

TABLE OF CONTENTS

略号一覧表.....	4
2.4 非臨床試験の概括評価.....	6
1 非臨床試験計画概略.....	6
2 薬理試験.....	9
2.1 <i>In Vitro</i> 薬理試験.....	10
2.1.1 作用機序.....	10
2.1.2 Andexanet の各種 FXa 阻害剤との結合性.....	11
2.1.3 Andexanet の <i>in vitro</i> での凝固促進及び抗凝固作用.....	16
2.2 <i>In Vivo</i> 薬理試験.....	18
2.3 安全性薬理試験.....	24
2.3.1 ラットを用いた呼吸器系及び中枢神経系の安全性薬理試験.....	24
2.3.2 サルを用いた心血管系の安全性薬理試験.....	25
3 薬物動態試験.....	26
4 毒性試験.....	30
4.1 反復投与毒性.....	30
4.2 遺伝毒性.....	33
4.3 がん原性ーリスク評価.....	33
4.4 生殖発生毒性.....	33
4.5 局所刺激性.....	33
5 総括及び結論.....	34
6 参考文献.....	37

LIST OF TABLES

Table 1:	Andexanet の直接作用型 FXa 阻害剤に対する結合親和性 (K_d 値)	12
Table 2:	動物モデルにおける直接作用型 FXa 阻害剤による抗凝固作用の andexanet に よる無効化.....	18
Table 3:	ラット尾切断及びウサギ肝臓創傷モデルでの間接作用型 FXa 阻害剤による抗 凝固作用の andexanet による無効化.....	19
Table 4:	直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用に対する andexanet 及び各種中和剤の影 響.....	24
Table 5:	Andexanet を単回静脈内投与したときの PK パラメータ（平均値±SD）	26
Table 6:	Andexanet と FXa 阻害剤との相互作用試験.....	28
Table 7:	Andexanet の毒性試験プログラム.....	30
Table 8:	ラット、サル及びヒトにおける最高用量投与時の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ の比較	36

LIST OF FIGURES

Figure 1:	ヒト FX 及び andexanet の構造.....	7
Figure 2:	直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の凝固カスケードにおける標的	9
Figure 3:	直接作用型 FXa 阻害剤の無効化機序	10
Figure 4:	ATIII 依存性 FXa 阻害剤の無効化機序	11
Figure 5:	直接作用型 FXa 阻害剤の阻害活性に対する andexanet による用量依存的な無 効化.....	12
Figure 6:	ヒト血漿中での直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 活性の andexanet による無効化.....	14
Figure 7:	ヒト血漿中における直接作用型 FXa 阻害剤エドキサバンの IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化.....	15
Figure 8:	ヒト血漿中における間接作用型 FXa 阻害剤エノキサパリンの IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化.....	16
Figure 9:	Andexanet の触媒活性評価.....	16
Figure 10:	ヒト血漿中での IIa 産生アッセイにおける andexanet と FXa-EGR の活性比較	17
Figure 11:	リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける出血量の andexanet 投与による減少	20
Figure 12:	リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける抗 FXa 活性の andexanet 投与による無効化.....	20
Figure 13:	エドキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける出血量の andexanet 投与による減少	21
Figure 14:	エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける出血量の andexanet 投与による減少	22
Figure 15:	Andexanet のウサギ肝臓創傷モデルでの出血量と抗 FXa 活性との相関性.....	24
Figure 16:	腎臓両側摘出、腎臓片側摘出、偽手術施行又は無処置ラットに 3 mg/kg の	

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

	andexanet を静脈内投与したときの平均血漿中濃度推移.....	27
Figure 17:	カニクイザルにエンジニアリングロット又は GMP 適合の最初の 2 ロットを異なる条件（フィルターの有無）で投与したときの平均血漿中濃度推移（Generation 1）	27
Figure 18:	カニクイザルにリバーロキサバン（60 mg/kg）を投与後、andexanet を投与したときのリバーロキサバンの平均血漿中総濃度及び非結合型濃度	29

2.4 非臨床試験の概括評価
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

略号一覧表

略号	英語	日本語
3F-PCC	Three-Factor Prothrombin Complex Concentrate	3 因子含有プロトロンビン複合体濃縮製剤
4F-PCC	Four-Factor Prothrombin Complex Concentrate	4 因子含有プロトロンビン複合体濃縮製剤
aPTT	Activated Partial Thromboplastin Time	活性化部分トロンボプラスチン時間
ATIII	Anti-Thrombin III	アンチトロンビン
AUC	Area Under the Curve	血漿中濃度曲線下面積
CAT	Calibrated Automated Thrombogram	自動校正トロンボグラム
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	欧州医薬品庁のヒト用医薬品委員会
CL	Clearance	クリアランス
C _{max}	Maximum Observed Plasma Drug Concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central Nervous System	中枢神経系
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酵素免疫吸着測定
ETP	Endogenous Thrombin Potential	内因性トロンビン産生能
FDA	(US) Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FXa	Factor Xa	血液凝固第 Xa 因子
Gla	gamma-carboxyglutamic acid	γ-カルボキシグルタミン酸
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
GMP	Good Manufacturing Practice	医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準
HE	Hematoxylin and Eosin	ヘマトキシリン・エオシン
H	Heparin	ヘパリン
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
ICH	International Conference on Harmonisation	医薬品規制調和国際会議
INR	International Normalised Ratio	国際標準化比
IV	Intravenous	静脈内
K _d	Dissociation Constant	解離定数
K _i	Inhibition Constant	酵素・阻害剤複合体の解離定数
MFD	Maximum Feasible Dose	投与可能な最大用量
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
PCC	Prothrombin Complex Concentrates	プロトロンビン複合体濃縮製剤
PD	Pharmacodynamics	薬力学
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PT	Prothrombin Time	プロトロンビン時間
RFU	Relative Fluorescence Unit	相対蛍光単位

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

略号	英語	日本語
rfVIIa	Recombinant factor VIIa	遺伝子組換え型血液凝固第 VIIa 因子
RVVT	Russell's Viper Venom Time	ラッセル蛇毒時間
$t_{1/2}$	Half-life	半減期
TAT	Thrombin-Antithrombin	トロンビン-アンチトロンビン複合体
TF	Tissue Factor	組織因子
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor	組織因子経路インヒビター
TGA	Thrombin Generation Assay	トロンビン産生アッセイ
V_{ss}	Volume of Distribution at Steady State	定常状態分布容積

2.4 非臨床試験の概括評価

1 非臨床試験計画概略

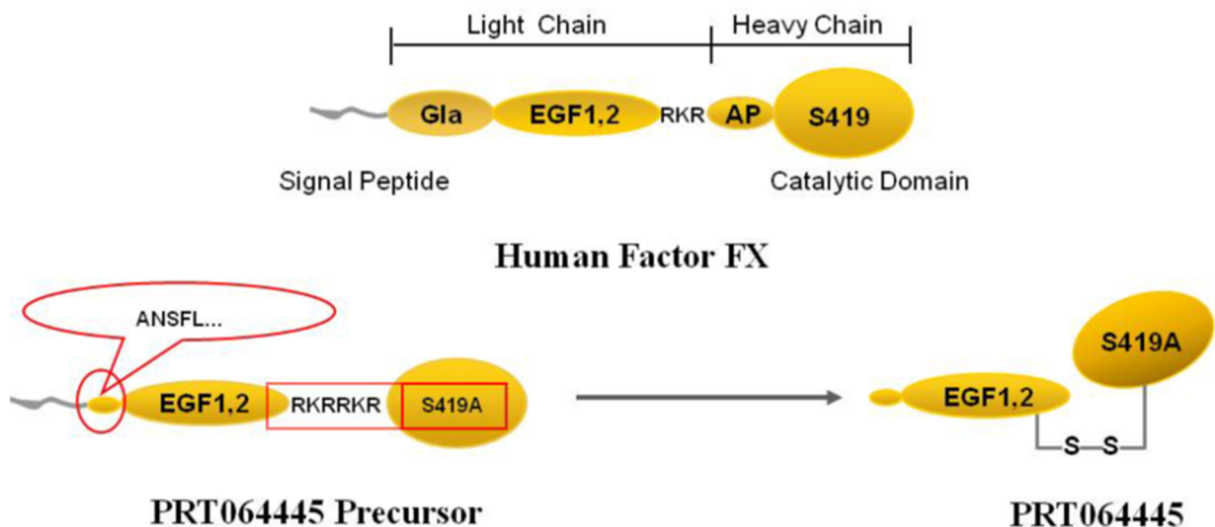
Andexanet alfa（以下 andexanet）の非臨床試験計画は、提唱された作用機序の確認、臨床開発を裏付ける適切な代替バイオマーカーの定義、予測される毒性作用の同定を目的にデザインされた。本項では、1) ヒト血漿中の組織因子（TF）誘導性トロンビン（IIa）産生により評価した *in vitro* での andexanet によるエドキサバン及びエノキサパリンの抗凝固作用の無効化、2) エノキサパリンの抗凝固作用による出血量に対する andexanet による減少を実証する予防的ウサギ肝臓創傷モデル、及び 3) 活性化血液凝固第 X 因子（FXa）阻害活性の部分的無効化による出血量減少を実証するための、アピキサバンを投与した抗凝固状態下のブタ多発性外傷モデルでの低用量 andexanet（抗 FXa 活性の無効化が低レベル）投与に関する情報を含めた。

Andexanet は、直接作用型又は間接作用型 FXa 阻害剤の使用による大出血や緊急手術時の抗凝固作用の速やかな無効化を目的として開発されている。Andexanet（分子量約 41 kDa）は遺伝子組換え改変型ヒト FXa であり、直接作用型及び間接作用型 [アンチトロンビン III（ATIII）依存性] 阻害剤に対して高い結合親和性を保持するようデザインされているが、andexanet は固有の凝固促進又は凝固阻害作用を持たないように 2 つの重要な修飾が施されている。Andexanet の主な作用機序は FXa 阻害剤の捕捉及び抗凝固作用の無効化であるが、andexanet と組織因子経路インヒビター（TFPI）との相互作用により、TFPI 活性の阻害による IIa 産生アッセイ値の上昇が認められる可能性がある。

市販製品用製造工程である Generation 2 で製造した原薬は、Generation 1 で製造した原薬と同等／同質であることが示された。最初の分析的な同等性／同質性及びバイオアッセイを含む広範な特性解析（[モジュール 3.2.S.2.6](#)）に続き、Generation 2 andexanet の非臨床安全性を確認するため、Generation 1 andexanet との曝露量の比較を含む、Generation 2 andexanet を用いた反復投与毒性試験を実施した。本試験の結果は[モジュール 2.6.6](#)に要約する（[NC-16-0757-R0001](#)）。健康被験者を対象とした薬物動態（PK）及び薬力学（PD）比較試験（16-512 試験）、抗凝固剤非併用下の健康被験者を対象とした andexanet のクロスオーバー-PK 試験（19-514 試験）、並びに出血患者を対象とした ANNEXA-4 試験（14-505 試験）において、Generation 1 と Generation 2 の andexanet の比較臨床データが得られており、Generation 2 andexanet の生物活性、有効性及び安全性が Generation 1 andexanet と同程度であることが確認された。

Andexanet は FXa 阻害剤（直接作用型及び間接作用型）に高い親和性を保持しているが、活性部位のセリンをアラニンに置換しているため触媒活性がなく、プロトロンビンを切断及び活性化することはできず、内在性 FXa が持つ凝固促進活性が除かれている。また、Andexanet は遺伝子組換えにより γ -カルボキシグルタミン酸（Gla）ドメインが欠失していることから、プロトロンビナーゼ複合体への組み込みがなく、抗凝固作用がない（[Figure 1](#)）。

Figure 1: ヒト FX 及び andexanet の構造



FX = Factor X; GLA = Gamma-carboxyglutamic acid; EGF = Epidermal growth factor; RKR = Arginine-Lysine-Arginine; AP = Activation peptide

In vitro 薬理試験では FXa 阻害剤に対する andexanet の親和性及び無効化作用が確認されているが、*in vivo* 試験では andexanet が抗 FXa 活性を急速に無効化し、抗凝固作用を反映する他の PD マーカー及び出血量を減少させることが示されている。抗 FXa 活性は抗凝固作用の一貫性ある妥当な主要指標であることが示されており、抗 FXa 活性の無効化は *in vivo* モデルで認められた出血量の減少とよく相関している。これらの非臨床データから、andexanet は FXa 阻害剤の抗凝固作用を無効化し、動物モデルで出血量を減少させ、IIa 産生能の正常化により止血を回復させることが示されている。サル及び健康被験者を対象とした *in vivo* 試験では、血液凝固バイオマーカーである F1+2、IIa-ATIII（TAT）及び D ダイマーの上昇が認められたが、これらは血栓性イベントを伴わず、FXa 阻害剤の併用投与により減弱した。

Andexanet の PK を、ラット及びサル（アカゲザル及びカニクイザル）を用いた単回及び反復投与試験で評価した。これらの試験の目的は、andexanet の PK パラメータを明らかにし、直接作用型 FXa 阻害剤の PK に及ぼす andexanet の影響を評価することであった。

Andexanet は、FXa 阻害剤による抗凝固作用を無効化する単回投与治療薬として開発されている。そのため、andexanet の非臨床安全性を評価するために実施したラット及びサルの医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用試験の投与期間は限られていたが（2 週間以内）、いくつかの異なる FXa 阻害剤（アピキサバン、リバーロキサバン、エノキサパリン及び betrixaban）を用いた試験も実施し、意図した治療における andexanet の安全性を慎重に評価した。毒性試験では、血液凝固バイオマーカーである D ダイマー及び TAT のモニタリング、並びに血栓に対する特殊染色を実施し、潜在的な血栓性イベントに特に注意を払った。血液凝固バイオマーカー（F1+2、TAT 及び D ダイマー）は第 1～3 相臨床試験でもモニタリングした。

20██年██月██日に行われた欧州医薬品庁ヒト用医薬品委員会（CHMP）との対面助言において、医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施に関する医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン M3（R2）に従い、FXa 阻害剤は妊娠中の投与が禁忌であるため生殖毒性試験を実施しないことは容認できること、また、予定された適応症では andexanet の投与期間が短いこと及びその製剤の種類〔バイオテクノロジー応用医薬品、ICH S6（R2）〕を考慮

アンデキサネット アルファ (遺伝子組換え)

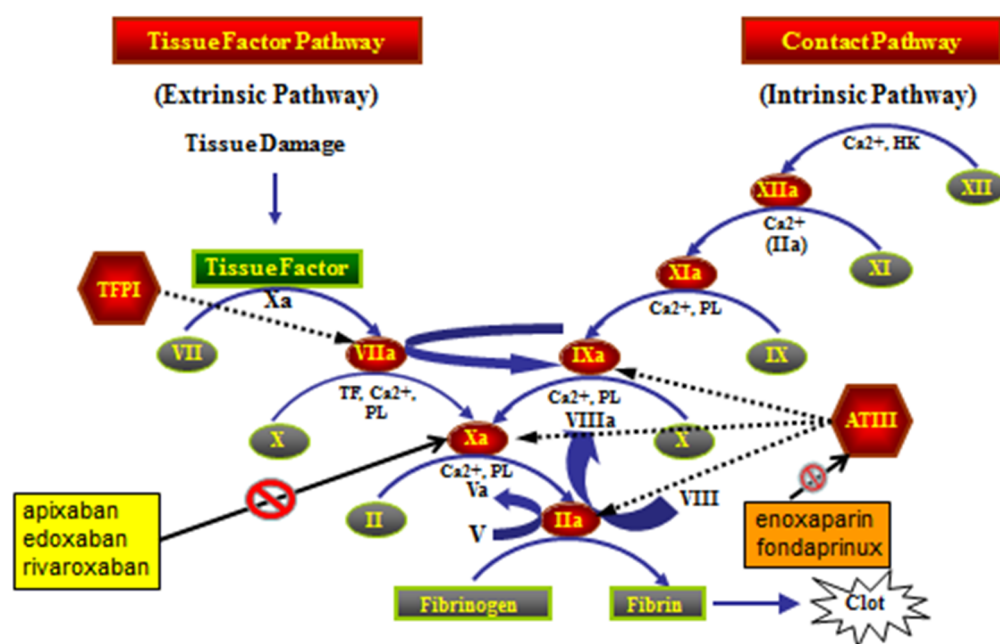
8 / 38

2 薬理試験

直接作用型経口 FXa 阻害剤（リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン、betrixaban（未承認薬）など）は、ワルファリンなどのビタミン K 拮抗剤など従来から使用されてきた薬剤に代わり、使用が急速に増加している新規クラスの抗凝固剤である。これらの直接作用型経口抗凝固剤は、頭蓋内出血及び出血性脳卒中のリスクをワルファリンと比較して約 50%低下させ、この低下は高齢患者においても維持されている¹²⁾。直接作用型経口抗凝固剤での抗凝固療法では、ワルファリン投与患者で必要とされる頻回の臨床検査モニタリングや用量調節が不要となる。さらに、エノキサパリンを初めとする低分子ヘパリンなどの非経口間接作用型（ATIII 依存性）FXa 阻害剤は、静脈血栓塞栓症の予防や治療など、様々な適応症に対して長年広く使用されている。しかし、臨床的有用性に疑いはないものの、直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤はいずれも出血イベントの増加を伴い、生命を脅かす場合や致死的な場合もある。したがって、有効な中和剤が早急に必要である。Andexanet は FXa のデコイ分子であり、直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の中和剤として開発されている。

FXa はセリンプロテアーゼであり、プロトロンビンから IIa へ変換する凝固カスケードの最終共通経路において中心的役割を担う。IIa は血栓形成においてフィブリノーゲンをフィブリンに変換する凝固カスケードの最後のセリンプロテアーゼである (Figure 2)。直接作用型 FXa 阻害剤は、他の補助因子に依存することなく FXa に結合し、活性を阻害する。一方、間接作用型 FXa 阻害剤は血漿中阻害因子である ATIII との相互作用により抗凝固作用を発揮する。ATIII は、FXa を含む多くの凝固酵素に結合し、不活化する。ATIII による阻害は、ヘパリン、低分子ヘパリンやペンタサッカライド（フォンダパリヌクスなど）などのポリサッカロイド分子との複合体形成により大きく亢進される。

Figure 2: 直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の凝固カスケードにおける標的



ATIII = Antithrombin III; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor; TF = Tissue factor; PL = Phospholipids

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Andexanet は遺伝子組換え改変型ヒト FXa であり、ヒト FXa の酵素活性を有しない。Andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤に高い親和性で結合し、FXa 阻害剤の内在性 FXa への結合を阻害することにより、抗凝固作用の無効化が達成される。また、andexanet は、間接作用型 FXa 阻害剤と複合体を形成した ATIII 分子に結合して捕捉し、ATIII-阻害剤複合体の内在性 FXa との結合を阻害する。薬理試験プログラムは、以下の点の確認を含めた andexanet の作用機序を明らかにする目的でデザインされた。

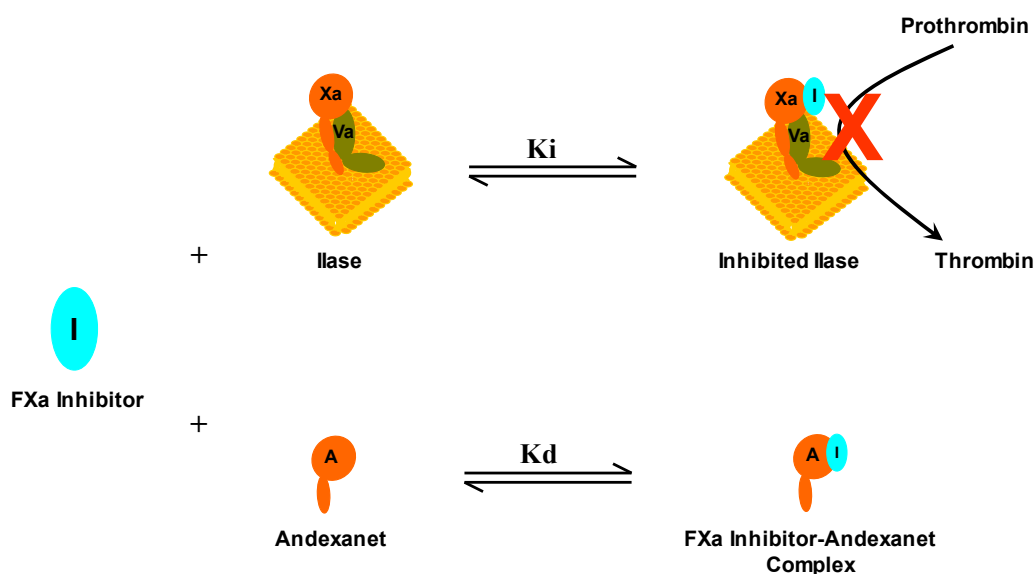
- FXa 阻害剤に対する高い結合親和性
- 凝固促進及び抗凝固作用の欠如
- 直接作用型及び ATIII 依存性間接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 活性、直接作用型 FXa 阻害剤の非結合型濃度並びに動物モデルでの出血量減少を指標とする抗凝固作用の無効化
- IIa 産生の回復によって示される凝固活性の正常化
- 直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の無効化に関連する PD マーカーとしての抗 FXa 活性及び IIa 産生能

2.1 In Vitro 薬理試験

2.1.1 作用機序

直接作用型 FXa 阻害剤は FXa に結合し、その活性を阻害する。Andexanet は改変型 FXa として直接作用型 FXa 阻害剤に高い親和性で結合するが、内在性 FXa がもつ凝固活性はない（1 項参照）。Andexanet は FXa のデコイとして作用し、FXa 阻害剤を捕捉することにより、その非結合型血漿中濃度を速やかに減少させ、プロトロンビン活性に必要なプロトロンビナーゼ複合体中の FXa 活性を回復させる。非結合型又は阻害剤結合の andexanet は、正常なプロトロンビナーゼ機能を阻害しない（Figure 3）。

Figure 3: 直接作用型 FXa 阻害剤の無効化機序

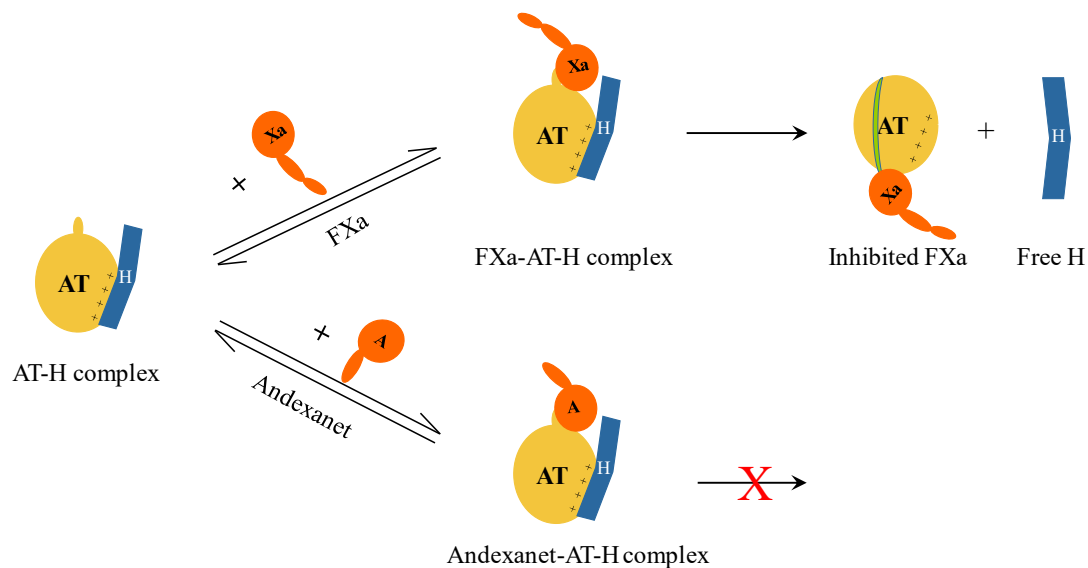


Ilase = Prothrombinase complex; FXa = Factor Xa; K_d = Dissociation constant; K_i = Inhibition constant

また、andexanet は、未分画ヘパリン、低分子ヘパリン又はフォンダパリヌクスなどの間接作用型阻害剤と複合体を形成した ATIII にも結合して捕捉し、ATIII 依存性 FXa 阻害剤を効果的に無

効化する（Figure 4）。同様の機序により、andexanet はヘパリン及びエノキサパリンの抗 IIa 活性も無効化する。

Figure 4: ATIII 依存性 FXa 阻害剤の無効化機序



AT = Antithrombin III; FXa = Factor Xa; H = Heparin, or low molecular weight heparin (e.g., enoxaparin), or pentasaccharide (e.g., fondaparinux)

FXa 阻害剤は凝固酵素 FXa を標的とするため、抗 FXa 活性などの PD 測定法は、抗凝固作用の無効化に関連する臨床転帰を合理的に予測できる可能性の高い適切な代替 PD マーカーとなる。抗 FXa 活性は、直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤による FXa 活性阻害の直接的評価基準である。FXa 阻害剤の血漿中非結合型濃度は、各直接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 発色アッセイにより測定した抗 FXa 活性と相関する。

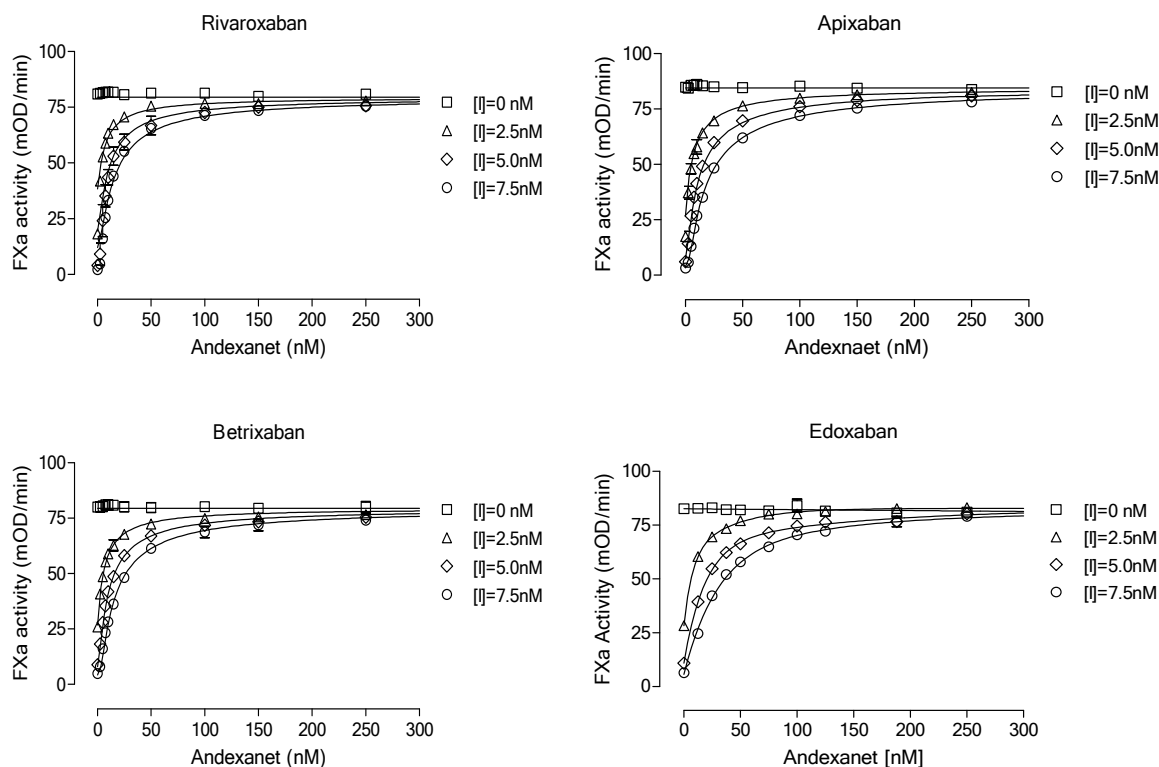
さらに、IIa はプロトロンビナーゼ複合体中 FXa によるプロトロンビン活性化により生成される凝固カスケード最後のプロテアーゼで、フィブリン（凝固）形成を誘導するため（Figure 2）、IIa 産生アッセイは FXa 阻害の下流における抗凝固作用と止血回復の両方に対する生理学的意義のある測定法である。FXa 阻害剤による IIa 産生阻害は、IIa 産生開始が TF 経路又は活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）試薬（接触又は内因性経路）であるかにかかわらず、抗 FXa 活性及びその無効化と相関することが示されている。

2.1.2 Andexanet の各種 FXa 阻害剤との結合性

直接作用型 FXa 阻害剤

液相評価系における FXa 活性測定では、andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤と高い親和性で結合し、リバーロキサバン、アピキサバン、betrixaban 及びエドキサバンの抗 FXa 活性を用量依存性的かつ完全に無効化する（Figure 5）。4 種の直接作用型 FXa 阻害剤に対する andexanet の結合親和性〔解離定数（ K_d ）〕は 0.5～1.5 nmol/L と同程度である（Table 1）。エドキサバンは andexanet に対して、低ナノモル濃度での結合親和性を有し（ $K_d=0.95$ nmol/L）、リバーロキサバン及びアピキサバンと同程度であった。

Figure 5: 直接作用型 FXa 阻害剤の阻害活性に対する andexanet による用量依存的な無効化



FXa = Factor Xa; K_i = Inhibition constant; K_d = Dissociation constant; mOD = Milli-optical density

Notes: The assay mixture contained human FXa (3 nM), different concentrations of inhibitor (0, 2.5, 5.0, and 7.5 nM) and increasing concentrations of andexanet. Following pre-incubation, the remaining FXa activity was measured by adding Spectrozyme-FXa (100 μ M). The initial rate of substrate cleavage was measured immediately and expressed as mOD/min. The data were analysed by non-linear curve fitting using the Dynafit software using the reported K_i values for rivaroxaban, apixaban, and betrixaban. Edoxaban K_i value was determined in a separate experiment (K_i = 0.122 nM). The analysis yielded the affinity (K_d) of andexanet to each direct FXa inhibitor.

Table 1: Andexanet の直接作用型 FXa 阻害剤に対する結合親和性 (K_d 値)

Inhibitor	K_d , AnXa (nM)	K_i , FXa (nM)	K_d/K_i
Rivaroxaban	1.53	0.400 (reported ¹⁰⁾)	3.83
Apixaban	0.58	0.100 (reported ¹¹⁾)	5.80
Betrixaban	0.53	0.117 (reported ¹⁴⁾)	4.53
Edoxaban	0.95	0.122 (measured)*	7.79

AnXa = Andexanet; FXa = Factor Xa

K_d : dissociation constant of andexanet for each inhibitor was determined by kinetic measurements.

K_i : dissociation constant of FXa for each inhibitor was either based on literature results or determined by kinetic measurement.

*The reported apparent K_i of 0.561 nM for edoxaban was measured in the presence of 0.7 nM human FXa²⁾. After accounting for consumption of the inhibitor by FXa due to tight binding, edoxaban would have an estimated intrinsic $K_i \leq 0.211$ nM, comparable to what was measured.

同様に、andexanet はヒト血漿中で直接作用型 FXa 阻害剤に結合し、抗 FXa 活性を用量依存的に無効化する (NC-12-0435-R0001、NC-12-0435-R0002 及び NC-13-0565-R0001) (Figure 6a)。また、エドキサバンの試験の自動校正トロンボグラム (CAT) パラメータ (TF-CAT アッセイを使用) による定量解析結果から示されたように、andexanet はヒト血漿中での直接作用型 FXa 阻害剤によ

る IIa 産生阻害を用量依存的かつ完全に無効化する（NC-13-0565-R0001-1）（Figure 7）。

ATIII 依存性 FXa 阻害剤

Andexanet は、ATIII と間接作用型 FXa 阻害剤（未分画ヘパリン、エノキサパリン及びフォンダパリヌクスなど）との複合体にも結合し、ヒト血漿中で間接作用型 FXa 阻害剤（エノキサパリン）の抗 FXa 活性（NC-12-0434-R0002）（Figure 6b）並びに低分子ヘパリン及び未分画ヘパリンの抗 IIa 活性及び抗 FXa 活性（NC-16-0738-R0001）を用量依存的に無効化する。

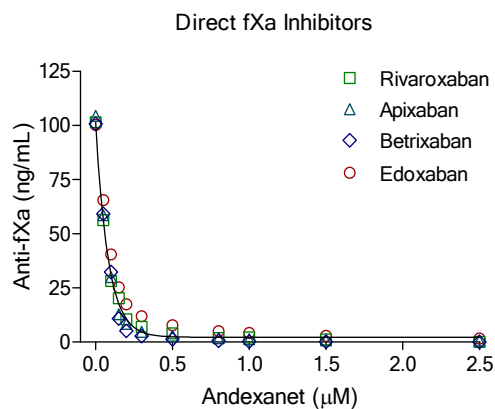
同様に、ヒト血漿を用いた社内 IIa 産生アッセイにおいて、andexanet は ATIII 依存性間接作用型 FXa 阻害剤であるエノキサパリンによる IIa 産生阻害も用量依存的かつ完全に無効化する（NC-12-0458-R0001）（Figure 8）。

Andexanet は、TFPI を除き、他の主要な血漿中凝固関連タンパクと明らかな相互作用を示さない。Andexanet-TFPI 間相互作用は、TF 誘導性 IIa 産生アッセイにおける FXa 阻害剤誘導性 IIa 産生阻害の無効化を促進する可能性があるが、aPTT 試薬を用いた非 TF 誘導性 IIa 産生アッセイ（TGA）において、*in vitro* で明らかな影響を及ぼさない。

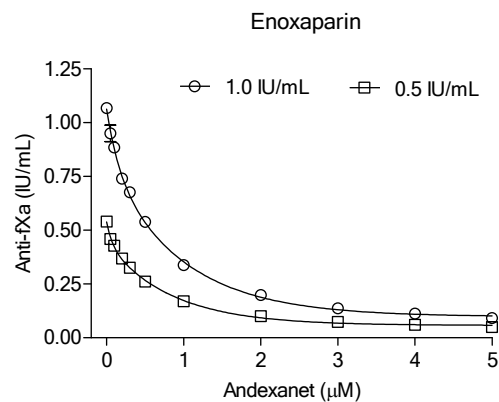
上述の TF-TGA（相対蛍光単位 [RFU]）アッセイによるヒト血漿を用いた *in vitro* 試験と一致して、TF-CAT アッセイを用いた試験においても、andexanet はエノキサパリン及びフォンダパリヌクスなどの ATIII 依存性 FXa 阻害剤を無効化することが確認された（RPD-000594）。しかし、*in vitro* での添加試料と比較して *in vivo* では抗 IIa 活性に対する抗 FXa 活性比が高くなる可能性があり、*in vivo* 又は臨床試験で採取したエノキサパリン試料の分析に TF-CAT アッセイを用いる場合には、エノキサパリン及びフォンダパリヌクスの無効化に対する andexanet の作用が異なっている点に注意する必要がある。また、*in vitro* 試験及び健康被験者での *ex vivo* 試験において、*in vivo* 試験ではエノキサパリン投与で TFPI 放出の増加がみられるが、*in vitro* 試験ではこのような TFPI 放出増加は認められないという点でも異なっている。

Figure 6: ヒト血漿中での直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 活性の andexanet による無効化

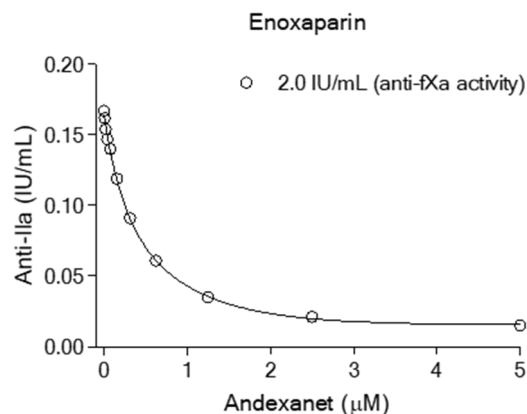
a. Direct FXa inhibitors (Anti-fXa)



b. Enoxaparin (Anti-fXa)



c. Enoxaparin (Anti-IIa)



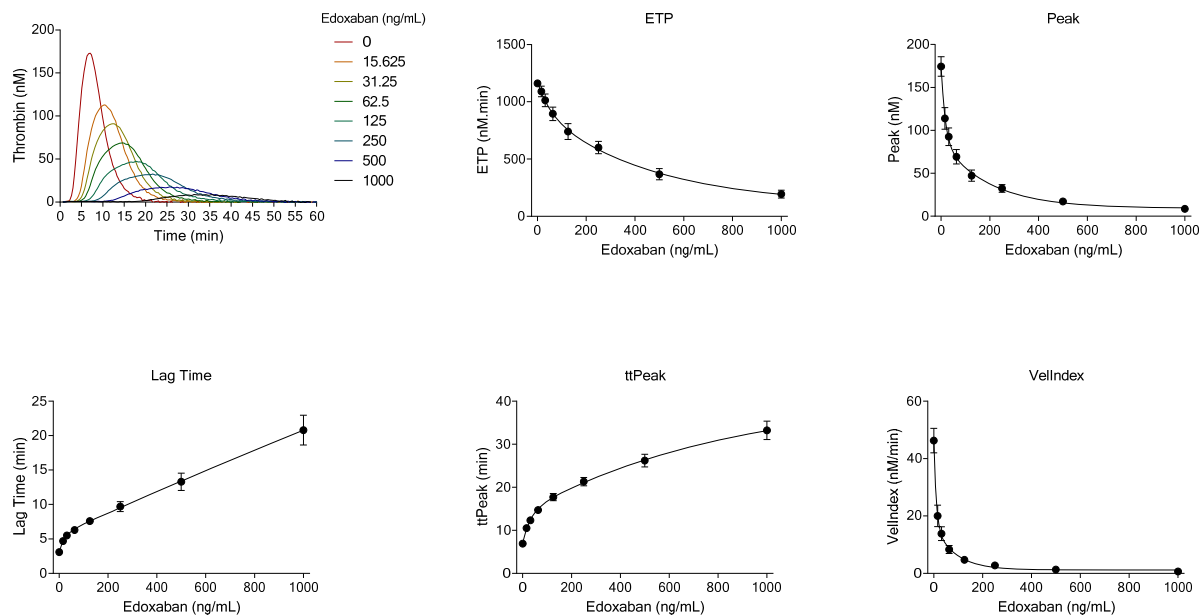
FXa = Factor Xa; IU = International unit; LMWH = Low molecular weight heparin

Legend: The plasma samples contained a fixed concentration of a FXa inhibitor and increasing concentrations of andexanet. Following pre-incubation, residual anti-fXa activity was measured and expressed as ng/mL for direct FXa inhibitors and IU/mL for LMWH, enoxaparin.

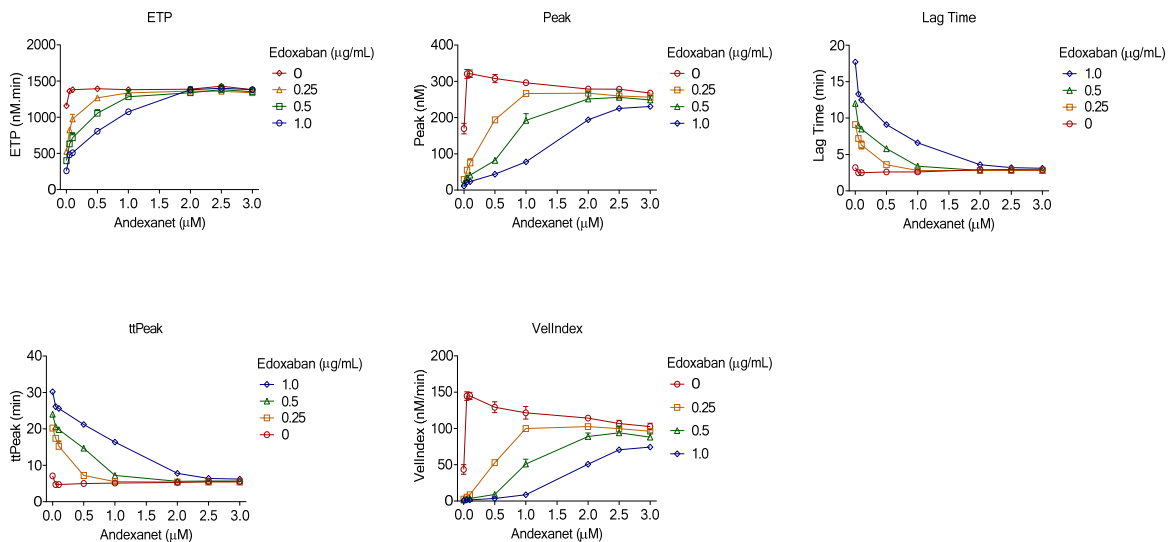
- (a) Reversal of direct FXa inhibitors rivaroxaban, apixaban, betrixaban, or edoxaban in human plasma. The concentration of each FXa inhibitor used in the assay was 100 ng/mL.
- (b) Reversal of indirect FXa inhibitor enoxaparin in human plasma. Two concentrations of enoxaparin (1.0 IU/mL, 0.5 IU/mL) were used in the assay.
- (c) Reversal of enoxaparin anti-IIa activity in human plasma. Enoxaparin concentration was based on anti-fXa activity (2.0 IU/mL). Higher enoxaparin concentration was required in the assay as it has less anti-IIa activity relative to the anti-fXa activity.

Figure 7: ヒト血漿中における直接作用型 FXa 阻害剤エドキサバンの IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化

a. Inhibition of thrombin generation by edoxaban



b. Reversal of edoxaban-induced anticoagulation by andexanet

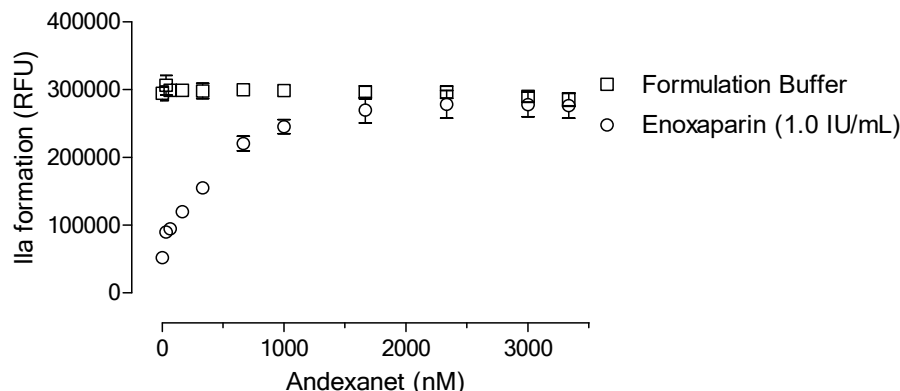


CAT = Calibrated automated thrombogram; ETP = Endogenous thrombin potential; Peak = Peak thrombin; TF = Tissue factor; ttPeak = time-to-peak; VelIndex = Velocity index

Legend: The TF-CAT experiments were performed using the PPP-reagent (5 pM TF/4.0 µM phospholipid) and the pooled plasma spiked with edoxaban (0 – 1.0 µM) in the absence or presence of andexanet (0 – 3.0 µM).

a. Inhibition of TF-initiated thrombin generation by edoxaban shown by the CAT profiles correction of each CAT parameter.
 b. Dose-dependent reversal of edoxaban-induced anticoagulation by andexanet shown by the correction of each CAT parameter.

Figure 8: ヒト血漿中における間接作用型 FXa 阻害剤エノキサパリンの IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化



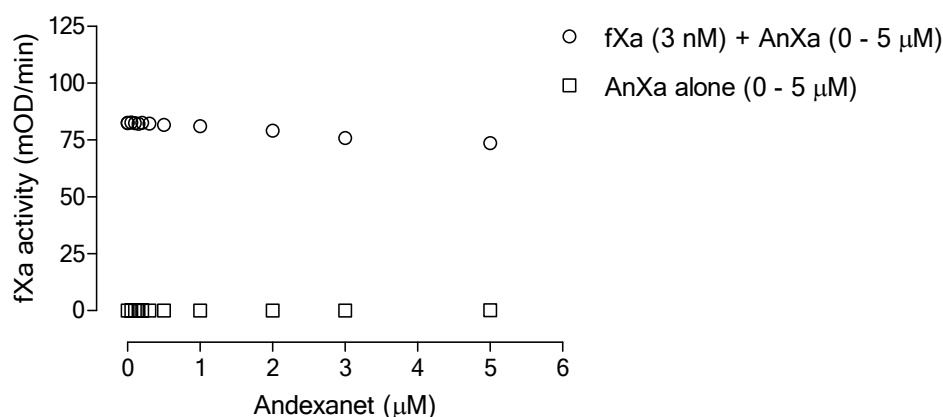
fXa = Factor Xa; IU = International unit; RFU = Relative fluorescence unit

Legend: Reversal of indirect fXa inhibitor enoxaparin-induced inhibition of thrombin generation was performed in human plasma using an in-house assay. A single concentration of enoxaparin (1.0 IU/mL) was incubated with increasing concentrations of andexanet. Equivalent volume of formulation buffer at each andexanet concentration was added to the plasma as control in the absence of enoxaparin.

2.1.3 Andexanet の *in vitro* での凝固促進及び抗凝固作用

In vitro 試験により、andexanet には凝固促進及び抗凝固作用がないことが確認された。FXa の活性部位であるセリンをアラニンに置換しているため、広範囲の andexanet 濃度 (0~5.0 $\mu\text{mol/L}$) において FXa の発色基質である Spectrozyme-FXa を切断する触媒活性がない (NC-12-0435-R0001 及び NC-12-0435-R0002) (Figure 9)。Gla ドメインが欠失していることから抗凝固作用がなく、トリペプチジル阻害剤の Glu-Gly-Arg-クロロメチルケトンで活性部位を阻害した Gla ドメインを保持する活性部位阻害ヒト FXa (FXa-EGR) と比較し (Figure 10)、andexanet は TF 誘導性 IIa 産生に影響を及ぼさない (NC-12-0451-R0001)。

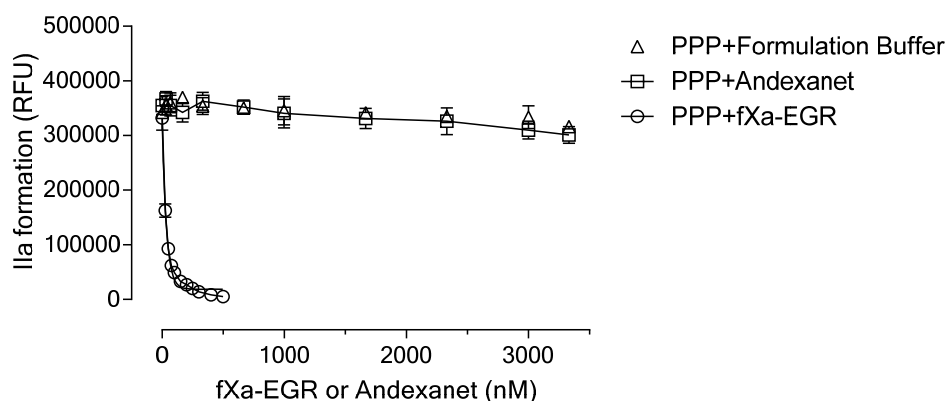
Figure 9: Andexanet の触媒活性評価



AnXa = Andexanet; fXa = Factor Xa; mOD = Milli-optical density

Legend: The reaction mixture contained andexanet (AnXa) with or without human FXa (3 nM) and 100 μM Spectrozyme-fXa in an assay buffer. The initial velocity of substrate cleavage was measured and expressed as mOD/min.

Figure 10: ヒト血漿中での IIa 産生アッセイにおける andexanet と FXa-EGR の活性比較



fXa-EGR = Factor Xa - Glu-Gly-Arg; PPP = Platelet poor plasma; RFU = Relative fluorescence unit

Legend: TF-initiated thrombin generation was performed using an in-house assay. The reaction mixture consisted of pooled human Platelet Poor Plasma (PPP), andexanet (0-3.3 μ M), equivalent volume of formulation buffer (as control) at each andexanet concentration, or FXa-EGR (0-0.5 μ M). Thrombin generation was expressed as Relative Fluorescence Units (RFU). Lack of anticoagulant activity with andexanet was evident by comparing to FXa-EGR.

また、andexanet はその生理学的基質であるプロトロンビン及び血液凝固第 VII 因子（FVII）に対する触媒活性も有さず、細胞アッセイにおいてヒトの血小板、白血球又は内皮細胞を活性化しない（NC-12-0438-R0001）。

Biacore 結合試験において、andexanet は TFPI を除き、主要な血漿中凝固関連タンパクと明らかな相互作用を示さないことが示されている（NC-12-0459-R0001、NC-12-0460-R0001、NC-12-0461-R0001）。これは、andexanet が改変型ヒト FXa 分子であり、FXa が TFPI に高い親和性を有することから予想されることである。

Andexanet-TFPI 間相互作用については、精製タンパクを用いた液相評価系（NC-12-0450-R0001）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた細胞アッセイ（NC-15-0662-R0001 及び NC-15-0662-R0002）、ヒト血漿における TF 誘導性及び非 TF 誘導性 IIa 産生（NC-15-0659-R0001、NC-15-0659-R0003）、並びにヒト全血中の凝固マーカー（F1+2、TAT）測定により詳細に検討した。

Andexanet は HUVEC を用いた液相評価系において、添加された TFPI 及び内皮細胞表面に発現した内因性 TFPI の両方に高い親和性で結合する。この相互作用は、HUVEC の活性化を誘導しない。また、FXa 阻害剤及び TFPI は andexanet の同じ部位に結合するため、FXa 阻害剤は緩衝液中又はヒト血漿中で HUVEC 上の andexanet-TFPI 間相互作用を用量依存的に阻止することができる。Andexanet は TFPI 及び FXa 阻害剤の両方に高い親和性で結合するが、血漿中又は HUVEC 表面の内因性 TFPI 濃度は比較的低いことから、andexanet-TFPI 間相互作用に対する FXa 阻害剤の影響は、主に andexanet と FXa 阻害剤とのモル濃度比によって決定される。

上記の所見と一致して、andexanet-TFPI 間相互作用は、TF による反応開始で、全血又は血漿中の IIa 生成を亢進させる。全血反応では、andexanet-TFPI 間相互作用により F1+2 及び TAT 濃度が増加する。ヒト血漿を用いた TF 誘導性 IIa 産生アッセイでは、andexanet-TFPI 間相互作用により、IIa ピーク値などの TFPI 活性の影響を受けやすい IIa 産生パラメータが上昇する。

Andexanet が TFPI に結合すると、TF 誘導性 IIa 産生アッセイでは、リバーロキサバンのような FXa 阻害剤の存在下で IIa 産生の回復が促進されるが、aPTT 試薬を用いた非 TF 誘導性アッセイでは検出可能な影響はない。Andexanet は、各 FXa 阻害剤の非 TF 誘導性 IIa 産生アッセイ（TFPI の影響がない条件）及び TF 誘導性 IIa 産生アッセイ（TFPI の影響がある条件）において、完全な

無効化を示した。

2.2 In Vivo 薬理試験

Andexanet 投与後の直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤による抗凝固作用の無効化をマウス、ラット及びウサギを用いて評価した。これらの試験により、andexanet による FXa 阻害剤誘導性抗凝固作用の急速な無効化は、出血量を減少させ、抗凝固作用を反映する他の PD マーカーを減少させることが示された。抗 FXa 活性は、FXa 阻害剤による抗凝固作用の一貫した信頼性の高い指標であり、抗 FXa 活性の減少はこれらのモデルで認められた出血量の減少と相関する。これらの非臨床データは、andexanet が凝固促進及び抗凝固作用を示すことなく止血を回復させ、出血を減少させることを示す上で重要である。

マウス及びラットを用いた初期の試験において、andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤であるリバーロキサバン及びアピキサバン投与後に認められる国際標準化比（INR）上昇を減少させ、抗凝固作用を無効化する可能性が示された（Table 2）。その後の試験で、急速かつ持続的で用量依存的な INR の回復は、抗 FXa 活性の減少、直接作用型 FXa 阻害剤の非結合型濃度の減少及び FXa 阻害剤の組織コンパートメントから血管内コンパートメントへの再分布によるものと考えられる抗凝固剤の総血漿中濃度の劇的で急速な増加と相関することが示された。

出血量に対する andexanet の作用を、十分に特性解析されたげっ歯類の尾切断モデル、改変ウサギ肝臓創傷モデル及びブタ多発性外傷モデルを用いて検討した。これらの試験では、緊急（救急）手術又は外傷による大出血の臨床状況を反映するため、andexanet を組織創傷の前（予防的モデル）又は後（治療的モデル）に投与した。Andexanet 投与後の出血量減少は、特定の阻害剤及び動物種に用いた PD マーカーにかかわらず、すべての場合において抗 FXa 活性、INR、プロトロンビン時間（PT）及び aPTT などの抗凝固作用を反映する PD マーカーの無効化との一貫した関連性を示した。総合すると、これらのモデルにおいて andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用を急速かつ完全に無効化するが、直接作用型 FXa 阻害剤に対する過剰なモル濃度比（約 1.2:1 以上の比率）の andexanet を必要とする（Table 2）。ウサギ及びブタ出血モデルのいずれにおいても、andexanet の単回ボラス投与により、抗 FXa 活性及び FXa 阻害剤の非結合型濃度が急激かつ一過性に減少し、出血量を顕著に減少させた（止血を回復させた）ことが示された。

Table 2: 動物モデルにおける直接作用型 FXa 阻害剤による抗凝固作用の andexanet による無効化

Study Number	Species	FXai	Blood Loss	PT/INR	Anti-fXa	Free [FXai]	Total [FXai]	Molar Ratio
Prophylactic Model								
NC-12-0457-R0001	Mouse	Riva	↓	↓	↓	ND	↑	1.9:1
NC-12-0449-R0001	Rat	Apixaban	ND	↓	ND	↓	↑	1.2:1
		Betrixaban	ND	↓	ND	↓	↑	2:1
NC-12-0453-R0001	Rat	Riva	ND	↓	ND	↓	↑	2.2:1
NC-13-0567-R0001	Rabbit	Edoxaban	↓	↓	↓	↓	↑	1.6:1
NC-14-0573-R0001	Rabbit	Riva	↓	↓	↓	↓	↑	1.5:1
Treatment Model								

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Study Number	Species	FXai	Blood Loss	PT/INR	Anti-fXa	Free [FXai]	Total [FXai]	Molar Ratio
NC-14-0575-R0001	Rabbit	Riva	↓	↓	↓	↓	↑	1.3:1
NC-17-0798-R0001	Pig	Apixaban	↓	↓	↓	↓	↑	3.5:1

ELISA = Enzyme-linked immunosorbent assay; IV = Intravenous; NC = No change; ND = Not determined; FXai = Factor Xa inhibitor; PT = Prothrombin time; INR = International normalised ratio; Riva = Rivaroxaban; ↓ or ↑ = Statistically significant decrease or increase in the outcome, relative to animals treated with anticoagulant alone

Notes: Molar ratio of plasma andexanet to total anticoagulant was determined using a molecular weight of 41 kDa for andexanet, 435.88 Da for rivaroxaban, and 548.06 Da for edoxaban. Plasma andexanet was measured by ELISA and the concentration was determined in ng/mL from a standard curve. Total anticoagulant levels were determined by liquid chromatography - mass spectrometry. Plasma samples were obtained immediately following the administration of andexanet (administered as an IV bolus over 5 minutes).

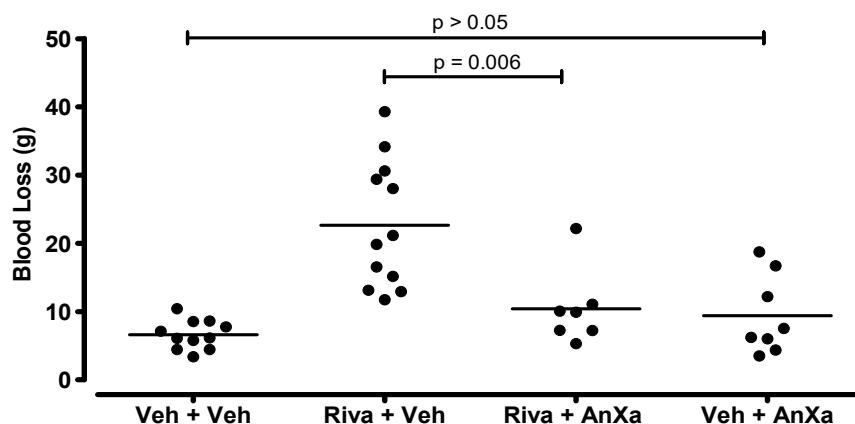
Table 3: ラット尾切断及びウサギ肝臓創傷モデルでの間接作用型 FXa 阻害剤による抗凝固作用の andexanet による無効化

Study Number	Method of Administration	Species	Blood Loss	aPTT	Anti-fXa Activity
NC-12-0432-R0001	Enoxaparin, IV bolus AnXa, IV bolus infusion, followed by continuous IV infusion	Rat	↓	ND	↓
NC-12-0437-R0001	Enoxaparin, IV bolus AnXa, IV bolus	Rat	↓	ND	↓
NC-12-0454-R0001	Enoxaparin, IV bolus AnXa, IV bolus infusion for 5 minutes, followed by continuous infusion	Rat	↓	↓	↓
NC-12-0456-R0001	Fondaparinux IV bolus AnXa, IV bolus infusion 5 minutes, followed by continuous infusion	Rat	↓	NS	↓
NC-15-0611-R0001	Enoxaparin, IV bolus AnXa, IV bolus infusion for 5 minutes,	Rabbit	↓	↓	↓

AnXa = Andexanet; aPTT = Activated partial thromboplastin time; FXa = Factor Xa; IV = Intravenous; ND = Not determined; NS = Not significant; ↓ or ↑ = Statistically significant decrease or increase in the outcome, relative to animals treated with anticoagulant alone

ウサギ予防的肝臓創傷モデルにおける出血量の andexanet による回復は、Lu et al.によって初めて報告され⁸⁾、リバーロキサバン投与で 2 倍に増加した出血量は、andexanet（75 mg/例）のボラス投与により回復した（Figure 11）。出血量の減少とともに、抗 FXa 活性（Figure 12）はベースラインまで低下した⁸⁾。

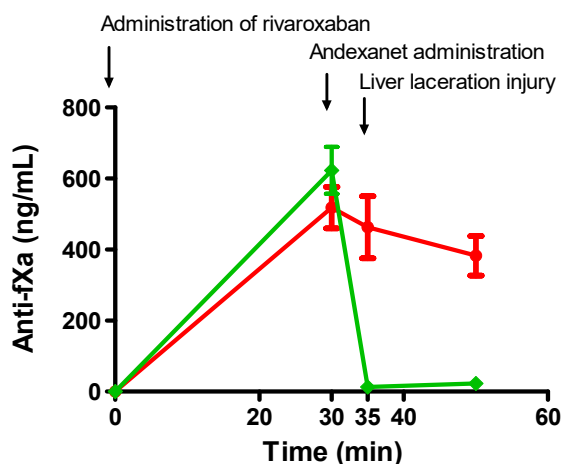
Figure 11: リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける出血量の andexanet 投与による減少



AA = Andexanet; AnXa = Andexanet; IV = Intravenous; Riva = Rivaroxaban; Veh = Vehicle

Legend: Andexanet reversed the anticoagulative effect of rivaroxaban. At the end of andexanet administration, ten 1-cm lacerations were made in 2 liver lobes (5 lacerations in each lobe), and blood was collected for 15 minutes onto pre-weighed gauze. An approximate 2-fold increase in mean blood loss was observed in rabbits treated with rivaroxaban-plus-vehicle vs. those treated with vehicle-plus-vehicle. Andexanet (75 mg/rabbit) administration to anticoagulated rabbits significantly reduced mean blood loss ($p = 0.006$ rivaroxaban + vehicle vs. rivaroxaban + andexanet).

Figure 12: リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける抗 FXa 活性の andexanet 投与による無効化

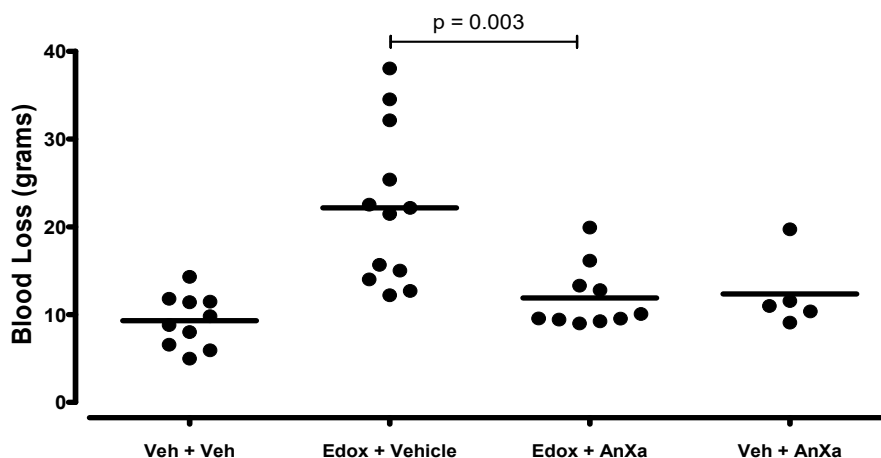


● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = Andexanet, 75 mg

Anti-fXa activity increased significantly 30 minutes following rivaroxaban administration and was rapidly reduced at the end of andexanet administration (at the time the liver injury was induced). After the 5 minute IV bolus administration of andexanet (75 mg/rabbit, 35 minute time point), mean anti-fXa levels decreased significantly in the group treated with andexanet ($p < 0.0001$ vs. rivaroxaban alone).

エドキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおいても同様の出血が認められた (Figure 13)⁹⁾。エドキサバンの抗凝固作用は出血量を約 2 倍に増加させた。溶媒投与群における出血量は 9.3 ± 3.0 g であり、エドキサバン単独投与群は 22.2 ± 8.9 g であった。抗凝固状態下のウサギに andexanet (75 mg/例) を予防的に投与したところ、出血量が 11.9 ± 3.7 g となり、エドキサバン単独投与群と比較して有意に減少した ($p=0.003$)。

Figure 13: エドキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける出血量の andexanet 投与による減少



AnXa = Andexanet; Edox = Edoxaban; IV = Intravenous; Veh = Vehicle

Legend: Animals were administered edoxaban by IV bolus, and after 20 minutes to allow for distribution of edoxaban into the tissues, andexanet was delivered IV over a period of 5 minutes. At the end of andexanet administration, ten 1-cm lacerations were made in 2 liver lobes (5 lacerations in each lobe), and blood was collected for 15 minutes onto pre-weighed gauze. Blood loss was significantly reduced by andexanet in edoxaban-anticoagulated rabbits ($p = 0.003$ edoxaban vs. edoxaban + andexanet)

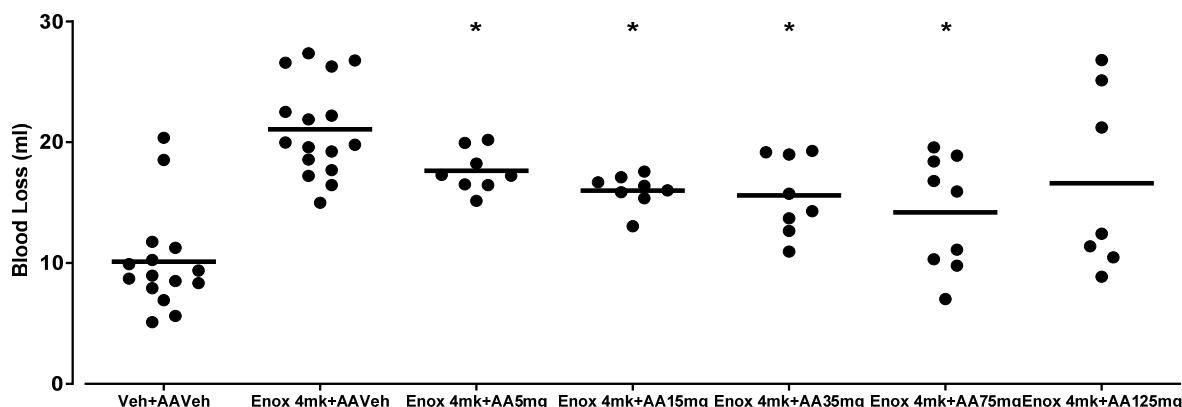
ATIII 依存性間接作用型 FXa 阻害剤であるエノキサパリン及びフォンダパリヌクスを用いてさらに *in vivo* 試験を行ったところ、andexanet はラットで出血量を減少させ、抗凝固作用を反映する複数の PD マーカーを無効化することが示された。これらのデータは、抗 FXa 活性の低下が andexanet の作用の一貫した PD 指標であるという考えを裏付けている (Table 3)。

エノキサパリン (4.5 mg/kg) を投与した抗凝固状態下のラットに andexanet を予防的にボーラス投与のみ (4 mg) 又はボーラス投与後に持続静脈内投与 (4 mg ボーラス投与後に 4 mg/hr で持続静脈内投与) すると、出血量が非抗凝固状態下のラットのレベルまで減少し、いずれの投与方法でも抗 FXa 活性が抗凝固状態下のラット対照群と比較して約 75% 減少した (NC-12-0432-R0001)。

エノキサパリン (4.5 mg/kg) を投与した抗凝固状態下のラットに andexanet (6 mg ボーラス投与後に 6 mg/hr で持続静脈内投与) を投与した試験では、15 分間の出血量が大幅に減少することが示された。持続静脈内投与終了時、抗凝固状態下のラットの抗 FXa 活性は、溶媒投与群で 6.5 IU/mL から 4.2 IU/mL に低下したが、andexanet 投与では 6.9 IU/mL から 2.0 IU/mL に低下した (約 71% の低下) (NC-12-0454-R0001)。

同様に、ウサギの予防的肝臓創傷モデルにおいて、andexanet のボーラス投与によりエノキサパリンの抗凝固作用による出血量は減少し (Figure 14)、抗 FXa 活性及び aPTT 延長は減少又は回復した (NC-15-0611-R0001)。

Figure 14: エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける出血量の andexanet 投与による減少



AA = Andexanet; Enox = Enoxaparin; mk = mg/kg, Veh = Vehicle

Legend: Andexanet reversed the anticoagulative effect of enoxaparin. A greater than 2-fold increase in blood loss was observed in rabbits treated with enoxaparin-plus-andexanet vehicle, vs those treated with vehicle-plus-vehicle. Andexanet administration to anticoagulated rabbits significantly reduced mean blood loss ($p = 0.03, 0.002, 0.003, 0.0007$, and 0.07 for the 5, 15, 35, 75, or 125 mg dose groups, respectively vs. enoxaparin (4 mg/kg) + vehicle). Asterisk (*) indicates a significant reduction in blood loss vs rabbits anticoagulated with enoxaparin and administered andexanet vehicle.

アピキサバン（20 mg/day を 4 日間）を投与した抗凝固状態下の German Landrace 種ブタを用いて、andexanet のボーラス投与（1,000 mg）又はボーラス投与（1,000 mg）後に 2 時間持続静脈内投与（10 mg/min）を行い、その作用を比較評価した⁴⁾。肝葉の 1 つを挫滅創傷し、左右大腿骨骨折後に、andexanet を投与した。複数の PD マーカー（抗 FXa 活性、IIa 産生、PT、外因系凝固能（EXTEM）及び内因系凝固能（INTEM）トロンボエラストグラフィー）並びに安全性マーカー（D ダイマー、TAT）及び血行動態パラメータを評価するとともに、出血量及び生存率への andexanet の効果を評価した。

Andexanet のボーラス投与のみ（創傷から 12 分後）の条件では、抗 FXa 活性は急速に減少し（98%減少）、約 2 時間後には対照群のレベルに戻った。ボーラス投与に持続静脈内投与を追加した条件下では、抗 FXa 値は持続静脈内投与での投与中は低く推移し、投与終了後は約 2 時間で徐々に対照群のレベルに戻った。先行実施した直接作用型 FXa 阻害剤を投与したウサギ肝臓創傷モデルで認められたように、andexanet ボーラス投与後にアピキサバンの血漿中非結合型濃度は 95%減少し、総濃度は約 6 倍増加した。抗凝固状態下の動物群では、創傷 12 分後の出血量が約 2 倍増加した。対照群では、創傷後の出血量が経時的に $3,402 \pm 766$ mL まで増加し、全例が失血死に至り、平均生存時間は 135 分であった。Andexanet 投与では、創傷後の総出血量は顕著に減少し、ボーラス投与単独で 63%（ $1,264 \pm 205$ mL）、ボーラス投与後の持続静脈内投与では 65%（ $1,202 \pm 95$ mL）減少した。

Andexanet 投与後の動物より採取した血栓の構造を走査型電子顕微鏡により観察した結果、広範囲のフィブリン重合及び網状構造（Sham 群と類似）による強固な血栓が形成されていることが確認された。一方、アピキサバン投与による抗凝固処置のみの対照群では、フィブリン重合や網状構造がみられない微小な血栓構造のみが観察された。

Andexanet 投与群では全例が試験期間中（5 時間）生存した。

以上の結果から、本試験で用いた重度多発性外傷モデルにおいて、andexanet のボーラス投与単

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

独でボーラス投与後 2 時間持続静脈内投与と同様の出血量の減少及び生存維持効果が示された。これらの結果から、正常な止血機構を有効化し出血を顕著に減少させるには、一時的な抗凝固作用の阻害で十分であることが示唆される。また、これらの結果から、安定した血栓が一旦形成されると、抗 FXa 活性が andexanet のボーラス投与終了後に対照群と同程度に戻ったとしても出血は増加しないことが示された。

アピキサバンを投与した抗凝固状態下の同一のブタ多発性外傷モデルを用い、低用量（抗 FXa 活性の無効化が低レベル）での影響についてもさらに探索した³⁾。抗凝固状態下のブタに創傷を施して出血を誘導し、続いて andexanet 500 mg のボーラス投与後に 500 mg の 1 時間持続静脈内投与、又は andexanet 500 mg のボーラス投与を実施した。抗 FXa 活性の無効化は約 75%～80%であったが、これらの動物で認められた出血量は顕著に減少しており、非抗凝固状態下の動物におけるレベルとほぼ同等であった。全例が処置完了まで生存した。これらの所見は、高用量 andexanet 投与で抗 FXa 活性が 90%超無効化されたときに認められた所見と同様であった。総合すると、これらの *in vivo* データは andexanet の臨床試験における所見と一致しており、効果的な止血の達成には、抗 FXa 活性の部分的無効化で十分であるという可能性をさらに示唆するものである。健康被験者（16-512 試験など）又は出血患者（ANNEXA-4 試験における抗 FXa 値が高い患者など）を対象とした臨床試験で用いられた andexanet の用量では、抗 FXa 活性が平均約 60%～70%無効化され、IIa 産生がベースライン値まで完全に回復した。止血の適切な回復にはこの程度の抗 FXa 活性の無効化で十分であり、この所見は上記の *in vivo* 出血モデルにおける結果と一致している。

第 VIII 因子欠損マウス（NC-13-0512-R0001）及びラット Wessler 静脈うっ血性血栓症モデル（NC-12-0420-R0001）に andexanet を血漿中濃度 3 µmol/L までの用量で単独投与したところ、andexanet は凝固促進及び凝固阻害作用を示さなかった。抗凝固剤を投与していないウサギ出血モデルに andexanet を血漿中濃度が 10 µmol/L 超となるよう投与したときも凝固促進作用は示されなかった（NC-14-0573-R0001 及び NC-14-0575-R0001）。また、andexanet と抗凝固剤である FXa-EGR の併用投与でも、凝固促進又は凝固阻害作用は亢進されない。

ウサギ肝臓創傷モデルを用いて、andexanet を FXa 阻害剤の他の中和剤と *in vivo* で比較した。これらの薬剤には、遺伝子組換え活性化血液凝固第 VII 因子製剤（rFVIIa、ノボセブ®）、3 因子含有プロトロンビン複合体濃縮製剤（3F-PCC、未承認薬）（3F）及び 4 因子含有（4F）プロトロンビン複合体濃縮製剤（4F-PCC、ケイセントラ®）が含まれた。Andexanet のみが出血量、抗 FXa 活性、PT、aPTT 及び直接作用型 FXa 阻害剤の非結合型血漿中濃度を有意に減少又は回復させ、これに対応して FXa 阻害剤の総血漿中濃度が増加した（Table 4）。さらに、リバーロキサバン（NC-14-0573-R0002）（Figure 15）及びエドキサバン（NC-13-0567-R0002）を投与した抗凝固状態下のウサギにおける andexanet の投与では、出血量と抗 FXa 活性間に高い相関が認められたが、リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける PCC 投与では、出血量と抗 FXa 活性間に相関は認められなかった（NC-14-0573-R0002）。

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

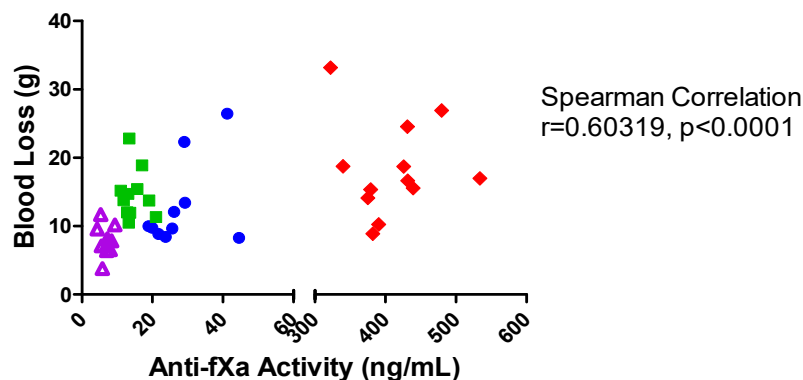
Table 4: 直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用に対する andexanet 及び各種中和剤の影響

Study Number	Group	Blood Loss	aPTT	Anti-fXa	Unbound Rivaroxaban	Total Rivaroxaban
NC-14-0573-R0001	Andexanet, 125 mg	↓	↓	↓	↓	↑
NC-14-0573-R0001	4F-PCC, 100 IU/kg	NS	NC	NC	NC	NC
NC-13-0561-R0001	Bebulin®(3F-PCC), 60 IU/kg	NC	NC	NC	NC	NC
NC-13-0561-R0001	NovoSeven® (rfVIIa), 150 µg/kg	NC	↓	NC	NC	NC

aPTT = Activated partial thromboplastin time; FXa = Factor Xa; NC = No change; ND = Not determined; NS = Not significant; PCC = Prothrombinase complex concentrates; rfVIIa = Recombinant factor VIIa; ↓ or ↑ = Statistically significant decrease or increase in the outcome, relative to animals treated with anticoagulant alone

Notes: All changes designated above are relative to values observed in rivaroxaban-anticoagulated rabbits, administered IV at a dose of 1 mg/kg. Reversal agents were administered by IV bolus over 5 minutes, beginning 30 minutes after administration of rivaroxaban. Immediately following the end of administration of the reversal agent, a blood sample was taken for measurement of PD markers, liver injury was induced, and blood was collected onto pre-weighed gauze to determine blood loss (15 minutes). Blood samples were taken at 30 minutes, immediately prior to liver injury for measurement of PD markers, and blood was collected onto pre-weighed gauze to determine blood loss (15 minutes).

Figure 15: Andexanet のウサギ肝臓創傷モデルでの出血量と抗 FXa 活性との相関性



△ = Rivaroxaban + 125 mg andexanet; ■ = Rivaroxaban + 100 mg andexanet; ● = Rivaroxaban + 75 mg andexanet; ◆ = Rivaroxaban with vehicle (no antidote)

AnXa = Andexanet; FXa = Factor Xa; IV = Intravenous

Legend: Rabbits were anticoagulated with 1 mg/kg rivaroxaban (t=0, IV bolus). At t=30 minutes, AnXa was administered at 75, 100, and 125 mg/rabbit (IV bolus over 5 minutes), and livers were lacerated at the end of AnXa administration. Blood was collected onto pre-weighed gauze (15 minute bleed time), and the gauze was weighed to determine blood loss (in grams). Anti-fXa was measured as described by 8). Non-parametric analysis of data from individual animals (Spearman correlation, confirmed with Kendall's tau analysis, SAS 9.3) indicates a significant correlation between blood loss and anti-fXa activity (p < 0.0001).

2.3 安全性薬理試験

2.3.1 ラットを用いた呼吸器系及び中枢神経系の安全性薬理試験

雄ラットを用いた andexanet の GLP 適用呼吸器系 (NC-11-0395) 及び中枢神経系 (NC-11-0396) の安全性薬理試験において、単回静脈内投与での投与可能な最大用量 (MFD、30 mg/kg) まで毒

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

性所見は認められなかった。

2.3.2 サルを用いた心血管系の安全性薬理試験

Andexanet の心血管系に対する安全性は、カニクイザルを用いた GLP 適用 2 週間反復投与毒性試験（[NC-11-0394](#)）の一環として評価した。3 日ごとの静脈内投与（1 日 2 回投与）で MFD の 60 mg/kg/day まで、ECG パラメータ及び血圧に対する影響は認められなかった。

3 薬物動態試験

Andexanet の非臨床 PK を明らかにするため、ラット及びサルを用いた単回投与 PK 試験を実施した（Table 5）。これらの非臨床動物試験では、検討したすべての動物種において andexanet の血漿中濃度推移は指数関数的に減少した。PK 試験では、分布相の消失半減期は短く、終末相の消失半減期はばらつきがあるものの長いことが示された。Andexanet の投与により、すべての動物種で予測可能で用量依存的な曝露が認められ、分布容積（ V_{ss} ）は比較的小さいことが示された。

Table 5: Andexanet を単回静脈内投与したときの PK パラメータ（平均値±SD）

Species	N	Dose	Terminal $t_{1/2}$ (hours)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/mL}$)	V_{ss} (mL/kg)	CL (mL/hr/kg)
Sprague Dawley Rat ¹	4	1 mg	10.1 ± 1.3	65.8 ± 5.8	34.3 ± 5.6	266 ± 90	99 ± 17.5
Rhesus Monkey ²	2	10 mg	1.93 ± 1.1	10.7 ± 2.8	8.49 ± 4.0	147 ± 14	123.6 ± 56.8
Cynomolgus Monkey	3 ³	1 mg/kg	3.8 ± 2.1	9.6 ± 0.7	12.2 ± 0.8	164.2 ± 20	82.9 ± 5.3
	3 ³	5 mg/kg	2.7 ± 1.1	61 ± 9.3	64 ± 21	123.1 ± 17.6	84.5 ± 31.3
	12 ⁴	10 mg/kg	12.7 ± 7.3	165 ± 19.6	144 ± 29.1	79.6 ± 11.2	72.3 ± 14.1

¹ NC-12-0442-R0001.

² NC-12-0441-R0001.

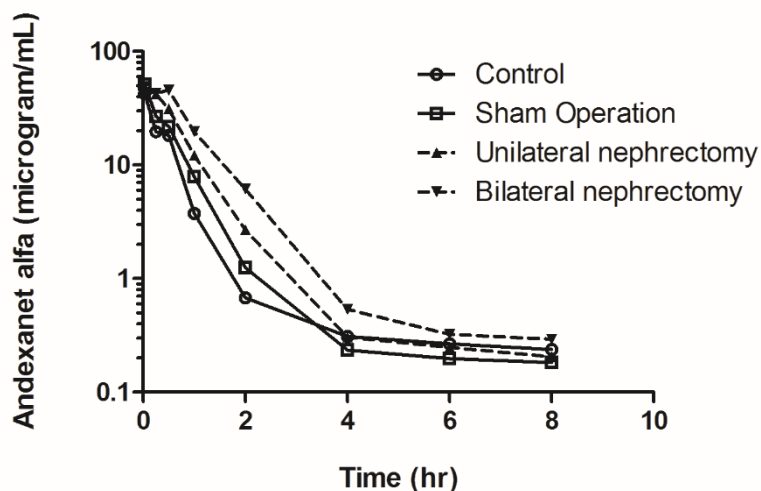
³ NC-12-0470-R0001.

⁴ NC-12-0469-R0001.

AUC = Area under the curve; CL = Clearance; C_{max} = Maximum observed plasma drug concentration; IV = Intravenous; RSD = Relative standard deviation; $t_{1/2}$ = Half-life; V_{ss} = Volume of distribution at steady state

ラット及びサルにおける andexanet の血漿クリアランス（CL）は 72.3～123.6 mL/hr/kg であり、 V_{ss} は小さかった（147～266 mL/kg）。これは、両動物種の血液容積と細胞間液（間質液）容積の総和にほぼ等しい ¹⁵⁾。分布相の消失半減期は約 20～30 分であったが、終末相の消失半減期はアカゲザルで約 2 時間、カニクイザルで 2.7～12.7 時間、ラットで約 10 時間であった。終末相の消失半減期が、試験間及び動物種間でばらついた理由としては、分析法の感度の問題により消失相の濃度を正確に測定できなかった可能性がある。正常、片側及び両側腎臓摘出ラットを用いた比較試験から（NC-12-0443）、腎排泄が andexanet の主要な消失経路であると考えられた。腎 CL は全身 CL の約 50%を占めた。Andexanet の平均血漿中濃度推移を Figure 16 に示す。

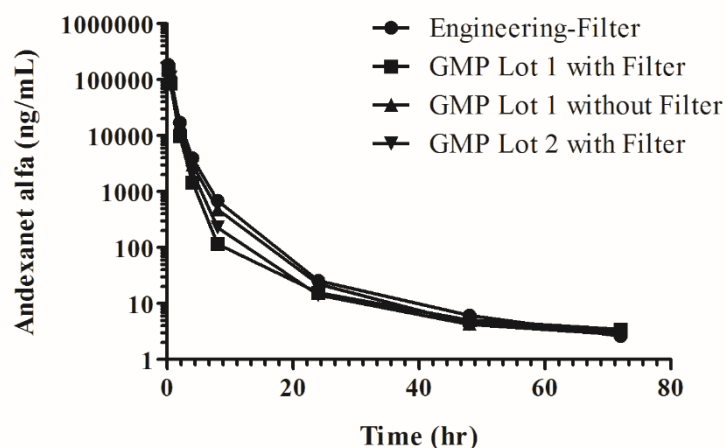
Figure 16: 腎臓両側摘出、腎臓片側摘出、偽手術施行又は無処置ラットに 3 mg/kg の andexanet を静脈内投与したときの平均血漿中濃度推移



サルを用いた PK 試験（NC-12-0469-R0001）において、Generation 1 を用いて製造した開発（エンジニアリング）ロット及び「医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（GMP）」に適合した 2 ロット（GMP 凍結製剤臨床ロット [GMP ロット 1 : ■■■■■] 及び GMP 凍結乾燥製剤臨床ロット [GMP ロット 2 : ■■■■■]）の間の同等性／同質性が実証された。

このサルを用いた試験では、異なるロット及び条件（インラインフィルターの有無）で血漿中濃度推移（Figure 17）はほぼ同様であった。投与 8 時間後の血漿中濃度に差がみられたものの、この時点までに 99%超の andexanet が消失した。血漿中濃度推移はラットと同様に二相性を示した（NC-12-0469-R0001）。

Figure 17: カニクイザルにエンジニアリングロット又は GMP 適合の最初の 2 ロットを異なる条件（フィルターの有無）で投与したときの平均血漿中濃度推移（Generation 1）



Andexanet 製剤の凍結液剤及び凍結乾燥製剤の同等性／同質性は、第 2 相 12-502 試験（モジュール 3）でも確認された。

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

4.1 項に示すサルを用いた GLP 適用毒性試験（NC-16-0757）において、Generation 1 及び Generation 2 の単回投与時の andexanet のトキシコキネティクスを比較した。Andexanet の PK パラメータ〔血漿中濃度曲線下面積（AUC）、CL、消失半減期〕は、Generation 1 と Generation 2 ではほぼ同等であった。

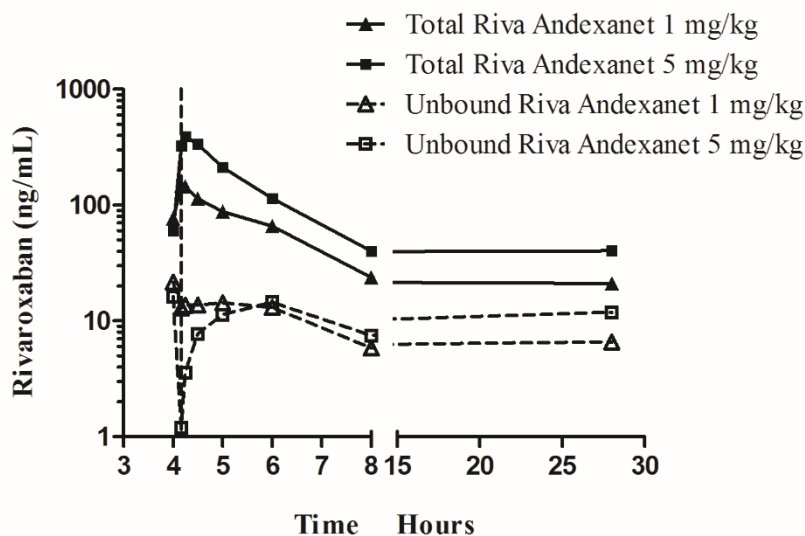
Andexanet は、FXa と同じ親和性で FXa 阻害剤に結合するようにデザインされており、凝固促進及び凝固阻害作用はない。静脈内投与後の andexanet は FXa 阻害剤の非結合型分子（活性型）に速やかに結合し、FXa 阻害剤の PK に顕著な影響を及ぼす。Andexanet の GLP 非適用 PK 試験 2 試験では、ラット及びサルを用いてリバーロキサバンとの併用試験を実施し、直接作用型 FXa 阻害剤と andexanet との PK 相互作用を検討した（Table 6）。ラットの試験では、リバーロキサバンの PK に対する一連の andexanet 静脈内投与による影響を検討した。Andexanet 単独投与群は設定しなかったため、リバーロキサバンが andexanet の PK に及ぼす影響を評価することはできなかった。一方、サルを用いた試験では、リバーロキサバン非併用及び併用下で andexanet の異なる 2 用量の PK を比較した。これらの試験により、andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤の PK に顕著な影響を及ぼし、リバーロキサバンの血中総濃度を速やかに上昇させるという *in vivo* 薬理試験の所見が裏付けられた。これはおそらく、血液外コンパートメントと血液内コンパートメントで非結合型濃度が平衡状態を維持するためと考えられる。また、サルを用いた試験では、リバーロキサバンによる andexanet の PK への影響は andexanet の予定臨床用量より低用量でのみ認められたがその程度は低かった。

Table 6: Andexanet と FXa 阻害剤との相互作用試験

Species	Andexanet Dose (mg/kg)	Rivaroxaban Dose (mg/kg)	Study Number
Rat	0	1	NC-12-0440
	2, 1, 1, 1	1	
Monkey	1	0	NC-12-0470
	1	60	
	5	0	
	5	60	

リバーロキサバンの PK に対する andexanet の影響の一例として、サルに andexanet 投与後のリバーロキサバンの総濃度が上昇した。リバーロキサバンの C_{max} の上昇は、andexanet 1 mg/kg 投与群（約 2 倍）よりも andexanet 5 mg/kg 投与群（約 5.5 倍）で顕著であった。これに一致して、リバーロキサバンの非結合型濃度は andexanet の高用量群でより大きく減少した（1 mg/kg 群で 40%、5 mg/kg 群で 93%）。リバーロキサバンの血漿中総濃度の上昇及び非結合型濃度の減少を Figure 18 に示す。

Figure 18: カニクイザルにリバーロキサバン（60 mg/kg）を投与後、andexanet を投与したときのリバーロキサバンの平均血漿中総濃度及び非結合型濃度



Andexanet 及びリバーロキサバンを用いた PK 試験により、andexanet を静脈内投与すると血液中の直接作用型 FXa 阻害剤の非結合型（遊離型）濃度が減少すると同時に総濃度が数倍上昇するという動物を用いた PK-PD 試験 (NC-13-0567-R0001 及び NC-14-0575-R0001) の結果が得られた。これらの変化は、コンパートメント間で非結合型分子が平衡を維持するための結果である可能性が高い。Andexanet がタンパク質分解を介して血液中から除去されると、FXa 阻害剤の非結合型は血液外コンパートメントから放出され、再び平衡化すると考えられた。非臨床 PK 試験の結果から、非臨床動物種における andexanet の PK が十分に明らかとなり、FXa 阻害剤と andexanet 併用による血中濃度の関係も明確になった。

4 毒性試験

Andexanet の毒性をラット及びサルを用いて評価した（Table 7）。Andexanet 投与の目的は、FXa 阻害剤による抗凝固作用の無効化し、血液凝固バイオマーカー値をベースライン値まで回復させることであるため、サルを用いた試験では andexanet を単独又は FXa 阻害剤と併用投与した。

4.1 反復投与毒性

Table 7 に示す通り、60 mg/kg/day の用量までの andexanet の 2 週間反復静脈内投与毒性試験 4 試験が完了している。Sprague Dawley ラットには 1 日 2 回連日投与し、カニクイザルには 3 日ごとに 4 時間間隔で 1 日 2 回投与した。60 mg/kg/day は投与用量に基づく MFD である。いずれの試験においても andexanet 投与による毒性作用は最高用量まで認められず、無毒性量（NOAEL）は 60 mg/kg/day であった。

Andexanet の開発中に、数種の製剤を検討した。初期の試験では凍結液剤を評価し、続くサルの試験では凍結液剤と同じ精製法を用いた Generation 1 と称される製造工程で製造した凍結乾燥品を評価し、最終的には収率の高い最適化された精製法を用いた Generation 2 と称される製造工程で製造した凍結乾燥品を使用した。サルにおける 60 mg/kg/day 投与後の曝露量は、Generation 1 又は Generation 2 のいずれの製造工程で製造した andexanet も、臨床試験における予定臨床用量での曝露量より十分に高かった。

Table 7: Andexanet の毒性試験プログラム

試験の種類及び 期間	試験番号	FXa 阻害剤の 併用投与	投与経路	GLP 適用	動物種	製造工程
単回投与毒性試験	NC-12-0472	なし	静脈内	非適用	サル	Generation 1
単回投与毒性試験 (1 日 2 回投与)	NC-13-0545	なし	静脈内	適用	サル	Generation 1
反復投与毒性試験						
2 週間	NC-11-0397	なし	静脈内	適用	ラット	Generation 1
2 週間	NC-11-0394	エノキサパリン、 リバーロキサバン	静脈内	適用	サル	Generation 1
2 週間	NC-12-0417	アピキサバン、 betrixaban	静脈内	適用	サル	Generation 1
2 週間	NC-16-0757	アピキサバン	静脈内	適用	サル	Generation 1 及び Generation 2

GLP=医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、FXa=活性化血液凝固第 X 因子

ラットでは、すべての用量で雌雄ともに PT のわずかな延長（溶媒投与群と比較して 1 秒以下）が認められたが、出血のリスク増加を伴わないと考えられることから、毒性ではないと判断された（NC-11-0397）。ラットにおける PT 延長の原因は不明であるが、この変化は 4 週間の回復期間後に回復した。また、死亡が 5 例に認められたが、静脈内投与直後に死亡したこと、インライン

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

フィルターの接続の緩みから空気が混入したことが確認されたことから、死因は心臓の空気塞栓によるものと考えられた。これら 5 例の死因は andexanet と関連なしと判断された。

カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験は 3 試験実施した。最初の試験（NC-11-0394）では、カニクイザルに 0（溶媒）、6、20 及び 60 mg/kg/day の andexanet を 3 日ごとに 1 日 2 回単独投与した。さらに、andexanet 60 mg/kg/day にリバーロキサバン又はエノキサパリンを併用する群を追加し、毒性を評価した。2 回目の試験（NC-12-0417）では、カニクイザルに andexanet 60 mg/kg/day 又は溶媒にアピキサバン又は betrixaban を併用投与した。最初の試験では、大規模でより包括的に毒性評価項目を評価した。2 回目の試験では、異なる FXa 阻害剤（アピキサバン及び betrixaban）を使用したときの主要な毒性所見の差異を評価した。最初の試験では、andexanet 投与後のいずれの時点でも凝固能（PT 又は aPTT）に変動は認められなかった。2 回目の試験では、凝固能（PT、aPTT、フィブリノーゲン）、血液学的検査又は血液生化学的検査パラメータに毒性作用は認められなかった。唯一の有意な所見として、最初の 2 週間反復静脈内投与試験で、Day 13（最終投与日）に 60 mg/kg/day の andexanet を投与した雄サルで投与直後にアナフィラキシーが認められた（NC-11-0394）。この動物は抗ヒスタミン薬及びアドレナリンの投与により回復し、動物に異種（ヒト）タンパクを反復投与したときに認められることがある所見のため、毒性作用ではないと判断した。3 回目の試験である NC-16-0757 試験では、市販製品用製造工程（Generation 2）で製造された原薬を用い、これまでに検討された最高用量 60 mg/kg/day の andexanet 単独又は FXa 阻害剤であるアピキサバンとの併用投与における毒性を検討した。Generation 1 andexanet は Day 1 のみ投与し、Generation 2 andexanet とトキシコキネティクスプロファイルと比較した。本試験の Day 1 における andexanet のトキシコキネティクス及び毒性プロファイルは、Generation 1 と Generation 2 で同様であった。Generation 2 andexanet の NOAEL は 60 mg/kg/day であり、Generation 1 andexanet を用いた先の試験で観察された NOAEL と同じであった。Generation 2 andexanet の毒性は、全評価項目を比較した過去の試験で確認された Generation 1 andexanet の毒性と同様であった。

試験した最高用量まで両動物種に毒性所見が認められなかったことから、ラット及びカニクイザルにおける Generation 1 及び Generation 2 andexanet の NOAEL は 60 mg/kg/day である。Generation 1 と Generation 2 の andexanet 曝露量及び安全性が同程度であったことから、Generation 1 andexanet を用いて実施した安全性評価は、Generation 2 andexanet の使用を裏付けるものであることが示された。

異種タンパクを反復投与した動物にしばしば認められるように、最初のサルを用いた試験では、2 週間の投与期間終了時に andexanet 投与群の 50 例中 36 例に andexanet に対する抗体が検出された。4 週間の回復期間終了時には、低用量群（6 mg/kg/day）の 1 例を除きすべてのサルに andexanet に対する抗体が検出された。2 回目の試験（NC-12-0417）では、回復群のサル 8 例中 7 例（87%）で、回復期間終了時に抗体が検出された。Generation 1 andexanet を用いた試験と同様に、Generation 2 andexanet を用いた試験（NC-16-0757）では、投与期間終了時点で 55%の動物が andexanet に対する抗体を産生したのに対し、回復期間終了時点で 75%の動物が抗体を産生した。ラット及びカニクイザルを用いた試験のいずれにおいても、リバーロキサバン又はエノキサパリンの *in vitro* 又は *in vivo* FXa 阻害活性に対する andexanet の中和能は Day 1 から Day 14 まで変化しなかった。また、ラット及びカニクイザルを用いた試験において抗体産生による andexanet のトキシコキネティクスは Day 1 から Day 14 まで変化しなかった。

最初のカニクイザルを用いた GLP 適用毒性試験（NC-11-0394-R0001）では、血管内凝固又は内因性 FXa 活性阻害を示唆する D ダイマー又はラッセル蛇毒時間（RVVT）の変化は当初認められ

2.4 非臨床試験の概括評価 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

なかった。しかし、本試験で得られた一部の血漿試料について、その後、サル血漿との交差反応性がより高い酵素免疫吸着測定（ELISA）法を用いて D ダイマー及び TAT を再測定した（NC-12-0472）。Day 13 の試料の再分析では、andexanet 60 mg/kg/day 投与群の全例で TAT 濃度は andexanet 投与後 0.5 時間までに投与前値と比較して増加した（NC-11-0394-R0004）が、andexanet 投与後 24 時間までにベースライン値に回復した。重要な点として、カニクイザルにおける andexanet とリバーロキサバンの併用投与時の TAT 濃度は、andexanet 投与後の全時点で andexanet 単独投与群よりも低かった。毒性評価における TAT 濃度の変化は、Generation 1 及び Generation 2 原薬で同程度であった（モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文）。いずれの試験でも、カニクイザルにおける D ダイマーの定量値（モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文）は、FXa 阻害剤非存在下で andexanet を投与した唯一の試験であるヒト単回漸増投与試験（11-501 試験）で観察された値よりも高かった。その後実施した andexanet と FXa 阻害剤とを併用投与した臨床試験では、単回漸増投与試験で評価した用量より高い臨床用量でも D ダイマー濃度が低かった（12-502 試験モジュール 2）。

同様に、Generation 1 又は Generation 2 の andexanet のいずれについても、60 mg/kg/day 投与後の D ダイマー濃度の増加は同程度であった。Day 13 の D ダイマー濃度は andexanet 投与後 0.5 時間から投与前値と比較して徐々に増加し、andexanet 投与後 24 時間にピークに達した。Andexanet とリバーロキサバン又はアピキサバンとの併用投与では、andexanet 単独投与群と比較して D ダイマー濃度が低かった。また、サルを用いた最初の試験（NC-11-0394-R0004）及び Generation 2 andexanet での毒性試験（NC-16-0757）のいずれにおいても、Day13 の投与前値は極めて低く、反復投与試験を通じてクリアランスを示したことから、反復投与後の TAT 及び D ダイマー値に蓄積はないと考えられた。全般的に、非臨床安全性試験で認められた TAT 及び D ダイマーの増加は、臨床試験で認められた増加よりも高値であり、これらの高い曝露量でもカニクイザルで毒性作用は認められなかった。TAT 濃度で観察されたように、NC-11-0394 試験（モジュール 2.6.6 毒性試験の概要文）の試料を用いた改変アッセイで測定された RVVT 濃度は、単回漸増投与試験（11-501 試験）又は第 2 相試験（12-502 試験モジュール 2）での最高臨床用量（800 mg ボーラス投与に続き 960 mg を 8 mg/min で 120 分間持続静脈内投与）投与時よりも高かった。

最初の毒性試験において、andexanet を投与したサルで観察された血栓の発現頻度は、溶媒を投与したカニクイザルで観察された発現頻度と同じであった。2 回目の試験（NC-12-0417）では、RVVT はアピキサバン若しくは betrixaban 単独又はアピキサバン若しくは betrixaban と andexanet との併用投与の影響を受けず、本試験で andexanet を投与したサルでは、アピキサバン又は betrixaban を単独投与したサルと比較して、病理組織学的検査において血栓の発現頻度が上昇した個体はなかった。最初の毒性試験（NC-11-0394）で血管内に小血栓が散見されたことと一致して、Generation 2 andexanet 投与群及び Generation 2 andexanet とアピキサバンの併用投与群のそれぞれ 2/6 例において、肺の微小細動脈に小血栓（1 病変）が認められた。通常の HE 染色では、アピキサバン併用投与群（2/6 例）及び andexanet 単独投与群（1/6 例）に小血栓が認められた。血栓の可視化に優れるトリクロム特殊染色による検査では 2 つの血栓を検出し、そのうち 1 病変は HE 染色を用いて特定したものであった（NC-11-0394-R0001）。認められた血栓は散発的であったため、andexanet の投与に起因するものではないと判断した（NC-16-0757）。このような血栓は被験物質を静脈内投与した動物でしばしば認められる^{1),6),13)}。いずれの毒性試験においても、回復動物に血栓は認められなかった。なお、健康被験者を対象に Generation 1 と Generation 2 の andexanet を比較した第 1 相 PK-PD 比較試験（16-512 試験）では血栓性イベントは認められず、Generation 1 と Generation 2 の患者間で血栓性イベントに不均衡は認められなかった。

標準的な包括的毒性評価に基づき、Generation 2 andexanet の NOAEL も 60 mg/kg/day と考えられ、非臨床試験に用いた動物種とヒトとの間の安全域は Generation 1 andexanet と Generation 2 andexanet で同等であることが示された。

4.2 遺伝毒性

ICH S6 ガイドラインに従い、andexanet を用いた遺伝毒性試験は適切ではないと考えられた。Andexanet は、標準的な医薬品に対する懸念の原因となる有機結合分子を有さない標準的なバイオテクノロジー応用タンパク質である。

4.3 がん原性ーリスク評価

FXa の作用機序に関与する血液凝固カスケードについて利用可能なデータ及び文献情報を慎重に検討した結果、andexanet の発がんリスクは低いと考えられる。したがって、非臨床試験によるがん原性の評価は不要と考えられる [ICH ガイドライン S1A、S1C 及び S6 (R1)]。Andexanet にがん原性試験は不要であるというこの見解は、CHMP との対面助言 (20 年 月 日) 及び FDA との 相談 (20 年 月 日) で合意された。

この見解を裏付けるためのリスク評価では、以下の点が考慮される。

- 単回投与で使用する製品であること。
- がん原性はないと考えられる血液凝固系の FXa を修飾したタンパク質製剤であること。
- 免疫調節作用を有する生物由来製品のような発がんリスクを増加させる免疫調節作用や免疫抑制作用を有する可能性は低いこと^{5),7)}。
- FXa 由来のタンパク質製剤は DNA 反応性分子ではなく、細胞増殖パターンを変化させるエピジェネティックな影響もないと考えられること⁵⁾。
- PK 試験に基づき、andexanet は血管コンパートメントのみに分布して速やかに排泄され、消失半減期は約 4~5 時間であること。

科学的な重要度に基づく評価により、andexanet の非臨床試験によるがん原性評価は不要であるという考えが裏付けられる。

4.4 生殖発生毒性

ICH S5 (R2) に基づき、andexanet の生殖発生毒性試験は不要と考えられる。以下に示す根拠により andexanet は生殖発生毒性を有しないと考えられる。1) Andexanet は凝固カスケード内の内在性タンパク質 (FXa) を改変したバイオテクノロジー応用医薬品である。2) Andexanet の半減期が非常に短い (1~2 時間の有効半減期)。3) Andexanet は FXa 阻害剤の一般的な中和剤として設計されており、主に生殖能のない高齢患者集団に処方される。この見解は、ICH ガイドライン M3 (R2) に関する CHMP との対面助言 (20 年 月 日) において確認された。さらに、FXa 阻害剤が妊娠中は禁忌であることも重要である。また、この見解は FDA にも認められている (20 年 月 日付電子メール)。

4.5 局所刺激性

独立した局所刺激性試験は実施しなかったが、各毒性試験で局所刺激性を評価したところ、静脈内投与部位に有害所見は認められなかった。

5 総括及び結論

Andexanet は、直接作用型又は間接作用型 FXa 阻害剤の投与を受けた患者における抗凝固作用の中和剤として開発されている。Andexanet はヒト FXa の遺伝子組換え型であり、ヒト FXa を酵素的に不活性化するように改変されており、andexanet 自体は凝固促進及び抗凝固作用のいずれも有さないことが示されている。非臨床試験プログラムでは、*in vitro* 特性及び *in vivo* 活性を詳細に評価し、PK 及び毒性の特徴を明らかにした。エドキサバン及びエノキサパリンの最新情報を含めた科学的な重要度に基づく評価により、直接作用型又は間接作用型 FXa 阻害剤の使用による大出血事例や緊急手術時、抗凝固作用の速やかな無効化を目的とした andexanet の使用が裏付けられる。

薬理試験プログラムを通じて、抗 FXa 活性は抗凝固作用の一貫した信頼性の高いマーカーであった。抗 FXa 活性は、FXa 阻害剤による FXa 酵素活性阻害の直接的評価基準であり、リバーロキサバン、アピキサバン及びエドキサバンの血漿中濃度と 1:1 の相関を示す（例えば、血漿中アピキサバン濃度 100 ng/mL=アピキサバンの抗 FXa 活性 100 ng/mL）。抗 FXa 活性の上昇は IIa 産生の低下と相関する。抗 FXa 活性は出血動物モデルにおける出血量とも相関する。

In vitro 特性解析により、以下の点が示された。

- Andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤（リバーロキサバン、アピキサバン、betrixaban 及びエドキサバン）のみならず、ATIII 依存性間接作用型 FXa 阻害剤（未分画ヘパリン、エノキサパリン及びフォンダパリヌクス）にも高い結合親和性を示した。
- Andexanet は、FXa のペプチジル基質又はその生理学的基質であるプロトロンビン及び FVII に対する触媒活性を有さず、細胞アッセイでヒトの血小板、白血球又は内皮細胞を活性化しない。
- Andexanet は、精製タンパクを用いた液相評価系においても、ヒト血漿中においても、用量依存的に FXa 阻害剤の抗凝固作用を無効化した。これは、抗 FXa 活性及び TF 誘導性 IIa 産生により測定した。
- Andexanet は TFPI を除き、主要な血漿中凝固関連タンパクとは顕著な相互作用は示さなかった。Andexanet-TFPI 間相互作用は、*in vitro* で非 TF 誘導性 IIa 産生に影響を及ぼさない。しかし、andexanet の TFPI への結合は、TFPI 活性に感受性を示す TF 誘導性 IIa 産生パラメータ（IIa ピーク値など）に影響し、FXa 阻害剤の存在下で IIa 産生の回復を促進する。
- Andexanet は、各 FXa 阻害剤の非 TF 誘導性 IIa 産生アッセイ（TFPI の影響がない条件）及び TF 誘導性 IIa 産生アッセイ（TFPI の影響がある条件）のいずれにおいても完全な無効化作用を示した。

動物を用いた *in vivo* 薬理試験では、以下のことが示されている。

- Andexanet の投与により、抗 FXa 活性は急速かつ用量依存的に低下する。
- 臨床での緊急（救急）手術又は外傷による大出血の状態を反映するため、組織創傷前（予防的モデル）又は後（治療的モデル）のいずれかの条件で andexanet を抗凝固状態下の動物に投与したところ、用量依存的に出血量が減少した。
- 数種の出血動物モデル（ラット、ウサギ、ブタなど）において、ボーラス単独投与レジメンで十分な期間の止血回復が認められたことから、臨床では、追加での持続静脈内投与によって生命を脅かす出血に対して安全域が得られる可能性が示された。

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

- Andexanet 投与後の出血量の減少は、特定の阻害剤及び動物種に用いた PD マーカーにかかわらず、すべての場合において抗 FXa 活性、INR、PT 及び aPTT などの抗凝固作用の PD マーカーの無効化と相関していた。
- Andexanet は、使用した抗凝固剤及び動物モデルの PK 特性によって決定される出血量の回復に必要な andexanet のモル濃度により、モル比 1.3:1 以上（andexanet : 直接作用型 FXa 阻害剤）で直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用を急速かつ完全に低下させる。
- Andexanet は、出血量及び複数の抗凝固マーカーを減少させることにより、ATIII 依存性間接作用型 FXa 阻害剤であるエノキサパリン及びフォンダパリヌクスの抗凝固作用を無効化することから、抗 FXa 活性の低下が andexanet の作用の適切な PD 指標であるという一貫した所見が裏付けられる。また、andexanet は未分画ヘパリン及びエノキサパリンの抗 IIa 活性も無効化する。

FVIII 欠損マウス及びラット Wessler 静脈うっ血性血栓症モデルに andexanet を血漿中濃度 3 $\mu\text{mol/L}$ までの用量で単独投与したところ、andexanet は凝固促進及び抗凝固作用を示さない。

- ウサギ出血モデルでは、andexanet を血漿中濃度最大 10 $\mu\text{mol/L}$ までの用量及び EGR-Xa との併用投与で投与したとき、凝固促進作用がみられないことが確認された。
- Andexanet は抗凝固剤に結合して捕捉することにより、非結合型濃度及び抗 FXa 活性を低下させて抗凝固作用を無効化し、出血量を減少させるが、PCC 及び rFVIIa はこれらの評価項目に影響を及ぼさないことが示された。

Andexanet の PK を、Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルでは直接作用型 FXa 阻害剤の併用及び非在下で、またアカゲザルを用いた単一用量単回投与試験で検討した。PK は両動物種で類似しており、予測可能かつ良好な血漿中濃度推移を示した。曝露量はラット及びサルで検討した用量範囲で用量比例的であった。 V_{ss} は比較的小さく、血液容積と細胞間液（間質液）容積の総和にほぼ等しかった。分布相の消失半減期は約 20～30 分であり、終末相の消失半減期は動物種によりばらつきがあるものの、1.93～12.7 時間であった。しかし、初期の分布相で濃度が減少し、分布相薬剤の 99%以上が消失することが示唆される。

Andexanet の PK の推移は良好であるが、andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤の PK に大きな影響を及ぼした。Andexanet 静脈内投与により、andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤と高い親和性で結合し、血液中の非結合型濃度が減少した。この非結合型濃度の減少により、血液外コンパートメントから直接作用型 FXa 阻害剤が血液中に再分布する。その結果として、血液中 FXa 阻害剤の非結合型濃度が減少し、総濃度が上昇する。FXa 阻害剤の非結合型濃度は抗凝固作用に直接比例するため、andexanet の望ましい薬理作用である。

Andexanet の GLP 適用非臨床安全性評価には、タンパク質製剤では標準的な評価項目に加え、安全性の懸念を示す可能性のある凝固に特異的に関連するバイオマーカーの測定を含めた。Andexanet を、ラット及びサルを用いた単回及び反復投与毒性試験で評価した。Andexanet 投与は FXa 阻害剤の抗凝固作用を無効化することを目的としているため、サルを用いた GLP 適用試験は andexanet の単独投与及び FXa 阻害剤（アピキサバン、リバーロキサバン、betrixaban 及びエノキサパリン）との併用投与により実施した。いずれの非臨床毒性試験においても安全性の問題は認められなかったことから、生命を脅かす又は制御不能な出血、あるいは緊急手術／処置時など、FXa による抗凝固作用の迅速な無効化を必要とする患者の治療を目的とする andexanet の使用が

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

裏付けられた。以上の試験で、ラット及びサルにおける andexanet の忍容性はいずれでも良好であった。MFD（60 mg/kg/day）での試験では、FXa 阻害剤の存在下又は非存在下のいずれでも重篤な有害所見は認められなかった。

毒性試験では、凝固及び血栓のマーカーに特に注目した。血液凝固バイオマーカーの TAT 及び D ダイマーに一過性の上昇が認められたが、関連する血栓形成作用は認められなかった。臨床試験と同様、TAT 及び D ダイマーの増加は、FXa 阻害剤の存在下では andexanet を単独投与した場合ほど顕著ではなかった（NC-11-0394-R0004 及び NC-16-0757）。

ラット及びサルの試験における最高用量投与時の C_{max} は、予定最高臨床用量での C_{max} よりも約 3 倍高かった。サルにおける最高用量投与時の曝露量（ $AUC_{0-\infty}$ ）は、ヒトにおける予定最高用量で認められる曝露量の約 2 倍であった（Table 8）。

Table 8: ラット、サル及びヒトにおける最高用量投与時の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ の比較

Species	Dose	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng*hr/mL)
Rat*	60 mg/kg/day	407,170	287,762
Monkey **	60 mg/kg/day	484,444	739,611
Human ***	800 mg bolus + 2 hour follow on infusion at 8 mg/min	161,000	429,000

* Mean value on Day 1 from NC-11-0397

** Mean value on Day 1 from NC-11-0394

*** Mean value from 12-502, Module 2.

科学的な重要度に基づく評価により、直接作用型 FXa 阻害剤（アピキサバン、リバーロキサバン及びエドキサバン）又は間接作用型 FXa 阻害剤（エノキサパリン）の投与を受けた患者における抗凝固作用の速やかな無効化を目的とした andexanet の使用が裏付けられる。

要約すると、andexanet の非臨床試験では、

- 作用機序が確認された
- 直接作用型 FXa 阻害剤及び ATIII 依存性 FXa 阻害剤のいずれについても、一貫してバイオマーカーへの作用を指標とした抗 FXa 活性が示された
- 多数の出血モデルで有効性が示された
- 個々の FXa 阻害剤の作用に関する化学量論的要件を含む PK-PD 特性が定義され、臨床結果と一致した
- Andexanet 自身は *In vitro* で凝固促進又は凝固阻害作用を有さないことが示された
- 毒性試験において、投与可能な最大用量に基づいて設定された MFD での忍容性は良好であった

6 参考文献

- 1) Chamanza, R., H. A. Marxfeld, A. I. Blanco, S. W. Naylor and A. E. Bradley (2010). "Incidences and range of spontaneous findings in control cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) used in toxicity studies." *Toxicol Pathol* 38(4): 642-657.
- 2) Furugohri, T., Isobe K, Honda Y, Kamisato-Matsumoto C, Sugiyama N, Nagahara T, Morishima Y, Shibano T. (2008). "DU-176b, a potent and orally active factor Xa inhibitor: in vitro and in vivo pharmacological profiles." *J Thromb Haemost.* 6(9): 1542-1549.
- 3) Grottke, O., N. Akman, T. Braunschweig, P. B. Conley and R. Rossaint (2018). "Reversal of Apixaban Anticoagulation with Reduced Doses of Andexanet Alfa in a Porcine Polytrauma Model. *Blood* 2018; 132 (Supplement 1): 2456. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-114426>."
- 4) Grottke, O., T. Braunschweig, R. Rossaint, N. Akman, J. M. Leeds, P. B. Conley and M. Honickel (2019). "Transient or extended reversal of apixaban anticoagulation by andexanet alfa is equally effective in a porcine polytrauma model." *Br J Anaesth* 123(2): 186-195.
- 5) Hayes, A. W. (5th Edition, 2007). *Principals and Methods of Toxicology*, CRC Press,: 1,270.
- 6) Kast, A. (1994). "Pulmonary hair embolism in monkeys." *Exp Toxicol Pathol* 46(3): 183-188.
- 7) Kingham, R., G. Klasa and K. H. Carver (2014). Chapter 4: Key Regulatory Guidelines for the Development of Biologics in the United States and Europe *Biological Drug Products: Development and Strategies*. W. Wang, Singh, M. 1st Edition. : 75-109.
- 8) Lu, G., F. R. DeGuzman, S. J. Hollenbach, M. J. Karbarz, K. Abe, G. Lee, P. Luan, A. Hutchaleelaha, M. Inagaki, P. B. Conley, D. R. Phillips and U. Sinha (2013). "A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa." *Nature Medicine* 19: 446-451.
- 9) Lu, G., P. Pine, J. M. Leeds, F. DeGuzman, P. Pratikhya, J. Lin, J. Malinowski, S. J. Hollenbach, J. T. Curnutte and P. B. Conley (2018). "Andexanet alfa effectively reverses edoxaban anticoagulation effects and associated bleeding in a rabbit acute hemorrhage model." *PLoS One* 13(3): e0195122.
- 10) Perzborn, E., Strassburger J, Wilmen A, Pohlmann J et al. (2005). "In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor." *J Thromb Haemost* 3: 514–521.
- 11) Pinto, D. J., et al., (2007). "Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H -pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), a highly potent, selective, efficacious, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa." *J Med Chem* 50(22): 5339-5356.
- 12) Ruff, C. T., R. P. Giugliano, E. Braunwald, E. B. Hoffman, N. Deenadayalu, M. D. Ezekowitz, A. J. Camm, J. I. Weitz, B. S. Lewis, A. Parkhomenko, T. Yamashita and E. M. Antman (2014). "Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials." *Lancet* 383: 955-962.
- 13) Sato, J., T. Doi, T. Kanno, Y. Wako, M. Tsuchitani and I. Narama (2012). "Histopathology of incidental findings in cynomolgus monkeys (*macaca fascicularis*) used in toxicity studies." *J Toxicol Pathol* 25(1): 63-101.
- 14) Zhang, P., W. Huang, L. Wang, L. Bao, Z. J. Jia, S. M. Bauer, E. A. Goldman, G. D. Probst, Y. Song, T. Su, J. Fan, Y. Wu, W. Li, J. Woolfrey, U. Sinha, P. W. Wong, S. T. Edwards, A. E. Arfsten, L. A.

2.4 非臨床試験の概括評価

アンデキサネット アルファ (遺伝子組換え)

- Clizbe, J. Kanter, A. Pandey, G. Park, A. Hutchaleelaha, J. L. Lambing, S. J. Hollenbach, R. M. Scarborough and B. Y. Zhu (2009). "Discovery of betrixaban (PRT054021), N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-(N,N-dimethylcarbamimidoyl)benzamido)-5-methoxybenzamide, a highly potent, selective, and orally efficacious factor Xa inhibitor." *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 19(8): 2179-2185.
- 15) Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993 Jul;10(7): 1093-5.