル	HEK293 細胞に発現させたヒトカリウムチャネル	<i>in vitro</i> 表面灌流	0.037、0.12、1.2、2.6、9.6、28 μ M	≥ 3 細胞/ 濃度	カリウム電流の濃度依存性阻害 50%阻害濃度=0.29 μ M	適用	125
心血管系	摘出ウサギ心筋肉 プルキンエ線維	<i>in vitro</i>	0.9、9.4、93.7 μ M	n=3~5/ 濃度	BCX7353 は活動電位の再分極を延長しなかったが、活動電位振幅を減少させ、脱分極静止膜電位かつ最大立ち上がり速度 (dV/dt_{max}) を低減した。	適用	141030
イオンチャネル	CHO 細胞に発現させたヒト L 型カルシウムチャネル (hCav1.2) 及び hNav1.5 ナトリウムチャネル	<i>in vitro</i>	0.3、1、3、9-28 μ M	n ≥ 3 細胞/ 濃度	hCav1.2 の 50%阻害濃度 =1.30 μ M hNav1.5 (phasic) の 50%阻害濃度=4.79 μ M hNav1.5 (tonic) の 50%阻害濃度=5.15 μ M	非適用	150123
心血管系	ヒト幹細胞由来心筋細胞	<i>in vitro</i>	0.3、1、3、9、28 μ M	≥ 4 ウェル/ 濃度	0.3 μ M で細胞外電位持続時間 4.5%増加及び 1 μ M で拍動周期 14.2%増加。1 μ M でナトリウムスパイク振幅は 55.0%減少。3、9、及び 28 μ M BCX7353 では電気信号は検出されなかった。	非適用	150217

被験物質：BCX7353							
評価対象の組織/臓器系	動物種/系統	投与方法	用量 ^a	性別及び動物数/群	注目すべき所見	GLP ^b	試験番号
心血管系／hERG チャンネル	hERG カリウムチャンネル発現 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	0.03、0.1、0.3、1.0 μ M	≥ 4 細胞／濃度	hERG 電流の 50%阻害濃度＝0.2 μ M Hill 係数＝1.3	適用	190720
心血管系／hNav1.5 チャンネル（遅延）	hNav1.5 発現 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	0.03、0.1、0.3、1	≥ 4 細胞／濃度	遅延性 Nav1.5 の 50%阻害濃度＝0.1 μ M Hill 係数＝1.0	適用	190718
心血管系／hNav1.5 チャンネル（ピーク）	hNav1.5 発現 HEK293 細胞	<i>in vitro</i>	0.3、1、3、10	4 細胞／濃度	Nav1.5 ピーク電流の 50%阻害濃度＝2.4 μ M Hill 係数＝1.3	適用	190721
心血管系／hCav1.2 チャンネル	hCav1.2 発現 CHO 細胞	<i>in vitro</i>	1、2、3、10	4 細胞／濃度	L 型カルシウム電流（I _{Ca,L} ）の 50%阻害濃度＝2.8 μ M Hill 係数＝2.9	適用	190719
心血管系	N/A (モデリング)	N/A	N/A	N/A	ヒトに BCX7353 を 150 mg から 450 mg 投与した時の遊離薬物濃度（0.0037 から 0.013 μ M）では、Torsade metric score は低リスクカテゴリーであった	非適用	TD-DEV-20-7353-001
呼吸器系	ラット／Wistar Hannover [CrI:WI (Han)]	強制経口投与	25、100、450 mg/kg	雄動物；n=8	すべての用量レベルで呼吸機能には影響がみられなかった； NOEL: 450 mg/kg	適用	124
神経行動学的作用	ラット／Wistar Hannover [CrI:WI (Han)]	強制経口投与	25、100、450 mg/kg	雄動物；n=10	すべての用量レベルで神経行動機能には影響がみられなかった； NOEL: 450 mg/kg	適用	123
心血管系	サル／カニクイザル	強制経口投与	15、50、150 mg/kg ^c	雌性動物；n=4	すべての用量レベルで心拍数、血圧、または ECG には臨床的に関連のある影響は認められなかった； NOEL: 150 mg/kg	適用	135

2.6.3 薬理試験の概要表

オラデオカプセル 150 mg

CHO=チャイニーズハムスター卵巣；ECG=心電図；GLP=医薬品安全性試験実施基準；GPCR=G タンパク質共役受容体；hCav1.2=ヒト L 型カルシウムチャネル 1.2、電位依存性、L 型、アルファ 1C サブユニット；HEK=ヒト胎児腎臓；hERG=ヒト遅延整流性カリウムチャネル関連遺伝子；hNav1.5=ヒトナトリウムチャネル 1.5；IC₅₀=50%阻害濃度；NOEL=無影響量

^a 別途特記がない限りは単回投与。

^b 「適用」の記載は、試験が GLP に遵守して実施されたことを示す陳述が試験報告書にあることを示す。

^c 毎週 1 例の動物に 1 用量投与し、投与後 10 日間のウォッシュアウト期間を設け、各動物が全用量を投与されるまで薬剤をラテン方格法に従い投与した。

5 薬力学的薬物相互作用試験

BCX7353 の薬力学的薬物相互作用試験は実施されていない。