

TABLE OF CONTENTS

2.6.1	諸言	2
1	参考文献	3

LIST OF FIGURES

Figure 1:	ヒト FX 及び andexanet の構造	2
-----------	------------------------------	---

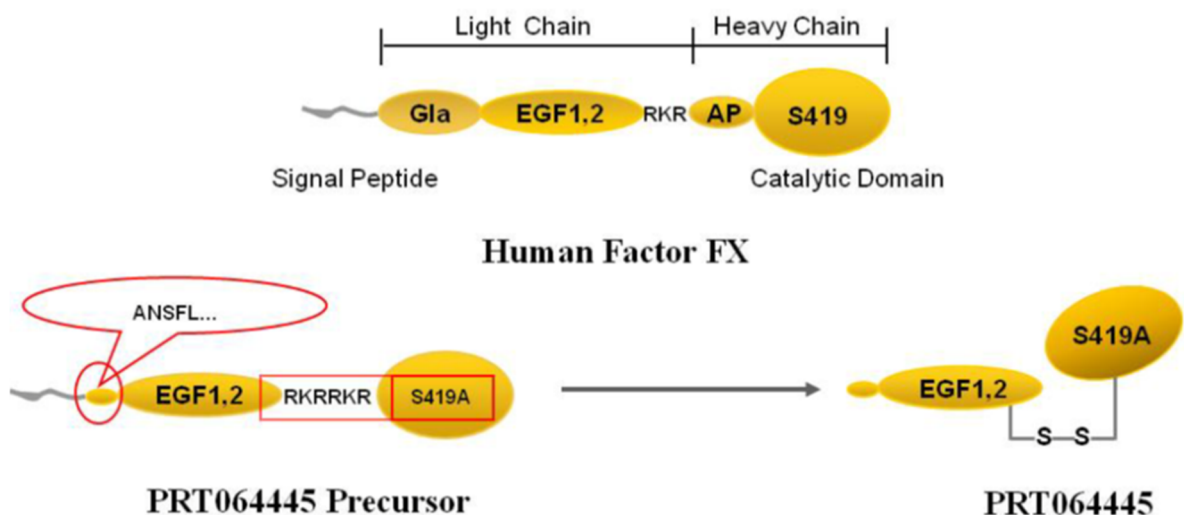
2.6.1 諸言

Andexanet alfa（以下、andexanet）は分子量約 41 kDa の遺伝子組換え改変型ヒト活性化血液凝固第 X 因子（FXa）タンパク質であり、直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤による抗凝固作用を迅速に無効化する薬剤として開発された。

経口直接作用型 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 拮抗薬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。また、フォンダパリヌクスやエノキサパリンなどの低分子ヘパリンの非経口アンチトロンビン III（ATIII）依存性間接作用型 FXa 阻害剤は長年広く使用されている。これら直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤は、臨床的有用性に疑いの余地はないものの、いずれも出血イベントと関連しており、その一部は生命を脅かす又は致死性である。この出血イベントを阻止できる有効な解毒剤が緊急に必要とされているにもかかわらず、現時点ではそのような薬剤は存在しない。

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させることはできず、天然型 FXa が持つ凝固促進活性はない。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）ドメインを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、抗凝固活性がない（Figure 1）。Andexanet はチャイニーズハムスター卵巣細胞に直接発現させることで得られる機能的なタンパク質であるため、天然型血液凝固第 X 因子（FX）を活性化型である FXa に変換するために必要な in vitro 及び in vivo 活性化過程は不要である。

Figure 1: ヒト FX 及び andexanet の構造



Andexanet は in vitro 及び in vivo の非臨床試験で評価されている。Andexanet の作用機序を確認するため、以下に示す in vitro 薬理試験を実施した。

- 直接作用型及び間接作用型阻害剤に対する結合能
- 抗 FXa 活性測定による抗凝固作用の無効化
- トロンビン産生の回復
- 凝固促進活性及び抗凝固活性

2.6.1 緒言

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

出血モデル動物（げっ歯類尾切断及びウサギ肝臓損傷）では、**andexanet** は抗 FXa 活性を指標とした抗凝固作用を無効化し、凝固マーカーを指標とした止血能を回復させた。これらの指標は出血量減少に相関した。

Andexanet は FXa 阻害剤の中和剤としてデザインされているため、**andexanet** 単独投与及び直接作用型 FXa 阻害剤との併用投与による薬物動態（PK）及び毒性試験プログラムを実施した。これらの試験により、抗凝固作用の効果的な無効化及び止血能の回復に必要な適切な用量の PK モデリングが可能となった。

Andexanet の非臨床毒性試験プログラムは、ヒトへの単回静脈内投与時の安全性を裏付けるために実施した。**Andexanet** の毒性をラット及びサルで評価した（[モジュール 2.6.6](#)）。14 日間反復投与試験では、投与可能な最大用量（MFD）である 60 mg/kg/day までの **andexanet** を、曝露量を最大にするため約 4 時間間隔で 1 日 2 回投与した。

Andexanet の免疫原性（ICH ガイドライン S6 に準拠）並びに凝固促進及び抗凝固作用を評価した。

Andexanet の 2 週間を超える反復投与毒性試験は実施していない。また、以下に基づき生殖発生毒性試験も実施していない。1) **Andexanet** 及び FX は胎盤関門を通過せず、生殖生理に影響を及ぼす可能性は低い。2) **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。3) **Andexanet** の半減期は短い（消失半減期は 4～5 時間）。

Andexanet のがん原性試験は実施されていない。FXa の作用機序に関与する血液凝固カスケードに関する利用可能なデータ及び文献情報に基づき、**andexanet** のがん原性リスク評価を実施している。以下のことから、**andexanet** の発がんリスクは低いと考えられるため、がん原性の非臨床試験の実施は不要と考えられる [ICH ガイドライン S1A、S1C 及び S6 (R1)]。1) **Andexanet** は、FXa 阻害剤の投与を受けている患者に生じる可能性のある制御不能な出血を止める単回投与治療薬として使用する予定である。したがって、**andexanet** の曝露量は、**andexanet** の由来分子である FXa の内因性濃度よりはるかに高い濃度であるが、1 回の投与により得られる。また、この分子はヒト FXa と類似するが同一ではないタンパク質製剤である。2) FXa 由来のタンパク質製剤は DNA 反応性分子ではなく、細胞増殖を変化させるエピジェネティックな作用はないと予想される¹⁾。3) FXa と構造が類似しており、薬理作用も FXa と同様であると予測されることから、**andexanet** が免疫調節又は免疫抑制作用を有する可能性は低く、免疫調節作用を有する生物由来製品で認められているような発がんリスク増加をもたらす可能性は低い^{1),2)}。4) **Andexanet** の安全性評価には、タンパク質製剤では標準的な評価に加え、潜在的な毒性を明らかにする血液凝固バイオマーカーの追加測定を含めた。標準的な毒性評価項目及び血液凝固バイオマーカーのいずれにおいても、**andexanet** が患者の発がんリスクを増加させることを示す所見はみられなかった。

1 参考文献

- 1) Hayes, A.W., *Principals and Methods of Toxicology*. 5th Edition, 2007, CRC Press,. p. 1,270.
- 2) Kingham, R., G. Klasa, and K.H. Carver, *Chapter 4: Key Regulatory Guidelines for the Development of Biologics in the United States and Europe, in Biological Drug Products: Development and Strategies.*, W. Wang, Singh, M., Editor. 2014. p. 75-109.

TABLE OF CONTENTS

略号一覧表.....	5
2.6.2 薬理試験の概要文.....	7
1 まとめ.....	7
2 効力を裏付ける試験.....	9
2.1 <i>In vitro</i> 試験.....	9
2.1.1 Andexanet の各種 FXa 阻害剤との結合性.....	9
2.1.2 ヒト血漿中での FXa 阻害剤による抗 FXa 活性の無効化.....	10
2.1.3 ヒト血漿中での IIa 産生の回復.....	11
2.1.4 <i>In vitro</i> 試験の要約.....	14
2.2 <i>In vivo</i> 試験.....	15
2.2.1 直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用に対する andexanet の無効化作用.....	15
2.3 Andexanet と非特異的中和剤との比較.....	30
3 副次的薬理試験.....	42
3.1 <i>In vitro</i> 試験.....	42
3.1.1 Andexanet の ATIII 依存性阻害剤との結合性.....	42
3.1.2 ヒト血漿中での ATIII 依存性阻害剤による抗 FXa 活性の無効化.....	44
3.1.3 ヒト血漿中での IIa 産生の回復.....	45
3.1.4 Andexanet と他の主要な血漿中凝固関連タンパクとの相互作用.....	50
3.1.5 FXa 阻害剤の存在下及び非存在下における andexanet と TFPI の相互作用.....	51
3.1.6 Andexanet の凝固促進及び抗凝固作用.....	57
3.1.7 <i>In vitro</i> 試験の要約.....	61
3.2 <i>In vivo</i> 試験.....	62
3.2.1 間接作用型 FXa 阻害剤を投与した抗凝固状態下のラットにおける andexanet の作用.....	62
4 安全性薬理試験.....	76
4.1 <i>In vivo</i> 安全性薬理試験.....	76
4.1.1 Andexanet の呼吸器系及び中枢神経系に関する安全性薬理試験 (NC-11-0395-R0001 及び NC-11-0396-R0001).....	76
4.1.2 中枢神経系に関する安全性薬理.....	76
4.1.3 心血管系に関する安全性薬理 (NC-11-0394-R0001).....	76
5 薬力学的薬物相互作用試験.....	77
6 考察及び結論.....	78
7 参考文献.....	79

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)	10
Table 2:	ウサギにおけるリバーロキサバンによる抗凝固作用の有無別の血漿中 andexanet の平均濃度.....	38
Table 3:	主要な血漿中凝固関連タンパクに対する andexanet の結合親和性 (K_d 値) (Biacore*)	51
Table 4:	速度論的解析により決定した TFPI の FXa 及び andexanet に対する結合親和性	52
Table 5:	抗 FXa 活性アッセイ及び CAT アッセイに用いたリバーロキサバン及び andexanet の血漿中濃度.....	55
Table 6:	エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のラットに尾切断前に andexanet を 投与したときの薬力学マーカー及び出血量.....	63
Table 7:	エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のラットで尾切断後に andexanet を 投与したときの薬力学マーカー及び出血量.....	67
Table 8:	エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のウサギにおいて肝臓創傷前に andexanet を投与したときの薬力学マーカー及び出血量.....	69

LIST OF FIGURES

Figure 1:	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.....	10
Figure 2:	ヒト血漿中での直接作用型の抗 FXa 活性の andexanet による無効化.....	11
Figure 3:	ヒト血漿中における直接作用型 FXa 阻害剤（リバーロキサバン、アピキサバ ン及び betrixaban）による IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化	13
Figure 4:	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 TF-CAT IIa 産生阻 害の andexanet による用量依存的無効化.....	14
Figure 5:	リバーロキサバン及びアスピリンを投与した抗凝固状態下のマウスにおける andexanet 投与による出血量及び INR の減少.....	16
Figure 6:	Andexanet の直接作用型 FXa 阻害剤誘導 INR 増加に対する抑制.....	17
Figure 7:	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.....	18
Figure 8:	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.....	19
Figure 9:	リバーロキサバン投与による PT 及び aPTT 延長に対する andexanet 投与によ る無効化.....	20
Figure 10:	Andexanet 投与による血漿中非結合型リバーロキサバン濃度の減少及び総リ バーロキサバン濃度の増加.....	21
Figure 11:	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	22

Figure 12:	Andexanet 投与による血漿中非結合型エドキサバン濃度の減少及びエドキサバン総濃度の増加.....	23
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抗 FXa 活性の andexanet 投与による無効化.....	24
Figure 14:	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と抗 FXa 活性又は非結合型エドキサバン濃度との相関性.....	25
Figure 15:	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肝臓創傷時出血量の andexanet による減少.....	26
Figure 16:	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.....	27
Figure 17:	ウサギ肝臓創傷治療モデルにおける andexanet 投与による血漿中総リバーロキサバン濃度の増加.....	28
Figure 18:	ウサギ肝臓創傷治療モデルにおける抗 FXa 活性と andexanet/リバーロキサバンのモル比.....	28
Figure 19:	ウサギモデルにおける andexanet の予防的投与による用量依存的な出血量の減少.....	31
Figure 20:	ウサギ肝臓創傷モデルにおける 4F-PCC の投与による出血量減少のわずかな影響.....	32
Figure 21:	抗凝固状態にあるウサギにおける抗 FXa 活性の andexanet 投与による減少.....	33
Figure 22:	Andexanet 及び 4F-PCC を投与したウサギでの出血量と抗 FXa 活性との相関性.....	34
Figure 23:	Andexanet 投与ウサギでの血漿中非結合型リバーロキサバン濃度と抗 FXa 活性の相関.....	35
Figure 24:	Andexanet 投与による血漿中リバーロキサバンの総濃度の増加及び非結合型濃度の減少.....	37
Figure 25:	リバーロキサバン投与による PT 及び aPTT 延長の andexanet 投与による回復	39
Figure 26:	抗凝固状態下のウサギでの andexanet、rFVIIa 及び 3F-PCC による出血量の変化.....	40
Figure 27:	リバーロキサバンにより誘導される抗 FXa 活性に対する andexanet、rFVIIa 及び Bebulin 投与の影響.....	41
Figure 28:	ATIII-フォンダパリヌクスによる FXa 阻害に対する andexanet の影響.....	43
Figure 29:	液相における andexanet による ATIII-ヘパリンの IIa 阻害の無効化.....	44
Figure 30:	ヒト血漿中での間接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 活性の andexanet による無効化.....	45
Figure 31:	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.....	46
Figure 32:	ヒト血漿中における治療用量 (1 µg/mL) 又は治療用量を超える用量 (2 µg/mL) のフォンダパリヌクスの IIa 産生阻害に対する andexanet の影響.....	46
Figure 33:	正常血漿における TF-CAT プロファイルに対する FXa 阻害剤の影響.....	48
Figure 34:	様々な ATIII 依存性 FXa 阻害剤存在下での正常血漿における TF-CAT プロファイルに対する andexanet の影響.....	49

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Figure 35:	様々な ATIII 依存性 FXa 阻害剤存在下での正常血漿における TF-CAT パラメータに対する andexanet の影響.....	50
Figure 36:	Andexanet の TFPI への結合及び TFPI の FXa 阻害活性の用量依存的無効化	52
Figure 37:	Andexanet-TFPI 複合体の FVIIa/TF 複合体活性に及ぼす影響.....	53
Figure 38:	HUVEC を用いた細胞アッセイにおける andexanet-TFPI 間相互作用に対するリバーロキサバンの影響.....	54
Figure 39:	リバーロキサバン単独又はリバーロキサバンと andexanet 共存下での IIa 産生と抗 FXa 活性の相関性.....	56
Figure 40:	Andexanet の触媒活性評価.....	57
Figure 41:	ヒト血漿中での IIa 産生アッセイにおける andexanet 及び FXa-EGR の活性比較.....	58
Figure 42:	精製タンパクを用いた再構成系でのプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化: andexanet (0~12.5 nmol/L).....	59
Figure 43:	精製タンパクを用いた再構成系でのプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化: andexanet (0~5 µmol/L).....	59
Figure 44:	ヒト全血を用いた TF 誘導性 IIa 産生に対する andexanet の影響: F1+2	60
Figure 45:	ヒト全血を用いた TF 誘導性 IIa 産生に対する andexanet の影響: TAT.....	60
Figure 46:	ヒト血小板に対する andexanet の影響: P-セレクチン.....	61
Figure 47:	HUVEC に対する andexanet の影響: 細胞内 Ca^{2+} 濃度.....	61
Figure 48:	ラット尾切断モデルにおける andexanet によるエノキサパリン誘導性出血の抑制.....	65
Figure 49:	エノキサパリンを投与した抗凝固状態下の出血ラットにおける尾切断後に投与した andexanet による用量依存的な抗 FXa 活性の減少.....	66
Figure 50:	ウサギ肝臓創傷モデル試験経過の概略図.....	69
Figure 51:	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肝臓創傷後の andexanet による出血量の減少.....	70
Figure 52:	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 andexanet による抗 FXa 活性の無効化.....	71
Figure 53:	抗 FXa 活性と andexanet 濃度の相関性.....	72
Figure 54:	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 andexanet による aPTT 延長の無効化.....	72
Figure 55:	FVIII 欠損マウスにおける andexanet の出血量に対する影響.....	73
Figure 56:	ラット Wessler 静脈うっ血性血栓症モデルにおける Andexanet の凝固促進作用.....	74
Figure 57:	Andexanet と EGR-Xa 併用時のプロトロンビン時間に及ぼす影響.....	75

2.6.2 薬理試験の概要文

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
CAT	Calibrated Automated Thrombogram	自動校正トロンボグラム
CNS	Central Nervous System	中枢神経系
C _{max}	maximum observed plasma drug concentration	最高血漿中濃度
ECG	Electrocardiogram	心電図
ETP	Endogenous Thrombin Potential	内因性トロンビン産生能
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting	蛍光活性化セルソーティング
FII	Factor II	血液凝固第 II 因子
FV	Factor V	血液凝固第 V 因子
FVII	Factor VII	血液凝固第 VII 因子
FVIIa	Factor VIIa	血液凝固第 VIIa 因子
fVIII	Factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
FX	Factor X	血液凝固第 X 因子
FXa	Factor Xa	血液凝固第 Xa 因子
FIX	Factor IX	血液凝固第 IX 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に関する省令
H	Heparin	ヘパリン
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	ヒト臍帯静脈内皮細胞
INR	International Normalised Ratio	国際標準化比
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
LMWH	Low Molecular Weight Heparin	低分子ヘパリン
NZW	New Zealand White	ニュージーランドホワイト種
PBS	Phosphate-Buffered Saline	リン酸緩衝生理食塩水
PCC	Prothrombin Complex Concentrates	プロトロンビン複合体濃縮製剤
PD	Pharmacodynamics	薬力学
PPP	Platelet Poor Plasma	ヒト乏血小板血漿
PT	Prothrombin Time	プロトロンビン時間
rfVIIa	Recombinant Factor VIIa	遺伝子組換え型血液凝固第 VIIa 因子
RFU	Relative Fluorescence Unit	相対蛍光単位

2.6.2 薬理試験の概要文

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
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
VelIndex	Velocity Index	—

2.6.2 薬理試験の概要文

1 まとめ

Andexanet alfa（以下、andexanet）は、直接作用型又は間接作用型の活性化血液凝固第 X 因子（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。FXa 阻害剤は望ましくない血栓形成の発現率を低下させる一方、臨床的に重大な生命を脅かす出血のリスクを増加させる可能性がある。Andexanet（分子量約 41 kDa）は、遺伝子組換え改変型ヒト FXa タンパク質であり、高い親和性で直接作用型及びアンチトロンビン III（ATIII）依存性間接作用型阻害剤の両方に結合するが、内在性 FXa が持つ凝固活性は有しない。

Andexanet による直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用の無効化について、*in vitro* 試験並びにマウス、ラット、ウサギ及びブタを用いた *in vivo* 試験で評価を行った。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の andexanet による減少を実証する予防的ウサギ肝臓創傷モデル、3) 抗 FXa 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）投与に関する情報が含まれている。

In vitro 試験では、andexanet の FXa 阻害剤に対する結合親和性及び無効化作用が確認されており、*in vivo* 試験では、andexanet が抗 FXa 活性を速やかに無効化し、抗凝固作用を反映する他の薬力学（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のある妥当な指標であることが示されており、抗 FXa 活性の無効化はこれらのモデルで認められる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 は凝固促進及び抗凝固作用を示すことなく、FXa 阻害剤の抗凝固作用を無効化し、動物モデルでの出血量を減少させ、止血を回復させることが示されている。

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、アピキサバン又は betrixaban（未承認薬）投与後に認められる国際標準化比（INR）の増加を減少させ、andexanet による抗凝固作用無効化の可能性が確認された。ラットを用いたその後の試験では、速やかかつ持続的で用量依存的な INR の減少が、直接作用型 FXa 阻害剤の非結合型（遊離型）濃度の減少、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と推察される抗凝固剤の血漿中総濃度の増加と相関していることが示された。

Andexanet の出血に対する作用は、げっ歯類の尾切断モデル及び改変ウサギ肝臓創傷モデルを用いて検討された。これらの試験では、臨床での緊急外科手術又は外傷による大出血の状態を反映するため、組織損傷の前（リバーロキサバン又はエドキサバンを投与した抗凝固状態下の動物を用いた予防的モデル）又は後（リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下の動物を用いた治療的モデル）のいずれかの条件で、andexanet を投与した。Andexanet 投与後の出血量減少は、FXa 阻害剤の種類や用いた動物モデルに依存するが、抗凝固作用の PD マーカーである抗 FXa 活性、INR、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）の減少又は短縮と相関していた。総じて、これらのモデルにおいて、andexanet は、直接作用型 FXa 阻害剤に対する andexanet のモル比が 1.2 以上である場合、速やかかつ完全に FXa 阻害剤の抗凝固作用（PD マーカー及び出血量で定義）を減少させた。

さらに、アピキサバン投与のブタ多発性外傷治療モデルにおいて、andexanet はボーラス投与単独で出血量減少に有効であり、ボーラス投与後に 2 時間の持続静脈内投与を行った場合には生存

2.6.2 薬理試験の概要文 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

率も上昇させた。これによって、抗凝固作用の一時的無効化が、正常な止血機構の回復及び出血の大幅な減少に十分であることが示唆された¹²⁾。アピキサバン投与により抗凝固状態にした同一のブタ多発性外傷モデルを用い、低用量（抗 FXa 活性の無効化が約 75%~80%）での影響についてもさらに探索した¹³⁾。Andexanet 投与動物で観察された出血量は、非投与動物と比較して有意に少なく、非抗凝固状態下の動物のレベルに近く、すべての動物が処置後も生存した。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、活動性出血の効果的な止血には、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。

さらに *in vivo* 試験で、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が明らかになった。Andexanet は、間接作用型 FXa 阻害剤を投与した抗凝固状態下のラット又はウサギに投与したとき、出血量を減少させ、抗 FXa 活性及び抗凝固作用の複数の PD マーカーを用量依存的に無効化したことから、抗 FXa 活性の減少は andexanet の作用の適切な薬力学的指標であることが裏付けられた。本モデルで正常な止血状態の回復に必要な andexanet の濃度をさらに解析したところ、andexanet 濃度は ATIII の生体内濃度（ラットでは 3.5 $\mu\text{mol/L}$ ¹⁴⁾）と同程度以下であることが示唆された。

血液凝固第 VIII 因子欠損マウス及びラット Wessler 静脈うっ血性血栓症モデルにおいて、andexanet の単独投与では 3 $\mu\text{mol/L}$ までの血漿中濃度域で凝固促進及び抗凝固作用を示さなかった。凝固促進作用を有しないことは、ラット及びウサギの出血モデルにおいて andexanet 濃度が 10 $\mu\text{mol/L}$ まで上昇した際にも確認した。Andexanet は、単独でウサギに、又は直接作用型 FXa 若しくは IIa 阻害剤を投与した抗凝固状態下のウサギに投与した。Andexanet の FXa 阻害剤に対する選択性は、直接作用型 IIa 阻害剤である bivalirudin（未承認薬）を投与した抗凝固状態下のウサギにおいて観察され、凝固マーカー及び出血量は無効化されなかった。さらに、andexanet と EGR-FXa（プロトロンビナーゼ複合体の内在性 FXa 活性部位をトリペプチジル阻害剤である Glu-Gly-Arg クロロメチルケトンに置換した失活ヒト FXa）との併用で、EGR-FXa の抗凝固作用は亢進しなかった。

ウサギ肝臓創傷モデルを用いた、andexanet と遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子製剤（rFVIIa、ノボセブン®）、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）及び 4 因子含有プロトロンビン複合体濃縮製剤（4F-PCC、ケイセントラ®）などの FXa 阻害剤の非特異的中和剤との比較では、andexanet のみが本モデルでの出血量、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た。

雄性ラットを用いた andexanet の中枢神経系（CNS）及び呼吸器系の安全性薬理試験では、単回静脈内投与で投与可能な最大用量（MFD）と考えられる最高用量（30 mg/kg）まで評価した。いずれの試験でも有害な影響は認められなかった。さらに、カニクイザルを用いた 14 日間反復静脈内投与試験の一環として、andexanet の心血管系に対する安全性評価を実施した。その結果、心電図（ECG）パラメータや血圧への影響は認められなかった。

以下、これらの情報を 2. 効力を裏付ける試験、3. 副次的薬理試験、4. 安全性薬理試験に分け、記述する。なお、3. 副次的薬理試験には期待した治療標的に関連しない作用等を検討した試験を記述する。

2 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 試験

In vitro 試験では以下の結果が示された。

- 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）に高い結合親和性を示した。
- Andexanet は、精製タンパクを用いた液相評価系においても、ヒト血漿においても、抗 FXa 活性及び TF 誘導性 IIa 産生により測定した FXa 阻害剤の抗凝固作用を用量依存的に無効化した。

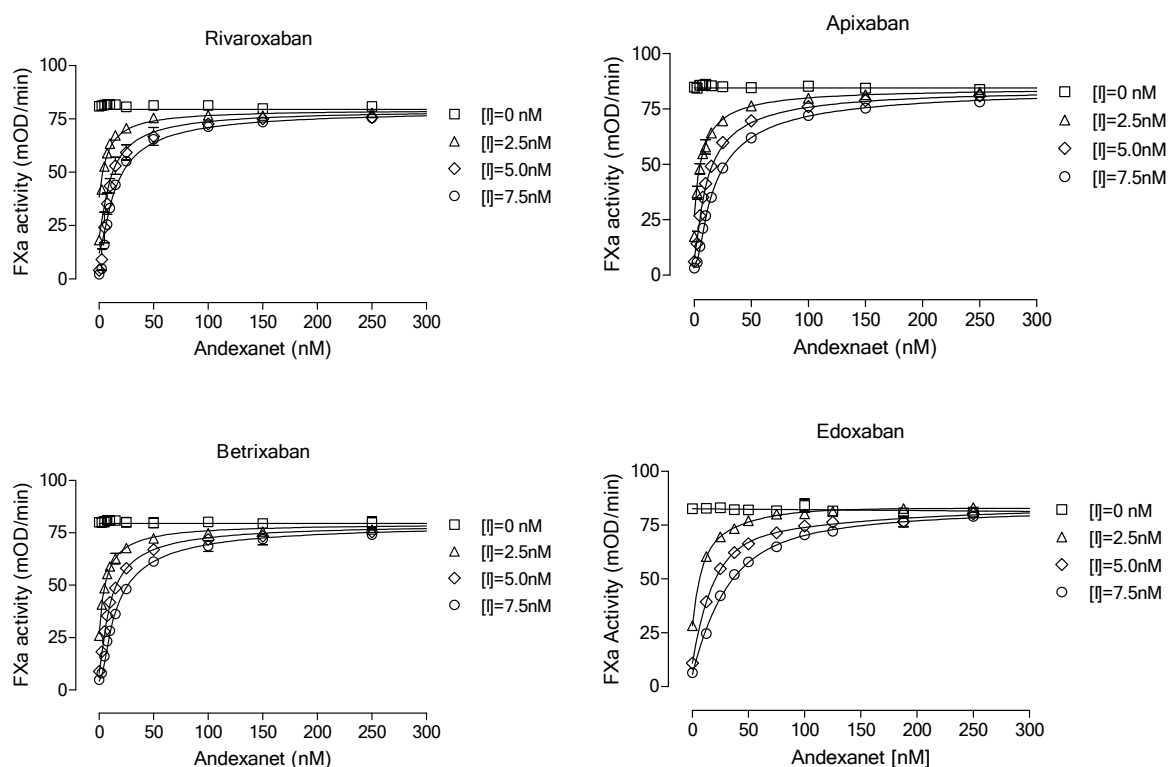
2.1.1 Andexanet の各種 FXa 阻害剤との結合性

Andexanet と直接作用型 FXa 阻害剤との相互作用

Andexanet (0~250 nmol/L) の FXa 阻害剤に対する結合能及び無効化作用は、精製ヒト FXa (3.0 nmol/L) 及び FXa ペプチジル基質である Spectrozyme-FXa (CH₃O-CO-D-CHG-Gly-Arg-pNA.AcOH、100 µmol/L) を用いた液相試験系 (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 5mmol/L Ca²⁺) において、リバーロキサバン、アピキサバン、betrixaban 及びエドキサバン (0~7.5 nmol/L) を用いた一連の *in vitro* 試験系 (N=2~3) で評価した。

Andexanet はリバーロキサバン、アピキサバン、betrixaban 及びエドキサバンによる FXa 阻害を用量依存的かつ完全に (阻害剤を含まない対照との比較) 無効化した (NC-12-0435-R0001 及び NC-13-0565-R0001) (Figure 1)。これらの速度論的プロファイルの解析から、それぞれの FXa 阻害剤に対する andexanet の結合親和性 (K_d 値) は 0.5~1.5 nmol/L の範囲であった (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 (K_d=1.53 nmol/L) 及びアピキサバン (K_d=0.58 nmol/L) と同程度であった。

Figure 1: 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; mOD = Milli-optical density; K_d = Binding constant; K_i = Inhibition constant.

Legend: 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 μM). 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 ²⁾)	3.83
Apixaban	0.58	0.100 (reported ³⁾)	5.80
Betrixaban	0.53	0.117 (reported ⁴⁾)	4.53
Edoxaban	0.95	0.122 (measured) *	7.79

AnXa = Andexanet; FXa = Factor Xa; K_d = Binding constant; K_i = Inhibition constant.

* The reported apparent K_i of 0.561 nM for edoxaban was measured in the presence of 0.7 nM human fXa ⁵⁾. After accounting for consumption of the inhibitor by fXa due to tight binding, edoxaban would have an estimated intrinsic K_i ≤ 0.211 nM, comparable to what was measured.

2.1.2 ヒト血漿中での FXa 阻害剤による抗 FXa 活性の無効化

FXa 阻害剤による抗凝固作用は、凝固酵素である FXa への結合及び不活化に依存する。したがって、この結合阻害は十分に確立された抗 FXa 活性評価アッセイにより測定することができる。

抗 FXa 活性は、ヒト血漿を用い、andexanet の作用を測定する上で試料希釈の影響を最小化す

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

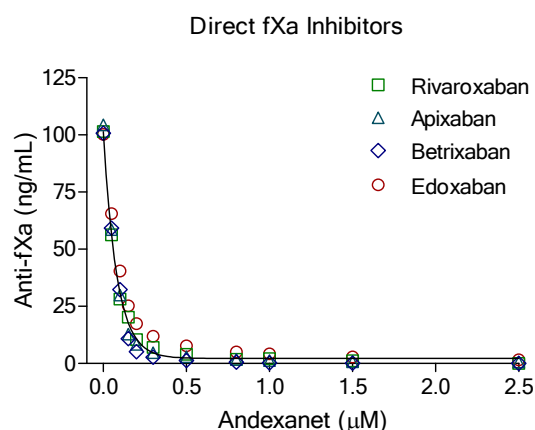
るために最適化された改変型抗 FXa 活性評価系（20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA）で測定した（NC-12-0468-R0001）⁶⁾。本アッセイでは、市販の低分子ヘパリンアッセイキット（XXXXXXXXXX、XXXXXXXXXX 社）の試薬及び FXa の発色基質（S2732）を用いて血漿中の残存 FXa（ウシ FXa）活性を測定した。検量線は、阻害剤の既知濃度を用いて、阻害剤ごとに作製した。

ヒト血漿を用いた改変型抗 FXa 活性発色アッセイ（N=2～6）において、andexanet（0～2.5 $\mu\text{mol/L}$ ）は用量依存的かつ完全に直接作用型 FXa 阻害剤 [100 ng/mL：リバーロキサバン（229 nmol/L）、アピキサバン（218 nmol/L）、betrixaban（221 nmol/L）及びエドキサバン（182 nmol/L）] の抗 FXa 活性を無効化した（NC-12-0436-R0001 及び NC-13-0565-R0001）（Figure 2）。

これらのデータは、広範な直接作用型経口 FXa 阻害剤の無効化において、andexanet が汎用的な FXa 阻害剤の中和剤となり得ることを示している。

Figure 2: ヒト血漿中での直接作用型の抗 FXa 活性の andexanet による無効化

Direct FXa inhibitors



FXa = Factor Xa; IU = International unit

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

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.

2.1.3 ヒト血漿中での IIa 産生の回復

FXa の下流の IIa 形成を TF 誘導性の IIa 産生を指標に評価した。プロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化により産生された IIa は、フィブリン形成につながる凝固経路の最後に位置するプロテアーゼである。したがって、IIa 産生は、FXa 阻害から遠位に位置し、抗凝固作用及び止血能回復の両方を測るための生理的に適切な指標である。FXa 阻害剤により誘導される IIa 産生阻害の無効化の評価には、社内アッセイに基づく方法と自動校正トロンボグラム（CAT）を用いた方法の 2 種類の IIa 産生アッセイを用いた。

社内 IIa 産生アッセイは、クエン酸含有ヒト血漿（75 μL ）、IIa の蛍光基質である Z-Gly-Gly-Arg-7-アミノ-4-メチルクマリン（Z-GGR-AMC、100 $\mu\text{mol/L}$ ）及び CaCl_2 （15 mmol/L）の混合液並びに TF（0.1 nmol/L、Innovin）を含む反応混合液（総量 100 μL ）を用いて実施した。相対蛍光単位（RFU）の変化を、37°C で 20 分間継続的にモニターした。計算には、10 分間反応後の RFU 値を用いた。

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

CAT アッセイは、5 pmol/L の TF を添加した PPP 試薬を用い、製造業者の推奨（XXXXXXXXXX社）に従いフォーマットした。IIa 産生阻害の無効化は、内因性 IIa 産生能（ETP）及び他のパラメータにより評価した。

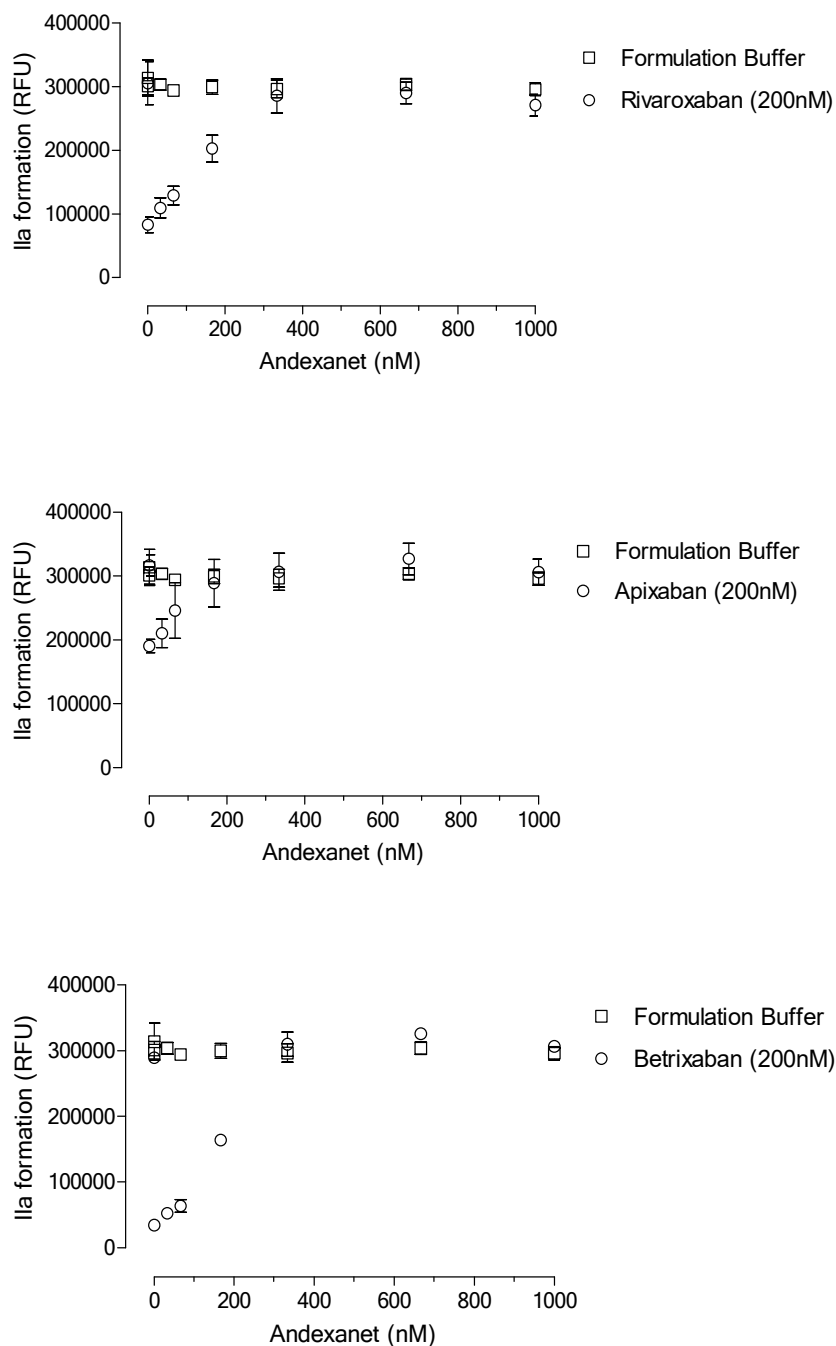
ヒト血漿を用いた社内 IIa 産生アッセイにおいて、andexanet（0～1.0 μmol/L）は、直接作用型 FXa 阻害剤であるリバーロキサバン（N=4）、アピキサバン（N=2）及び betrixaban（N=2）（いずれも 200 nmol/L）による IIa 産生阻害を、用量依存的かつ完全に（溶媒対照との比較）無効化した。andexanet 単独での作用は、阻害剤の非存在下では限定的であった（NC-12-0452-R0001）（Figure 3）。

CAT アッセイを用いた別試験では、CAT パラメータによる定量解析結果から、andexanet（0～3.0 μmol/L）はエドキサバン（0～1.0 μmol/L）のヒト血漿中での IIa 産生阻害を用量依存的かつ完全に無効化した（NC-13-0565-R0001）（Figure 4）。

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Figure 3: ヒト血漿中における直接作用型 FXa 阻害剤（リバーロキサバン、アピキサバン及び betrixaban）による IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化

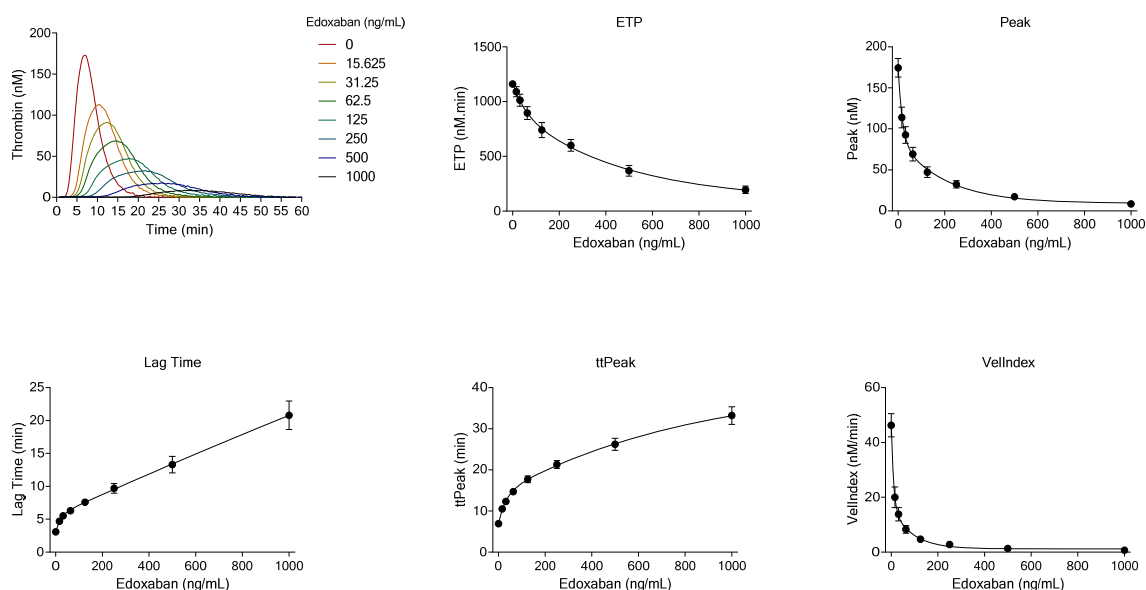


FXa = Factor Xa; RFU = Relative fluorescence unit

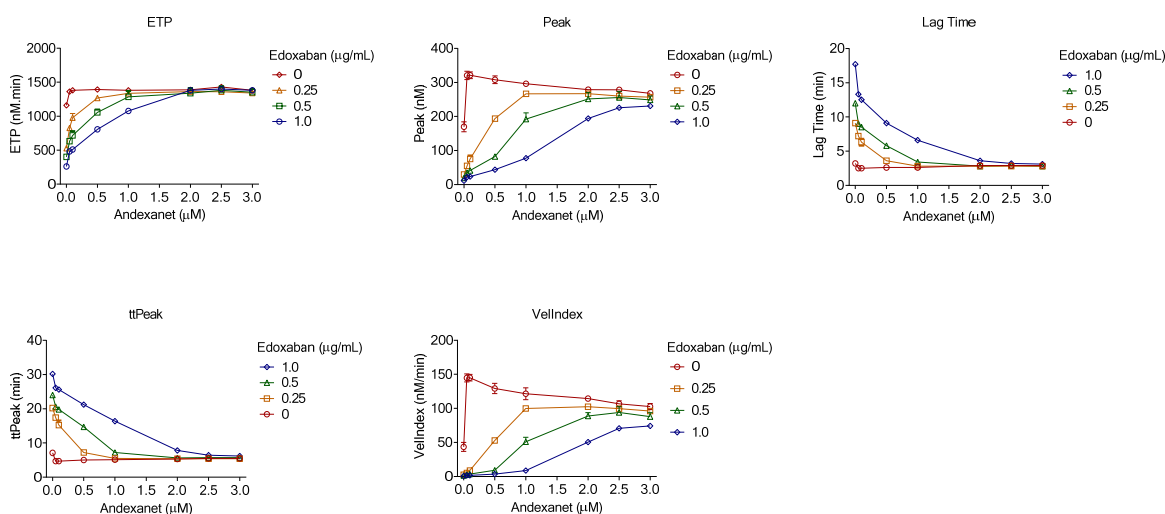
Legend: The thrombin generation assay was performed in human plasma using an in-house assay. A single concentration of rivaroxaban, apixaban, or betrixaban (200 nM) was incubated with increasing concentrations of andexanet. Equivalent volume of formulation buffer at each andexanet concentration was added to the plasma as control in the absence of FXa inhibitors.

Figure 4: 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 TF-CAT 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



ETP = Endogenous thrombin potential; Peak = Peak thrombin; 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.

2.1.4 *In vitro* 試験の要約

In vitro 試験により、andexanet は直接作用型 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）に高親和性で結合することが示された。

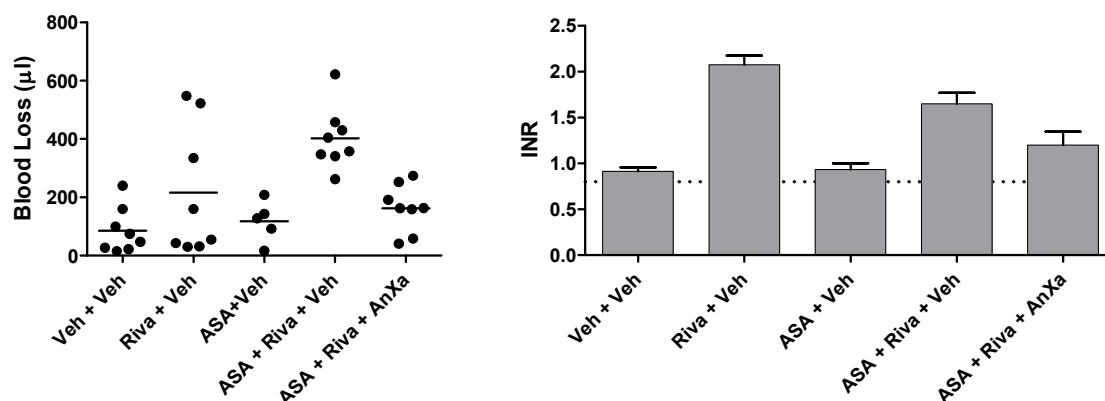
2.2 *In vivo* 試験

2.2.1 直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用に対する andexanet の無効化作用 げっ歯類

マウス尾切断モデルにおいては、雄性マウス（C57B1/6、約 8 週齢、各群 5～8 例）にリバーロキサバン 50 mg/kg（溶媒：0.5%メチルセルロース）の経口投与及びアスピリン飲水投与（出血量測定試験開始 5～7 日前に 100 mg/kg 投与）を行った。本モデルでは、リバーロキサバン単独で有意な出血を誘導しなかったため、アスピリンを併用した。試験当日、マウスにリバーロキサバンを経口投与し、その 2 時間後に麻酔下で 4.8 mg/mL（溶媒：tris, L-arginine, pH 7.4）の andexanet 200 μ L を静脈内投与した。Andexanet 投与後速やかに尾を切断し、尾を 15 分間温生理食塩水に浸けて出血させた。出血評価時間の終了時点でマウスを屠殺し、心臓穿刺により血液を採取し、INR、抗 FXa 活性並びにリバーロキサバン及び andexanet の濃度を測定した。

アスピリン飲水投与条件下での andexanet によるリバーロキサバンの抗凝固作用の無効化は、PD 測定値（抗 FXa 活性及び全血 INR）及び出血量の減少により示された（NC-12-0457-R0001）。Andexanet の予防的投与では、andexanet（約 1 mg/例）の投与により抗凝固状態下のマウス対照群との比較で、アスピリン及びリバーロキサバン併用投与で誘導された出血量の平均値は 403 $\pm$ 107 μ L から 163 $\pm$ 82 μ L に減少し（ $P=0.0002$ ）、アスピリン単独投与群の出血量の平均値（118 $\pm$ 71 μ L）とほぼ同等であった（ $P=0.36$ ）。全血 INR（平均値 $\pm$ 標準偏差）は、1.65 $\pm$ 0.295 から 1.20 $\pm$ 0.414 に減少した（ $P<0.05$ 、リバーロキサバン+アスピリン群との比較）（Figure 5）。Andexanet によるリバーロキサバンの捕捉及びその後の組織から血管内コンパートメントへのリバーロキサバンの再分布により、andexanet はリバーロキサバンの血漿中濃度を約 7 倍増加させた（63 $\pm$ 27 ng/mL（145 $\pm$ 62 nmol/L）から 497 $\pm$ 1.9 ng/mL（1140 $\pm$ 4.4 nmol/L））。抗 FXa 活性は 99.2 $\pm$ 56.2 から 21.1 $\pm$ 27.2 に減少した（ $P=0.006$ 、リバーロキサバン+アスピリン群との比較）。Andexanet とリバーロキサバンの血漿中濃度のモル比（15 分間出血評価期間終了時）は約 2:1 と推定され、リバーロキサバンの抗凝固作用を無効化するのに十分であった（血漿中 andexanet 平均濃度=2.2 μ mol/L、試験終了時点の血漿中リバーロキサバン平均濃度=1.1 μ mol/L）。

Figure 5: リバーロキサバン及びアスピリンを投与した抗凝固状態下のマウスにおける andexanet 投与による出血量及び INR の減少



AnXa = Andexanet; ASA = Aspirin; INR = International normalized ratio; Riva = Rivaroxaban; SD = Standard deviation; Veh = Vehicle

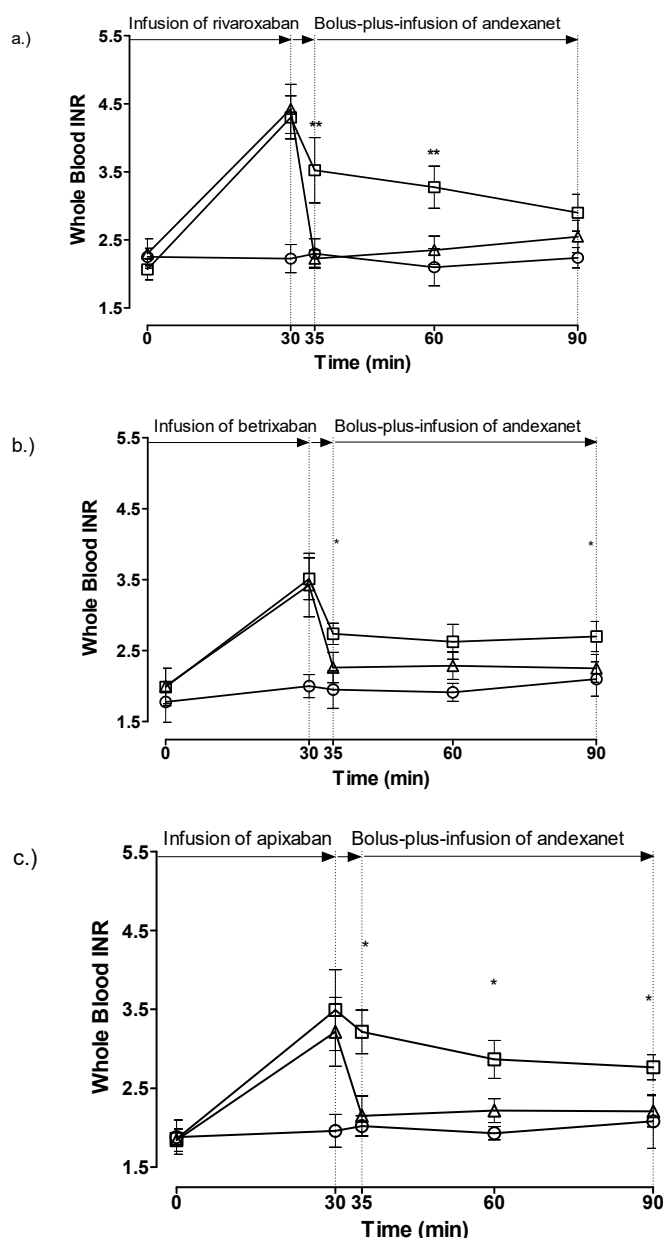
Legend: Andexanet reduced blood loss and INR in rivaroxaban-plus-aspirin anticoagulated mice.

Left Panel: Male mice were anticoagulated with aspirin in the drinking water (~5-7 days) and administered rivaroxaban by oral gavage (50 mg/kg) on the day of the study. Two hours after rivaroxaban was administered, andexanet was administered by IV bolus (~1 mg/mouse). Tails were transected immediately following andexanet injection, and tails were allowed to bleed into warm saline for 15 minutes. At the end of the blood loss period, mice were sacrificed and a terminal blood sample was obtained via cardiocentesis for determination of INR, rivaroxaban, anti-fXa activity, and andexanet concentration.

Right Panel: Whole blood INR was increased ~2-fold following treatment with aspirin and rivaroxaban, compared with mice administered aspirin alone, and the administration of andexanet (~1 mg/kg) reduced INR ($p < 0.05$) nearly to the levels seen in mice administered aspirin alone. $N = 5 - 8$ animals/group. Data are shown as mean $\pm$ SD.

アピキサバン若しくはbetrixaban([NC-12-0449-R0001](#))又はリバーロキサバン([NC-12-0453-R0001](#))を投与した抗凝固状態下のラットにおいて、andexanet 投与により全血 INR は速やかに減少した (Figure 6)。雄性 Sprague-Dawley ラット (各群 4~7 例、体重: 428 ± 24 g、 447 ± 18 g 又は 325 ± 7 g) に、アピキサバン (0.5 mg/kg/hr、溶媒: 50% PEG300)、betrixaban (1.0 mg/kg/hr、溶媒: 生理食塩水) 又はリバーロキサバン (0.25 mg/kg/hr、溶媒: 50% PEG300) を 30 分間持続静脈内投与し、抗凝固状態にした。これら FXa 阻害剤の静脈内投与終了時点で、andexanet (又は溶媒: 10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80) を 5 分間かけてボーラス投与し、引き続き 55 分間持続静脈内投与した (アピキサバン及び betrixaban 群では 6 mg のボーラス投与に続き 6 mg/hr で持続静脈内投与、リバーロキサバン群では 4 mg のボーラス投与に続き 4 mg/hr で持続静脈内投与) (試験時間の合計は 90 分間)。経時的に採血した一連の血液試料は、全血 INR 及び FXa 阻害剤の血漿中非結合型濃度の分析に用いた。抗凝固作用により INR はアピキサバンで 1.9 から 3.5、betrixaban で 1.9 から 3.5 及びリバーロキサバンで 2.1 から 4.3 に約 2 倍増加したが、andexanet のボーラス投与により INR は速やかに減少し、3 種の抗凝固剤すべてにおいて、血漿中非結合型 FXa 阻害剤濃度は抗凝固剤投与終了時点 (30 分時点) と andexanet 投与終了時点 (35 分時点) の比較で、アピキサバンで 9.5 ng/mL (20.7 nmol/L) から 0.97 ng/mL (2.11 nmol/L)、betrixaban で 39.6 ng/mL (87.6 nmol/L) から 2.79 ng/mL (6.17 nmol/L) 及びリバーロキサバンで 13.4 ng/mL (30.7 nmol/L) から 0.07 ng/mL (0.16 nmol/L) に約 10 分の 1 に減少した。INR の減少は、andexanet の持続静脈内投与期間を通じて維持された。

Figure 6: Andexanet の直接作用型 FXa 阻害剤誘導 INR 増加に対する抑制



FXa = Factor Xa; INR = International normalized ratio; IV = Intravenous; SD = Standard deviation

Legend: Reversal of whole-blood INR by andexanet in rats treated with direct FXa inhibitors.

a. Whole-blood INR values in rats infused with rivaroxaban (0.25 mg/kg/hr) or vehicle for 30 minutes and then treated with either vehicle or andexanet by IV bolus (4 mg) over 5 minutes plus infusion (4 mg/hr) for up to 90 minutes. $P \leq 0.01$ compared with the andexanet treatment group.

b. Whole-blood INR values in rats infused with betrixaban (1 mg/kg/hr) or vehicle and then treated with either vehicle or andexanet by IV bolus (6 mg) over 5 minutes plus infusion (9 mg/hr) for up to 90 minutes. $P \leq 0.02$ compared to the andexanet treatment group.

c. Whole-blood INR values in rats infused with apixaban (0.5 mg/kg/hr) or vehicle and then treated with either vehicle or andexanet by IV bolus (6 mg) over 5 minutes plus infusion (6 mg/hr) for up to 90 minutes. $P \leq 0.01$ compared to the andexanet treatment group.

Circles, vehicle + vehicle; squares, anticoagulant + vehicle; triangles, anticoagulant + andexanet. Data are expressed as mean $\pm$ SD.

上記のげっ歯類を用いた試験においては、出血量及び PD マーカーは抗凝固剤に対する andexanet のモル濃度比を過剰にした条件では顕著に減少した。止血の回復に必要なモル比は、抗凝固剤の特性及び *in vivo* 濃度に依存すると考えられた。

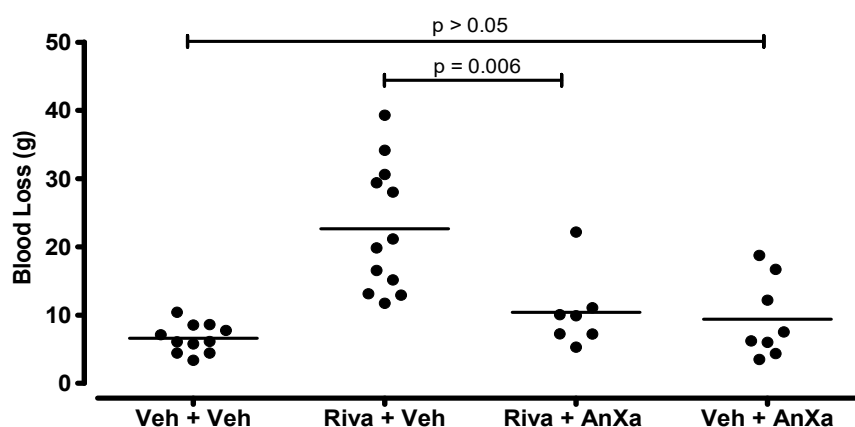
ウサギ予防的モデルーリバーロキサバン

肝臓傷害により引き起こされる大出血及び凝固障害のモデルであるウサギ肝臓創傷モデルにおいて、andexanet により出血量及び抗凝固作用の PD マーカー（抗 FXa 活性、PT 及び aPTT）は減少又は回復し、血漿中抗凝固剤の非結合型濃度は減少した。非結合型濃度の減少と同時に、抗凝固剤が組織から血管内コンパートメントへと再分配されるため、血漿中総抗凝固剤濃度の増加がみられた⁶⁾。

リバーロキサバンを用いた試験（NC-13-0561-R0001、NC-13-0561-R0002）において、リバーロキサバン（1 mg/kg）又は溶媒（85% PEG300、8% H₂O、5% glycerin、2% DMSO）を麻酔下ウサギ〔雄性 New Zealand White（NZW）、約 3 ヶ月齢、各群 8～12 例〕にボーラス投与し、30 分経過後に andexanet（75 mg/例）又は溶媒（10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）を 5 分間かけてボーラス投与した。次に 2 つの肝葉の 10 ヶ所に 1 cm の創傷を施し、創傷直前に腹腔内に配置した重量測定済みのガーゼに血液を 15 分間採取した。採取した血液は、リバーロキサバンの血漿中総濃度及び非結合型濃度の測定、抗 FXa 活性、PT、aPTT 及び andexanet の血漿中濃度測定に用いた。リバーロキサバンはリバーロキサバン非投与群（溶媒単独群）と比較して、肝臓創傷による平均出血量を約 2 倍増加させた。リバーロキサバン投与後 30 分間経過した時点での抗凝固状態下のウサギにおけるリバーロキサバンの平均血漿中濃度は約 600 ng/mL（1.4 µmol/L）であり、健康被験者（20 mg 錠）及び合併症を伴わない患者における FXa 阻害剤の最高血漿中濃度（C_{max}）よりも約 2 倍高かった⁹⁾。

抗凝固状態下のウサギにおいて、出血量は 75 mg の andexanet 投与により回復し（10.43±5.56 g P=0.006、リバーロキサバン+溶媒群との比較）、溶媒単独投与群での出血量と同等であった。溶媒単独投与群での出血量は 6.42±2.12 g で andexanet 単独投与群での 9.41±5.78 g と統計学的有意差はなかった（P>0.05）（Figure 7）。

Figure 7: 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

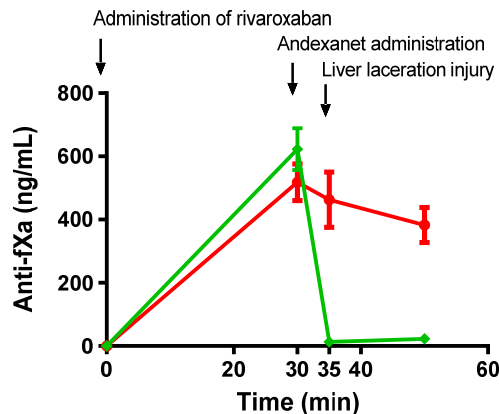


AnXa = Andexanet; Riva = Rivaroxaban; Veh = Vehicle

Legend: Andexanet reversed the anticoagulant 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). Mean blood loss in animals administered andexanet alone was indistinguishable from that seen in non-anticoagulated animals (p > 0.05 veh + veh vs. veh + AnXa).

また、出血量の減少に伴い、抗 FXa 活性（Figure 8）はベースライン値（試験開始時に得られた値⁶⁾、PT 及び aPTT の結果と共に以下に記載¹⁶⁾）まで速やかに減少した。

Figure 8: 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

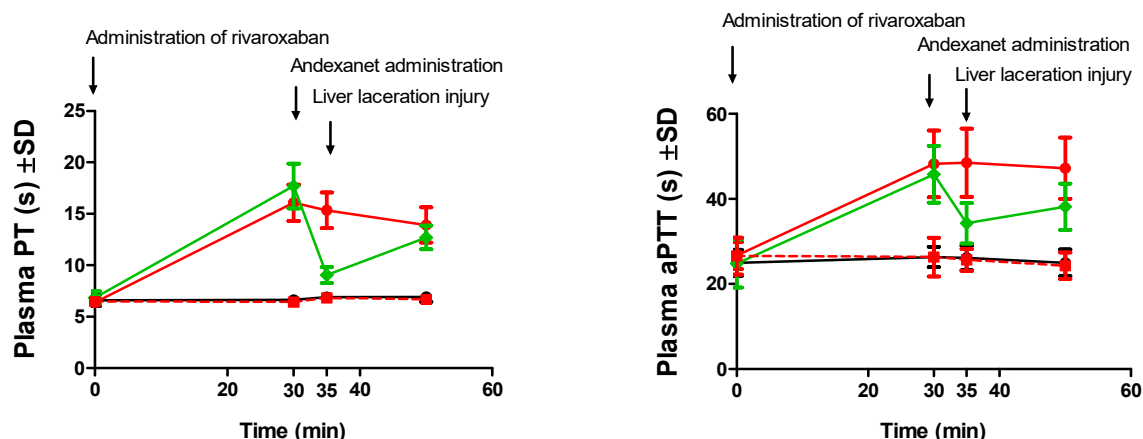


IV = Intravenous; fXa = Factor Xa

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

PT 及び aPTT はすべての採血時点で測定した（Figure 9）。PT はリバーロキサバン投与により約 2～3 倍延長した。Andexanet（75 mg）は PT 延長を顕著に短縮させ、andexanet 投与終了時点でベースライン近くまで速やかに回復させた。同様に aPTT 延長も andexanet 投与により速やかに回復した。

Figure 9: リバーロキサバン投与による PT 及び aPTT 延長に対する andexanet 投与による無効化



aPTT = Activated partial thromboplastin time; PT = Prothrombin time; SD = Standard deviation

Legend: PT and aPTT are decreased to near baseline following administration of andexanet (75 mg) in rabbits anticoagulated with rivaroxaban. PT (left panel) and aPTT (right panel) were prolonged following anticoagulation with rivaroxaban. Andexanet treatment reduced both PT and aPTT prolongation. PT and aPTT were measured using PT-fibrinogen and SynthASil, respectively (HemosIL). ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = Rivaroxaban + andexanet, 75 mg, ■ dashed line = Andexanet alone; ● = vehicle alone.

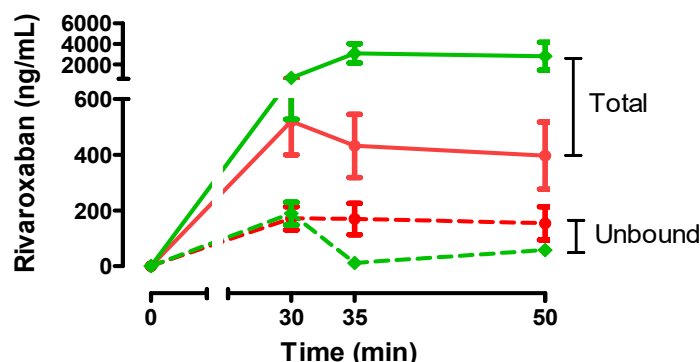
Note: Andexanet alone and vehicle are superimposed.

抗 FXa 活性の結果と一致して、非結合型リバーロキサバンの平均血漿中濃度は andexanet 投与により減少し、それに伴い総リバーロキサバン濃度は増加した (Figure 10)。ウサギにおける非結合型リバーロキサバンの平均濃度は、andexanet の 75 mg ボーラス投与 (5 分間) で約 190 ng/mL (436 nmol/L) から約 12 ng/mL (28 nmol/L) に減少し、報告されているウサギ血漿中での FXa に対するリバーロキサバンの IC₅₀ (21 nmol/L) とほぼ同等であった²⁾。

リバーロキサバンと andexanet を併用投与したウサギにおいて、リバーロキサバンの血漿中総薬物濃度は増加し、非結合型濃度は減少した。リバーロキサバンの総薬物濃度は andexanet 投与後 (35 分経過後) に速やかに最高濃度に達した。リバーロキサバン+andexanet 投与群では、リバーロキサバンの血漿中総薬物濃度が 5 分間の andexanet 投与後に約 5 倍に増加した [約 500～700 ng/mL (約 1.1～1.6 μmol/L、投与群毎に異なる) から 3,000～4,000 ng/mL (約 7～8 μmol/L)]。

これらの結果は、andexanet の作用機序から予測されるものである。投与後、andexanet は直接作用型 FXa 阻害剤に高親和性で結合することにより、血漿中非結合型濃度を減少させる。このことが利用可能な FXa 阻害剤の組織から血管内コンパートメントへの再分布を引き起こす。結果として、FXa 阻害剤の血漿中総濃度は増加するが、非結合型濃度は減少する (モジュール 2.6.4 参照)。

Figure 10: Andexanet 投与による血漿中非結合型リバーロキサバン濃度の減少及び総リバーロキサバン濃度の増加



SD = Standard deviation; LC-MS/MS = Liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

Legend: Mean total rivaroxaban concentration in plasma was increased by ~5-fold immediately following the administration of andexanet, while the unbound rivaroxaban was reduced dramatically due to the mechanism of binding to direct FXa inhibitors⁶. Total plasma rivaroxaban was measured by LC-MS/MS. Unbound plasma rivaroxaban was determined by an equilibrium dialysis method. ● = Rivaroxaban only; ◆ = Rivaroxaban + andexanet. Total rivaroxaban, solid lines; unbound rivaroxaban, dashed lines. N=8-10 rabbits per group. Data shown are mean ± SD.

最初の試験⁶では andexanet の血漿中濃度は報告しなかったが、同一のウサギ肝臓創傷モデルを用いたその後の試験（NC-13-0561-R0001 など）において、andexanet を 75 mg/例の用量でボラス投与したときの投与終了直後の平均 andexanet 濃度は約 10~11 μmol/L であった（溶媒+andexanet 又はリバーロキサバン+andexanet 投与ウサギ）。したがって、本試験において止血の回復に必要なモル濃度比（andexanet : 総リバーロキサバン）は約 1.3:1~1.5:1 と算出された。

以上より、本試験の結果から、内臓出血モデルにおいて、予防的に andexanet を単回ボラス投与することで、リバーロキサバンにより誘導される抗凝固作用が無効化され、止血能が回復し、出血量が減少することが示された。Andexanet 投与により認められた出血量の減少に伴い、抗 FXa 活性及びリバーロキサバンの血漿中非結合型濃度が減少した。

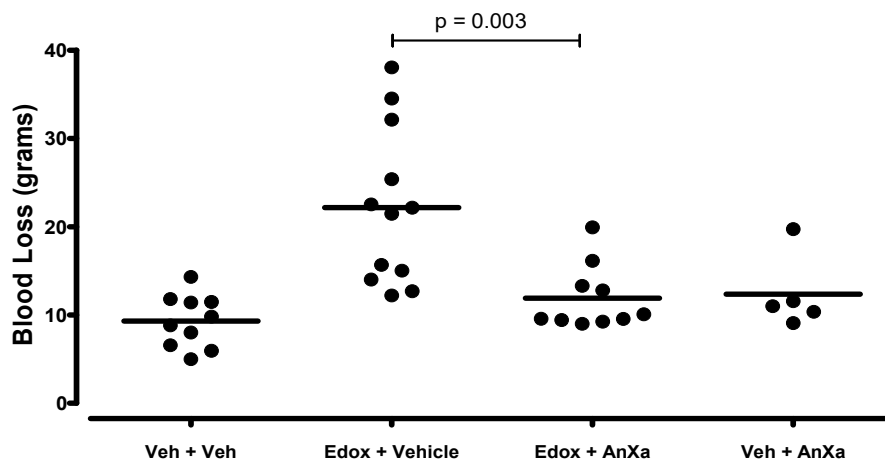
ウサギ予防的モデル—エドキサバン

エドキサバンについても予防的肝臓創傷モデルを用いて評価を行い（NC-13-0567-R0001）、andexanet がエドキサバン（1 mg/kg）により誘導される出血を減少させることを確認した。エドキサバン又は溶媒（90% PEG300、8% H₂O、8% glycerin、2% DMSO）は、雄性 NZW ウサギ（約 3 ヶ月齢、各群 5~12 例）に andexanet 投与（75 mg/例、5 分間かけてボラス投与）開始 20 分前に静脈内投与した。Andexanet に用いた溶媒（10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）は、エドキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギ及び非抗凝固状態下のウサギに对照として投与した。Andexanet の投与終了時に肝臓に創傷を施し、重量測定済みのガーゼで 15 分間血液を採取した後、動物を屠殺した（試験終了）。出血量は試験終了時点で測定（グラム単位）し、経時的に採取した血液試料は抗 FXa 活性、エドキサバンの血漿中総濃度及び非結合型濃度並びに andexanet の血漿中濃度の測定に用いた。

エドキサバンの抗凝固作用は平均出血量を約 2 倍増加させた。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結果、出血量は 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 11）。

Figure 11: 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



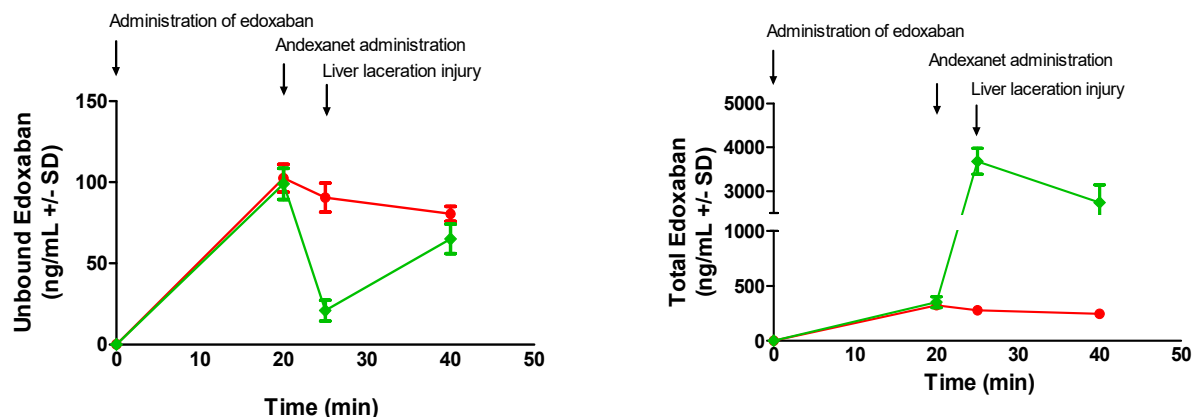
AnXa = Andexanet; Edox = Edoxaban; Veh = Vehicle; IV = Intravenous

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).

Andexanet 投与後、エドキサバンの血漿中非結合型濃度は顕著に減少した（ $P<0.0001$ 、エドキサバン+andexanet 投与群での andexanet 5 分間ボーラス投与の投与前と投与終了時との比較）。Andexanet（又は溶媒）投与直前のエドキサバンの平均血漿中非結合型濃度は約 100 ng/mL (0.18 $\mu\text{mol/L}$)であり、andexanet投与後速やかに約 21 ng/mL (0.04 $\mu\text{mol/L}$)まで減少した（Figure 12）。エドキサバンの血漿中総濃度（平均値 $\pm$ 標準偏差）は、エドキサバン+andexanet 投与群では 5 分間の andexanet 投与中に 352.1 $\pm$ 49.5 ng/mL (0.64 $\mu\text{mol/L}$) から 3,681 $\pm$ 297 ng/mL (6.7 $\mu\text{mol/L}$) へと約 10 倍増加した。

抗凝固状態下の動物への andexanet 投与は、andexanetのエドキサバンに対する高親和性の結果、非結合型 FXa 阻害剤の組織及び血管内コンパートメント間の平衡関係が再構築される際に FXa 阻害剤が組織から血管内コンパートメントに移行することにより、FXa 阻害剤の総濃度を増加させた。ウサギを用いたリバーロキサバン試験と同様に、エドキサバンの総濃度に対して過剰なモル濃度の andexanet は、エドキサバンによる抗凝固活性及び出血量の増加を大幅に減少させると考えられた。Andexanet 5 分間ボーラス投与終了時点で andexanet の血漿中濃度は 443 $\pm$ 47 $\mu\text{g/mL}$ （約 10.8 $\mu\text{mol/L}$ ）であった。このように、本試験において抗凝固作用の無効化に必要な andexanet のエドキサバン総濃度に対するモル比は、約 1.6:1 であった。

Figure 12: Andexanet 投与による血漿中非結合型エドキサバン濃度の減少及びエドキサバン総濃度の増加



SD = Standard deviation

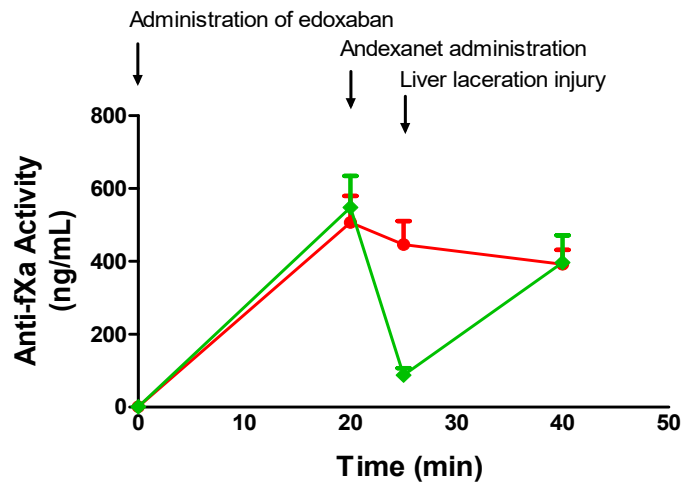
Legend: Unbound and total edoxaban levels.

Left Panel: Free edoxaban plasma concentration (not bound to plasma protein or andexanet) was undetectable at pre-study (T=0) and was similar for both groups prior to the start of andexanet administration (T=20). After the 5-minute bolus administration of andexanet, the free edoxaban was significantly reduced ($p < 0.0001$ vs. edoxaban + vehicle). Plasma unbound edoxaban began to return to pre-treatment levels by the end of the blood loss collection period; nonetheless, the mean level of unbound edoxaban was significantly less in the andexanet-treated rabbits, compared with rabbits treated with edoxaban + vehicle. ● = Edoxaban + vehicle; ◆ = Edoxaban + andexanet.

Right Panel: Total edoxaban plasma concentrations were similar for both groups prior to the start of the 5-minute andexanet IV bolus. After the IV administration of andexanet, the total plasma edoxaban increased ~10-fold and remained elevated through the end of the blood loss collection period, as the extravascular edoxaban was redistributed intravascularly due to the high affinity of edoxaban for andexanet. ● = Edoxaban + vehicle; ◆ = Edoxaban + andexanet.

Andexanet 投与による非結合型エドキサバン濃度の減少に伴い、抗 FXa 活性も有意に減少した。抗凝固状態下のウサギに溶媒又は andexanet を投与した直後では、抗 FXa 活性がエドキサバン+溶媒投与群で 446.5 ± 64.27 ng/mL であり、エドキサバン+andexanet 投与群では 99.5 ± 40.94 ng/mL であった ($P < 0.0001$)。さらに、平均抗 FXa 活性は、andexanet の 5 分間の投与終了時点では、投与開始前の 548.4 ± 86.49 ng/mL から 99.5 ± 40.94 ng/mL に減少しており、投与前値と比較して andexanet 投与終了時点で 84%減少した ($P < 0.0001$) (Figure 13)。

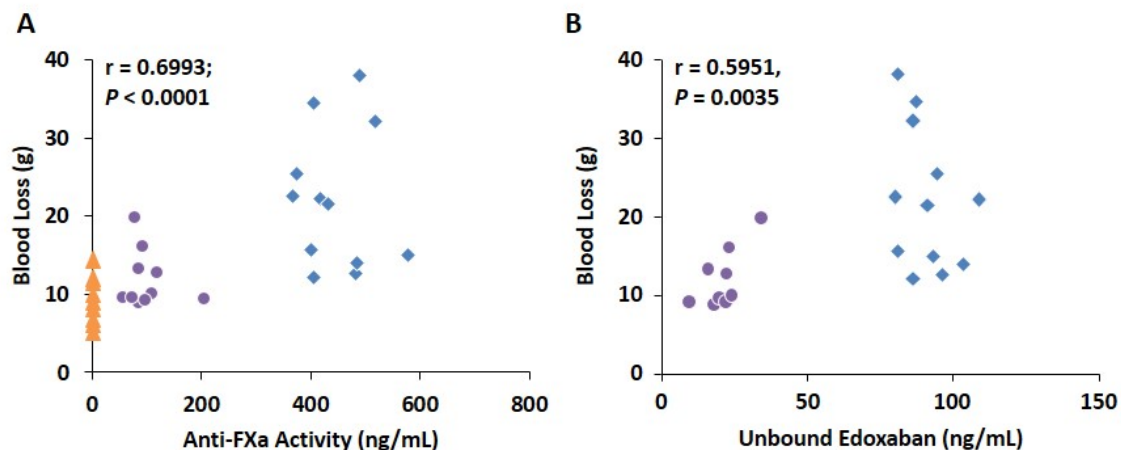
Figure 13: エドキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける抗 FXa 活性の andexanet 投与による無効化



Legend: Anti-FXa activity was below the limit of quantitation for both groups prior to anticoagulant administration and increased significantly with edoxaban administration (measured at the start of andexanet administration, 20 minutes after edoxaban IV bolus injection). Just prior to andexanet administration, anti-FXa levels were similar for both groups. After the 5-minute bolus administration of andexanet, mean anti-FXa levels decreased significantly in the group receiving andexanet ($p < 0.0001$ vs. edoxaban alone).
 ● = Edoxaban + vehicle; ◆ = Edoxaban + andexanet.

Andexanet 投与終了直後における、総出血量 (15 分間) と抗 FXa 活性又は非結合型エドキサバン濃度との相関は、抗凝固状態下の動物において有意であった (それぞれ $P < 0.0001$ 及び $P = 0.0035$) (Figure 14)。いずれの場合も有意な相関が認められた (出血量と抗 FXa 活性に関しては $r = 0.6993$ 、出血量と非結合型エドキサバン濃度に関しては $r = 0.5951$)¹⁷⁾。Andexanet 投与による出血の回復は、andexanet の有無の条件下で示されたとおり、明らかであった (NC-13-0567-R0002)。

Figure 14: 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と抗 FXa 活性
又は非結合型エドキサバン濃度との相関性



Legend: Correlation between anti-FXa activity and blood loss. Animals were administered edoxaban by IV bolus, and after 20 minutes to allow for distribution of edoxaban into the tissues, andexanet (75 mg/rabbit) was administered IV over a period of 5 minutes. At the end of the andexanet IV bolus, ten 1-cm lacerations were made in 2 lobes of the liver (5 lacerations in each lobe), and blood was collected for 15 minutes onto pre-weighed gauze. Blood loss was significantly correlated with anti-FXa activity ($p < 0.0001$), with a meaningful correlation ($r=0.6993$) and with unbound edoxaban levels ($p = 0.0035$, $r = 0.5951$), as determined by Spearman analysis (SAS 9.3), and confirmed by Kendall's tau. Each data point represents the measurement from an individual rabbit. ▲ vehicle alone (both edoxaban + andexanet vehicle); ● edoxaban + andexanet (75 mg/rabbit); ◆ edoxaban + andexanet vehicle.

Andexanet 投与後のウサギでは、PT 及び aPTT の延長が、andexanet 投与前値と比較して、それぞれ 66% ($P < 0.001$ 、エドキサバン+溶媒群との比較) 及び 18% ($P > 0.05$ 、エドキサバン+溶媒群との比較) 短縮された。

本試験より、内臓出血モデルにおいて、andexanet の予防的単回ボラス投与は、エドキサバンによる抗凝固作用を無効化し、止血能を回復させ、出血量を減少させることが示された。これらのデータは、本モデルにおける andexanet の効果が、主として andexanet による抗凝固剤の捕捉を介する阻害剤の非結合型濃度の減少、抗 FXa 活性の無効化及び正常止血機構の回復によるものであるというコア仮説と一致している。

ウサギ治療的モデルーリバーロキサバン

別の試験では、andexanet 投与による活動性出血下における出血量減少の可能性を検討するため、andexanet を肝臓創傷後に「治療」レジメンとして投与した (NC-14-0575-R0001)。本試験は、出血量減少に必要なリバーロキサバン総血漿中濃度に対する andexanet 濃度の最小化学量論比を決定するために計画した。雄性 NZW ウサギ (約 3 ヶ月齢、各群 5~15 例) に溶媒 (85% PEG300、8% H₂O、5% glycerin、2% DMSO) 又はヒト治療域の C_{max} (約 260 ng/mL、0.6 μ mol/L)⁹⁾ が得られるようにリバーロキサバン (0.5 mg/kg) をボラス投与し、リバーロキサバンの体内分布に要する時間 (30 分間) の経過後、全動物を開腹して肝臓に創傷を施した (開腹はリバーロキサバン投与 20 分後、肝臓創傷は 30 分後に実施)。Andexanet 又は溶媒 (10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80) 投与前に 10 分間の出血量を測定し、血液を吸収したガーゼを清潔なガーゼと交換した。10 分間の平均出血量はリバーロキサバン投与の 5 群で同程度 (6.4~9.1 g) であり、抗凝固剤非投与動物での出血量 (2.8~5.2 g) の約 2 倍であった。

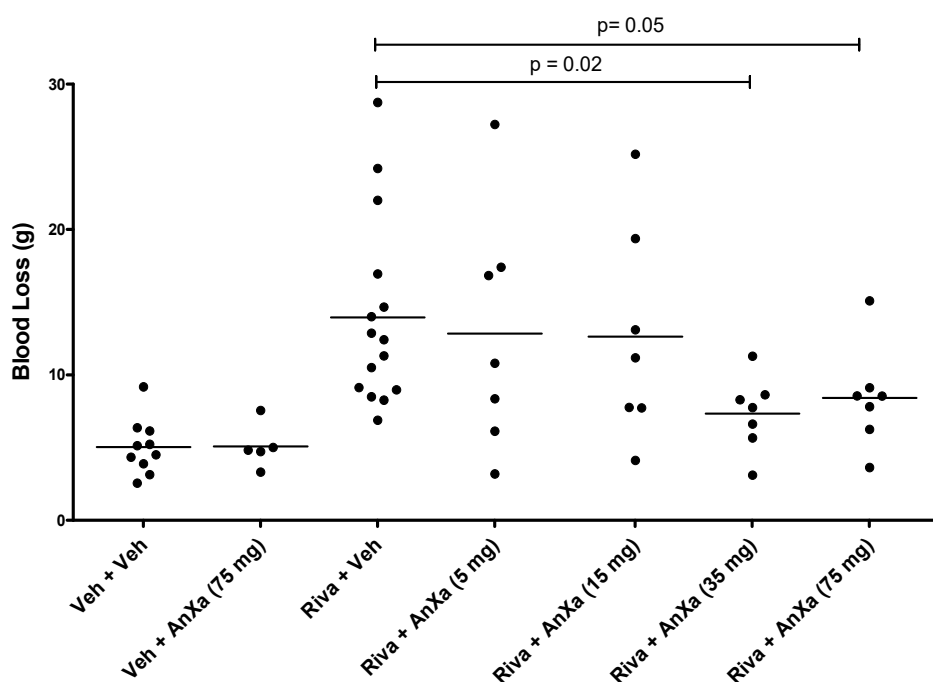
本治療的モデルにおいて、最初の 10 分間の出血経過後に andexanet を 5、15、35 又は 75 mg/例

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

の用量で5分間かけてボーラス投与した。さらに30分間採血し（合計35分間採血）、ガーゼ重量を測定した。リバーロキサバンの抗凝固作用により、出血量の平均値は溶媒対照群の 5.1 ± 1.9 gからリバーロキサバン投与群で 14.0 ± 6.4 gに有意に増加した（ $P < 0.001$ ）。Andexanetの35 mg及び75 mg投与群の出血量の平均値は有意に減少し、それぞれ 7.3 ± 2.6 g及び 8.4 ± 3.5 gであった（それぞれ $P = 0.02$ 及び $P = 0.05$ 、リバーロキサバン+溶媒群との比較）。Andexanetの5 mg及び15 mg投与群の出血量は減少しなかった（Figure 15）。

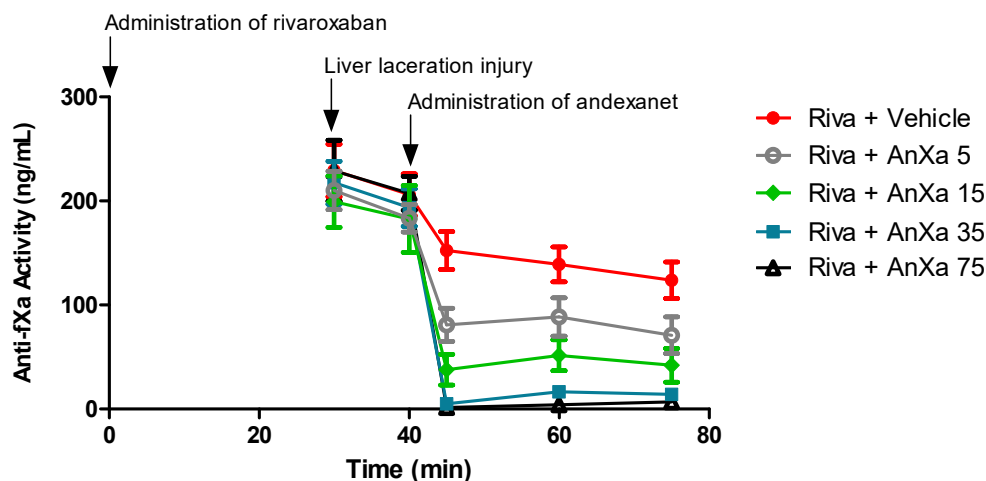
Figure 15: リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギにおける肝臓創傷時出血量の andexanet による減少



Legend: Animals were administered rivaroxaban (0.5 mg/kg) by IV bolus, and after 30 minutes to allow for distribution of rivaroxaban into the tissues, ten 1-cm lacerations were made in 2 liver lobes (5 lacerations in each lobe), and blood was collected for 10 minutes onto pre-weighed gauze. At the end of the 10 minute bleed time the gauze was exchanged, and andexanet was administered IV over a period of 5 minutes. Blood was collected for an additional 30 minutes. Blood loss was significantly reduced by andexanet (35 and 75 mg/rabbit) in rivaroxaban-anticoagulated rabbits ($p = 0.02$ and $p = 0.05$, respectively), rivaroxaban vs. rivaroxaban + andexanet.

Andexanetの投与によりすべての投与量で抗FXa活性は有意に減少した（ $P < 0.001$ 、すべてのandexanet投与群とリバーロキサバン単独投与群との比較）。Andexanet投与開始後5分間経過（肝臓創傷15分後）時点での抗FXa活性の平均値は、リバーロキサバン単独投与群の 152 ± 18 ng/mLから、andexanetの5、15、35及び75 mg投与群で、それぞれ 81 ± 16 、 38 ± 15 、 5.2 ± 1.2 及び 1.5 ± 0.5 ng/mLに減少した（Figure 16）。Andexanetにより、抗FXa活性と同様に、PT及びaPTTの延長も用量依存的に短縮された（NC-14-0575-R0001）。

Figure 16: 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



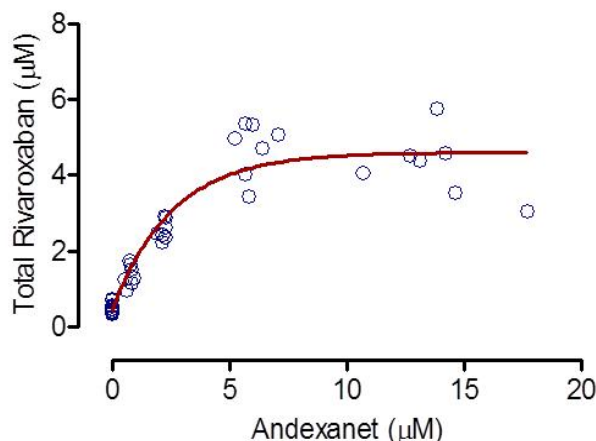
AnXa = Andexanet; Riva = Rivaroxaban

Legend: Anti-fXa activity was below the limit of quantitation prior to anticoagulant administration and increased significantly 30 minutes following rivaroxaban administration at the time of liver injury. At the beginning of andexanet administration, anti-fXa activity levels were similar for all groups treated with anticoagulant. After the 5-minute IV bolus infusion of andexanet (45 minute time point), mean anti-fXa levels were decreased significantly for all andexanet dose levels ($p < 0.001$ vs. rivaroxaban alone).

抗 FXa 活性の減少に相関して血漿中リバーロキサバンの非結合型濃度は減少し、総濃度は増加した。本試験を含む非臨床試験データから、抗凝固状態下の動物への andexanet の投与で、抗凝固剤の総血漿中濃度が増加することが示されている。ウサギにおける andexanet の 35 mg/例及び 75 mg/例投与時の PK 評価で、andexanet 投与によりリバーロキサバンの平均総血漿中濃度は、35 mg 投与群で 0.61 $\mu\text{mol/L}$ から 4.71 $\mu\text{mol/L}$ に、75 mg 投与群で 0.68 $\mu\text{mol/L}$ から 4.28 $\mu\text{mol/L}$ に増加することが示された。これは、リバーロキサバンに対する andexanet の高い結合親和性により、リバーロキサバンが組織から血管内コンパートメントへ再分布されることによるものと推察された。

Andexanet の持続静脈内投与による投与終了時点では、andexanet のモル濃度は、35 mg 及び 75 mg 投与群でそれぞれ約 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 及び 13.8 $\mu\text{mol/L}$ であった。Figure 17 に示すように、血漿中リバーロキサバン濃度は約 4 $\mu\text{mol/L}$ (本試験でのリバーロキサバン投与量) で平衡状態に達し、andexanet の濃度増加にかかわらず、リバーロキサバンの血管内コンパートメントへのさらなる移行はみられなかった。

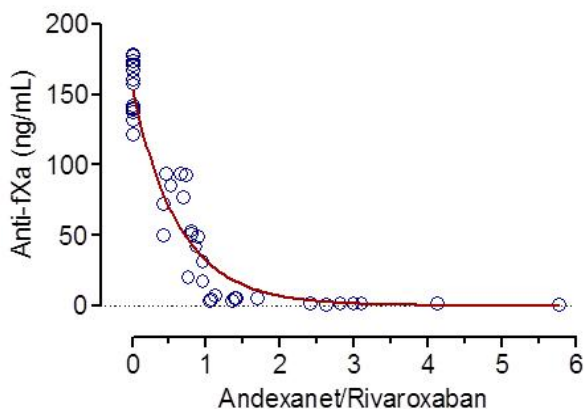
Figure 17: ウサギ肝臓創傷治療モデルにおける andexanet 投与による血漿中総リバーロキサバン濃度の増加



Legend: Total rivaroxaban plasma concentration increased following the administration of andexanet, as extravascular rivaroxaban was drawn into the intravascular compartment due to its high affinity for andexanet. Rivaroxaban concentration reached a plateau at approximately 4 μM, when administered at a dose of 0.5 mg/kg. Plasma levels of rivaroxaban did not increase further as andexanet levels increased, indicating that most of the available rivaroxaban was present in the intravascular space. Each data point represents a single animal.

本試験において抗凝固作用（抗 FXa 活性に基づく評価）の完全な無効化に必要な andexanet とリバーロキサバンの最小モル濃度比は約 1.3:1 であった（Figure 18）。

Figure 18: ウサギ肝臓創傷治療モデルにおける抗 FXa 活性と andexanet／リバーロキサバンのモル比



Legend: Anti-fXa activity as a function of andexanet/rivaroxaban molar ratio. In this treatment study, the molar ratio of andexanet to rivaroxaban needed to reverse rivaroxaban-induced anticoagulation as measured by anti-fXa activity was approximately 1.3:1.

要約すると、これらの結果から、活動性出血下における andexanet の投与は、リバーロキサバンの抗凝固作用を用量依存的に無効化し、出血量、抗 FXa 活性及び抗凝固マーカーを非抗凝固状態下のウサギと同等のレベルにまで顕著に減少させることが示された。非結合型リバーロキサバンの血漿中濃度の減少に伴い、組織中のリバーロキサバンが血管内コンパートメントに移行することで、リバーロキサバンの総血漿中濃度が増加した。Andexanet のモル濃度が 6 μmol/L になった

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

時点で、リバーロキサバンの総血漿中濃度は約 4 $\mu\text{mol/L}$ で一定になり、本条件下で 1.3:1 のモル濃度比は止血を再び制御するために十分であることが示された。

ブタ治療的モデル—アピキサバン

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雄性 German Landrace 種ブタ（各群 7 例）に、andexanet のボーラス投与（1,000 mg）又はボーラス投与（1,000 mg）後 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（NC-17-0798-R0001）¹²⁾。左右大腿骨骨折に続く 1 つの肝葉での挫滅創傷後に、andexanet を投与した。複数の PD マーカー（抗 FXa 活性、IIa 産生、PT、EXTEM 及び 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（生理食塩水）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 活性は静脈内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非結合型濃度は 95%減少し、アピキサバンの総濃度は約 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 3,403 $\pm$ 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。対照群とは対照的に、andexanet 投与群では全例が試験期間中（5 時間）生存した。

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 動物と類似）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。

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¹³⁾。抗凝固状態下の雄性ブタ（各群 8 例）に創傷を施して出血を誘導し、その後andexanet 5000 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、アピキサバン及びリバーロキサバンの抗 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。

2.3 Andexanet と非特異的中和剤との比較

FXa 阻害剤に対する複数の生物学的中和剤の臨床開発が現在進められている。これら製剤は、1) 標的分子を中和又は解離させることで IIa 又は FXa 阻害剤の抗凝固作用を無効化する真の「中和剤」、2) 抗凝固剤による作用を上回る凝固促進作用を誘導するために、単一の凝固因子（rFVIIa など）又は代替凝固因子の混合物（3F-PCC 又は 4F-PCC）を用いた製剤、の 2 つのカテゴリーに分類される。強力な凝固促進剤及び一般的な止血剤として承認されている rFVIIa は、血友病患者又は FVII 欠損患者の出血治療薬として開発され、3F-PCC 又は 4F-PCC は、ワルファリンにより抗凝固状態にある患者の治療薬として開発された。しかしながら、単剤（rFVIIa）及び濃縮製剤（3F-PCC 又は 4F-PCC）のいずれも化学量論的に抗凝固剤の濃度を上回るだけの十分な FX（又は FXa）を供給することはできない。**Andexanet** とこれらの製剤との比較のために、リバーロキサバンを投与した抗凝固状態下のウサギを用いた予防的肝臓創傷モデルで *in vivo* 試験を実施した（2.2.1 項参照）。これらの試験において、**andexanet** のみが出血を抑制し、抗凝固マーカー（抗 FXa 活性、PT 及び aPTT）を回復させ、血漿中リバーロキサバンの非結合型濃度を減少させた。過去に実施された試験結果と一致して、リバーロキサバンの非結合型濃度の減少に伴い、総血漿中濃度は増加した。抗 FXa 活性の無効化及び出血量の減少に対する作用の持続時間は、**andexanet** の投与量及び **andexanet** 濃度と総リバーロキサバン濃度の化学量論比に依存した。これらの直接比較試験において、rFVIIa、3F-PCC 又は 4F-PCC による有意な無効化作用は認められなかった。

一連の試験において、肝臓創傷 30 分前にリバーロキサバン（1 mg/kg）をボーラス投与した抗凝固状態下の雄性 NZW ウサギにおいて、被験物質は各種用量及び溶媒又はリバーロキサバン投与後の様々な時間で、いずれも肝臓創傷前に投与した。溶媒対照群は抗凝固剤及びそれぞれの中和剤に対して設定した。**Andexanet**、rFVIIa（[NC-13-0561-R0001](#)）、3F-PCC（[NC-13-0561-R0001](#)）又は 4F-PCC（[NC-14-0573-R0001](#)）については、抗凝固剤投与 30 分後より、5 分間かけてボーラス投与した。肝臓は 10 ヶ所を 1 cm ずつ創傷し、重量測定済みのガーゼに 15 分間出血させた。経時的に採取した血液試料は、リバーロキサバンの血漿中総濃度及び非結合型濃度、**andexanet** の血漿中濃度、抗 FXa 活性、PT 及び aPTT の測定に用いた。

それぞれの試験において、リバーロキサバン投与群では非投与群と比較し肝臓創傷後の平均出血量が約 2~3 倍増加した。

Andexanet と 4F-PCC の比較

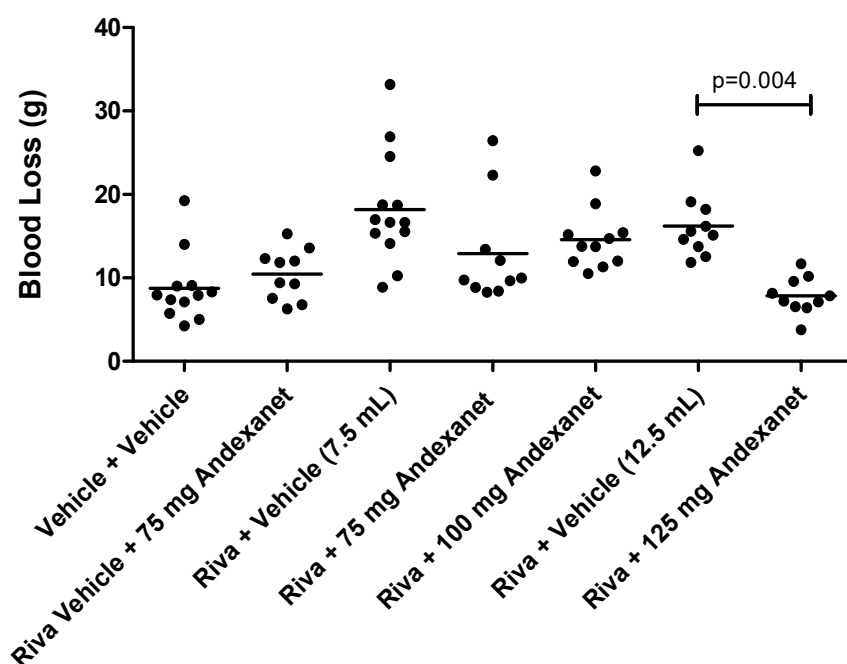
麻酔下の雄性 NZW ウサギ（約 3 ヶ月齢、各群 10~13 例）に溶媒（85% PEG300、8% H₂O、5% glycerin、2% DMSO）又はリバーロキサバン（1 mg/kg）をボーラス投与し、30 分経過後に溶媒（10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）又は **andexanet** を 5 分間かけて様々な用量でボーラス投与した。肝臓創傷後、重量測定済みのガーゼで 15 分間血液を採取し、出血量確定のために速やかに重量を測定した。その他のエンドポイントは、抗 FXa 活性、

2.6.2 薬理試験の概要文 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

PT、aPTT、血漿中リバーロキサバンの非結合型及び総濃度並びに血漿中 andexanet 濃度とした。Andexanet (75、100 又は 125 mg/例、5 分間かけてボラス投与) 又は 4F-PCC (25、50 又は 100 IU/kg、5 分間かけてボラス投与) をリバーロキサバン投与の抗凝固状態下のウサギに肝臓創傷直前に投与する予防的肝臓創傷モデルを用いて評価した (NC-14-0573-R0001)。リバーロキサバン投与群では非投与群に比べて、肝臓創傷後の平均出血量が約 2 倍増加した。本試験において、リバーロキサバン投与 30 分後のリバーロキサバンの平均血漿中濃度は約 500 ng/mL (1.1 μ mol/L) であり、健康被験者 (20 mg 錠) 及び合併症のない患者において FXa 阻害を示すリバーロキサバンの C_{max} より約 1.66 倍高かった⁹⁾。

抗凝固状態下のウサギにおいて、出血量の平均値は、125 mg の andexanet 投与により、リバーロキサバン+溶媒 (12.5 mL) 投与群の 16.22 ± 3.90 g から 7.86 ± 2.36 g に回復し ($P=0.004$)、この数値は溶媒単独群の非抗凝固状態下の動物での平均出血量 (8.75 ± 4.12 g) と同等であった (Figure 19)。出血量は、抗凝固状態下のウサギの 18.19 ± 6.64 g から、andexanet の 75 mg 投与群で平均 12.92 ± 6.33 g、100 mg 投与群で 14.58 ± 3.60 g まで回復したが、いずれも有意ではなかった [75 mg 投与群で $P=0.07$ 、100 mg 投与群で $P=0.12$ 、両群ともリバーロキサバン+溶媒 (7.5 mL) 投与群との比較]。

Figure 19: ウサギモデルにおける andexanet の予防的投与による用量依存的な出血量の減少



Riva = Rivaroxaban

Legend: Andexanet reversed the anticoagulant effect of rivaroxaban. An approximate 2-fold increase in blood loss was observed in rabbits treated with rivaroxaban + vehicle, vs. those treated with vehicle + vehicle. Andexanet (125 mg/rabbit) administration to anticoagulated rabbits significantly reduced mean blood loss ($p = 0.004$ vs. rivaroxaban + vehicle, 12.5 mL), while the reduction in blood loss was not significant at the lower doses (75 mg/rabbit or 100 mg/rabbit, $p = 0.07$ and $p = 0.12$ for the 75 mg or 100 mg andexanet, respectively, vs. rivaroxaban 1.0 mg/kg + vehicle).

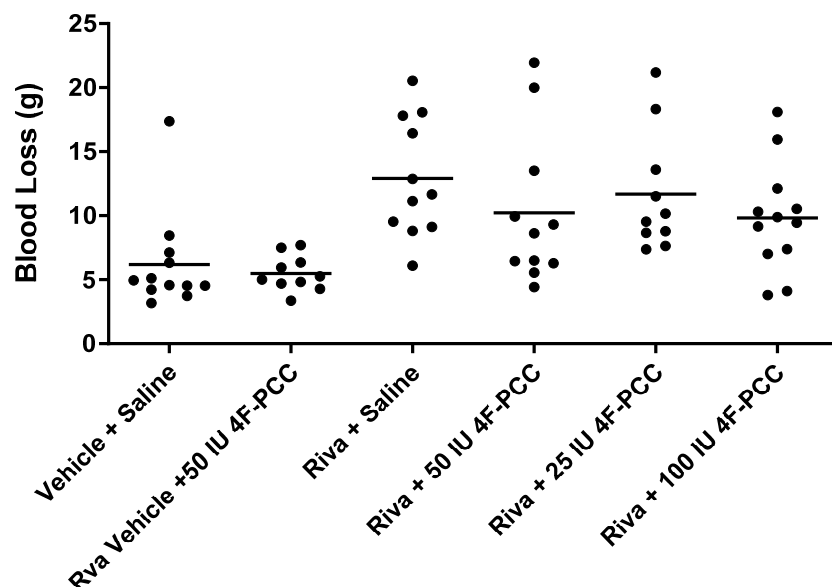
対照的に、4F-PCC の 25、50 又は 100 IU/kg 投与群では、リバーロキサバン + 生理食塩水投与群と比較した場合、平均出血量の有意な減少は認められなかった (Figure 20)。抗凝固状態下の動物において、出血量は、生理食塩水投与の溶媒対照群での 12.91 ± 4.63 g に対し、4F-PCC の 25、50

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

又は 100 IU/kg 投与群ではそれぞれ 11.67 ± 4.68 、 10.17 ± 5.89 及び 9.82 ± 4.21 g であり（いずれの 4F-PCC 投与群でも $P > 0.05$ ）、平均出血量は、4F-PCC の 25、50 又は 100 IU/kg 投与群で、抗凝固状態下の溶媒対照群より、それぞれ 10%、35%及び 40%減少した。

Figure 20: ウサギ肝臓創傷モデルにおける 4F-PCC の投与による出血量減少のわずかな影響

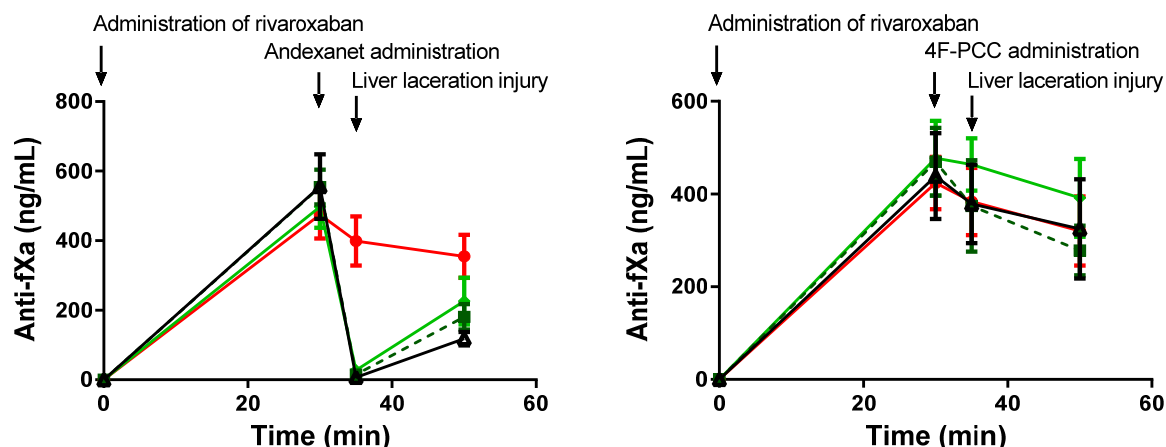


Riva = Rivaroxaban

Legend: 4F-PCC did not significantly reverse the anticoagulant effect of rivaroxaban. An approximate 2-fold increase in blood loss was observed in rabbits treated with rivaroxaban + vehicle, vs. those treated with vehicle + vehicle. Mean blood loss was 10%, 35%, and 40% lower in anticoagulated rabbits treated with 25, 50, or 100 IU/kg respectively, compared with rabbits treated with rivaroxaban ($p > 0.1$ all groups vs. rivaroxaban + saline vehicle).

Andexanet 投与により用量依存的に抗 FXa 活性が減少したが、4F-PCC 投与では抗 FXa 活性への影響は認められなかった (Figure 21)。抗 FXa 活性は、非抗凝固状態下のウサギではすべての時点で検出限界を下回ったが、リバーロキサバン投与のすべての群で andexanet 又は 4F-PCC の投与直前までに抗 FXa 活性の増加を認めた。Andexanet 投与前の抗 FXa 活性の平均値はすべての群で約 500 ng/mL であり、持続静脈内投与終了後、抗凝固状態下の動物の抗 FXa 活性は andexanet 75 mg 投与群で 28.0 ± 8.6 ng/mL、100 mg 投与群で 14.7 ± 3.1 ng/mL、125 mg 投与群で 6.8 ± 1.6 ng/mL と減少した。対照的に 4F-PCC 投与群においては、溶媒対照群と比較し、4F-PCC の 5 分間ボラス投与直後に測定した抗 FXa 活性への影響は認められなかった。

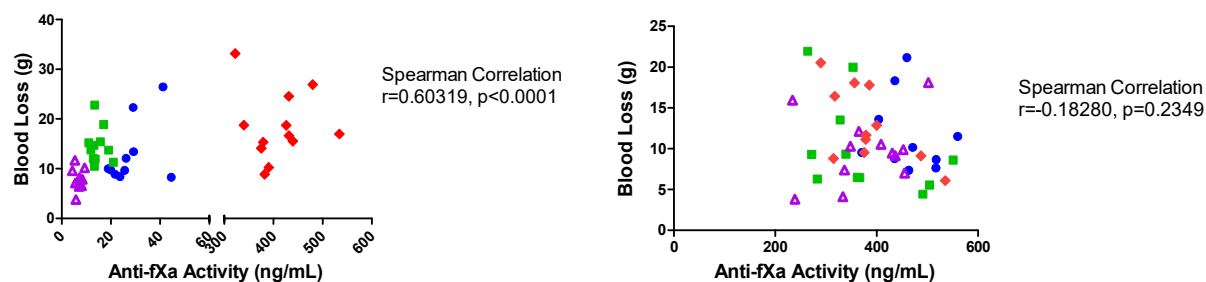
Figure 21: 抗凝固状態にあるウサギにおける抗 FXa 活性の andexanet 投与による減少



fXa = Factor Xa; 4F-PCC = Four-factor prothrombin complex concentrates; IU = International unit; IV = Intravenous
Legend: Anti-fXa activity was below the limit of quantitation prior to anticoagulant administration and increased significantly 30 minutes following rivaroxaban administration, at the time administration of either andexanet or 4F-PCC was initiated. At the beginning of the test agent administration, anti-fXa activity levels were similar for all groups.
Left Panel: After the 5 minute IV bolus administration of andexanet (35-minute time point), mean anti-fXa levels decreased significantly for all andexanet dose levels ($p < 0.0001$ vs. rivaroxaban alone). ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = Andexanet, 75 mg; ■ = Andexanet, 100 mg; △ = Andexanet, 125 mg
Right Panel: After the 5-minute IV bolus administration of 4F-PCC, mean anti-fXa levels were similar to those seen in animals anticoagulated with rivaroxaban ($p > 0.05$ all groups vs. rivaroxaban alone). Immediately following 4F-PCC administration, anti-fXa levels were 383.3 ± 72.7 , 463.6 ± 56.6 , 374.2 ± 98.3 , and 378.6 ± 84.7 ng/mL for the vehicle, 25 IU/kg, 50 IU/kg, and 100 IU/kg groups, respectively. ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = 4F-PCC, 25 IU/kg; ■ = 4F-PCC, 50 IU/kg; △ = 4F-PCC, 100 IU/kg

抗 FXa 活性の減少は、andexanet 投与ウサギにおいて出血量の減少と高い相関性を示したが (NC-14-0573-R0002)、抗 FXa 活性と 4F-PCC 投与時の出血量には相関性は認められなかった (Figure 22)。抗凝固状態下の動物において、andexanet 投与終了直後の抗 FXa 活性と総出血量 (15 分間回収) 間に統計学的有意な相関がみられた ($P < 0.0001$) (Figure 22)。Andexanet 投与群及び 4F-PCC 投与群 (又は溶媒投与群) を、以下のとおりそれぞれ別の色で示す。

Figure 22: Andexanet 及び 4F-PCC を投与したウサギでの出血量と抗 FXa 活性との相関性

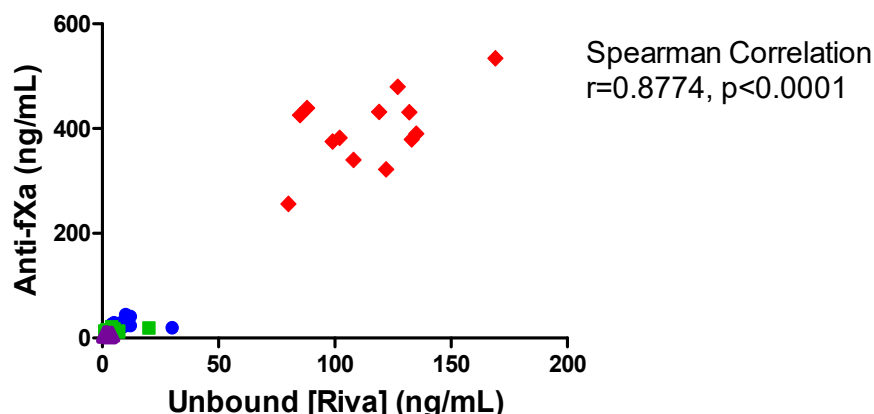


4F-PCC = Four-factor prothrombin complex concentrates; IU = International unit

Legend: Blood loss as a function of anti-fXa activity. Animals were administered rivaroxaban by IV bolus, and after 30 minutes to allow for distribution of rivaroxaban into the tissues, andexanet or 4F-PCC was infused IV over a period of 5 minutes. At the end of andexanet or 4F-PCC infusion, ten 1-cm lacerations were made in 2 lobes of the liver (5 lacerations in each lobe), and blood was collected for 15 minutes onto pre-weighed gauze. Individual rabbit blood loss was plotted vs. the anti-fXa activity at the end of andexanet administration (just prior to liver laceration). Blood loss was significantly correlated with anti-fXa activity in rabbits treated with andexanet ($p < 0.0001$) (*left graph*), with a meaningful correlation ($r=0.60319$) determined by Spearman analysis (SAS 9.3), and confirmed by Kendall's tau. No correlation exists between blood loss and anti-fXa activity in rabbits treated with 4F-PCC ($p = 0.2349$) (*right graph*). $\blacklozenge$ = rivaroxaban only; $\bullet$ = low dose of andexanet (75 mg/rabbit) or 4F-PCC (25 IU/mg); $\blacksquare$ = mid-dose of andexanet (100 mg/rabbit) or 4F-PCC (50 IU/kg); $\blacktriangle$ = high dose of andexanet (125 mg/rabbit) or 4F-PCC (100 IU/kg).

同様に、血漿中リバーロキサバンの平均非結合型濃度は、抗 FXa 活性と高い相関を示し ($r=0.8774$) (Figure 23)、andexanet 投与により両測定値は有意に減少した ($P<0.0001$) (NC-14-0573-R0001)。本解析は、4F-PCC を投与した動物については実施しなかった。

Figure 23: Andexanet 投与ウサギでの血漿中非結合型リバーロキサバン濃度と抗 FXa 活性の相関



fXa = Factor Xa; 4F-PCC = Four-factor prothrombin complex concentrates

Legend: Unbound plasma rivaroxaban levels as a function of anti-fXa activity. Animals were administered rivaroxaban by IV bolus, and after 30 minutes to allow for distribution of rivaroxaban into the tissues, andexanet or 4F-PCC was infused IV over a period of 5 minutes. At the end of andexanet infusion, ten 1-cm lacerations were made in 2 lobes of the liver (5 lacerations in each lobe), and blood was collected for 15 minutes onto pre-weighed gauze.

Individual rabbit blood loss was plotted vs. the anti-fXa activity at the end of andexanet administration (just prior to liver laceration). Blood loss was significantly correlated with anti-fXa activity in rabbits treated with andexanet ($p < 0.0001$), with a meaningful correlation ($r=0.8774$) determined by Spearman analysis (SAS 9.3)

◆ = rivaroxaban only; ● = low dose of andexanet (75 mg/rabbit); ■ = mid-dose of andexanet (100 mg/rabbit); ▲ = high dose of andexanet (125 mg/rabbit).

本試験で投与した andexanet のすべての用量 (75、100 及び 125 mg/例) で、リバーロキサバンの血漿中非結合型濃度はウサギにおけるリバーロキサバンの IC_{50} (21 nmol/L) を十分に下回り²⁾、andexanet の 5 分間ボラス投与直後の血漿中濃度の平均値は、それぞれ 10.4 ± 7.7 、 2.9 ± 1.9 及び 2.1 ± 1.1 ng/mL であった。対照的に、4F-PCC はいずれの投与濃度においても、リバーロキサバン単独投与群と比較して、リバーロキサバンの非結合型及び総濃度に明らかな影響はなかった (Figure 24)。

リバーロキサバン投与直後に andexanet を投与したウサギにおいて、リバーロキサバンの平均血漿中総濃度は増加し、約 11 μ mol/L で定常状態に達した。Andexanet の 75 mg 投与群では、5 分間ボラス投与でリバーロキサバンの血漿中総濃度は約 9 倍に増加した [475 ± 92 ng/mL (1.1 μ mol/L) から $4,330 \pm 429$ ng/mL (9.9 μ mol/L)]。同様に、andexanet の 100 mg 投与群では約 8 倍に増加した [andexanet 投与開始時点 (30 分時点) の 600 ± 95 ng/mL (1.4 μ mol/L) から、35 分時点で $5,026 \pm 369$ ng/mL (11.5 μ mol/L) 及び 50 分時点で $4,924 \pm 366$ ng/mL (11.3 μ mol/L)]。Andexanet の 125 mg 投与群では、リバーロキサバンの血漿中総濃度は約 9 倍に増加し [andexanet 投与開始時点 (30 分時点) の 521 ± 63 ng/mL (1.2 μ mol/L) から、35 分時点で $4,892 \pm 808$ ng/mL (11.2 μ mol/L) 及び 50 分時点で $4,958 \pm 802$ ng/mL (11.4 μ mol/L)]、リバーロキサバンの血管内への再分布は高用量の andexanet においても維持されることが示された。

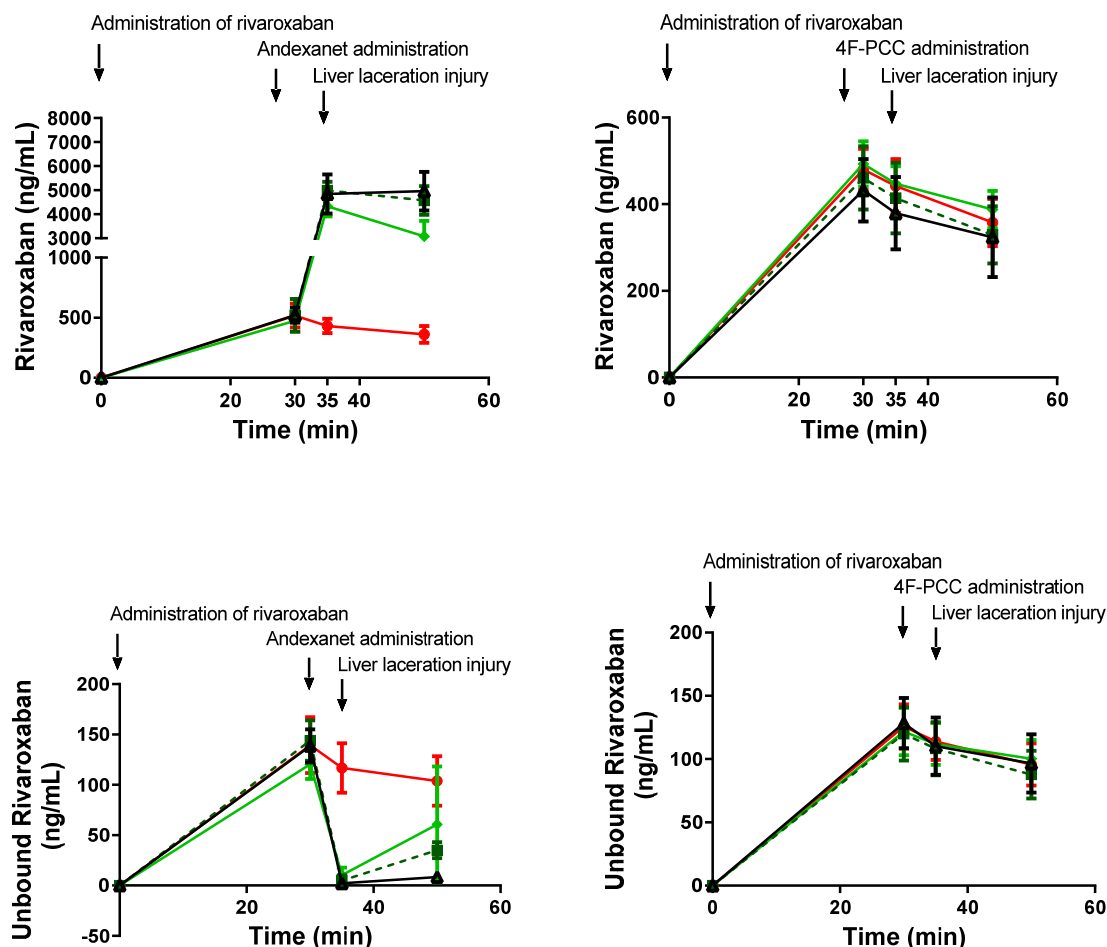
4F-PCC では、リバーロキサバン単独投与と比較して、本試験のいずれの時点及び投与量においてもリバーロキサバンの血漿中総濃度に明らかな影響は認められなかった。リバーロキサバンと生理食塩水又は 4F-PCC をいずれかの用量で投与した群において、リバーロキサバンの血漿中非結合型濃度は、4F-PCC 投与開始時点ではほぼ同じであり、それぞれの群で平均約 120 ng/mL であった。4F-PCC (又は溶媒) 投与直後の血漿中リバーロキサバン非結合型濃度はリバーロキサバン+

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

生理食塩水投与群の 114 ± 36 ng/mL から、25、50 及び 100 IU/kg の 4F-PCC 投与群でそれぞれ 112 ± 16.6 、 108 ± 21.1 及び 105 ± 25.4 ng/mL に減少した（いずれの 4F-PCC 投与群でも $P > 0.05$ ）。15 分間出血後の試験終了時点で、リバーロキサバン非結合型濃度の平均値は約 90～100 ng/mL まで減少した。

Figure 24: Andexanet 投与による血漿中リバーロキサバンの総濃度の増加及び非結合型濃度の減少



4F-PCC = Four-factor prothrombin complex concentrates; LC/MS/MS = Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Legend: Andexanet increased total rivaroxaban as unbound rivaroxaban decreased. Kcentra (4F-PCC) did not alter mean plasma rivaroxaban. Total rivaroxaban was determined by LC/MS/MS and unbound rivaroxaban was determined by equilibrium dialysis.

Upper Left: At the end of the IV bolus administration of andexanet (from 30-35 minutes), the mean total rivaroxaban concentrations increased in a dose-dependent manner. The increase in total rivaroxaban plasma concentrations is due its high affinity binding to andexanet, which shifts the distribution of fXa inhibitor from the peripheral compartment into the intravascular compartment.

● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = Andexanet, 75 mg; ■ = Andexanet, 100 mg; △ = Andexanet, 125 mg.

Upper Right: 4F-PCC has no effect on reducing the total rivaroxaban concentration, compared with group treated with rivaroxaban alone. ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = 4F-PCC, 25 IU/kg; ■ = 4F-PCC, 50 IU/kg; △ = 4F-PCC, 100 IU/kg.

Bottom Left: A rapid dose-dependent decrease in unbound rivaroxaban plasma concentration was observed following andexanet administration (from 30-35 minutes). The decrease in unbound rivaroxaban plasma concentration is a reliable indicator of sequestration of circulating rivaroxaban and reversal of anticoagulation. The reduction in unbound rivaroxaban was maintained throughout the 15-minute blood loss period at the higher doses of andexanet (100 and 125 mg/rabbit).

● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = Andexanet, 75 mg; ■ = Andexanet, 100 mg; △ = Andexanet, 125 mg.

Bottom Right: 4F-PCC administration did not alter unbound rivaroxaban levels, relative to the rivaroxaban levels seen in rabbits administered anticoagulant-plus-saline vehicle. ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = 4F-PCC, 25 IU/kg; ■ = 4F-PCC, 50 IU/kg; △ = 4F-PCC, 100 IU/kg.

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Andexanet の 5 分間ボラス投与終了時点での平均血漿中濃度は、75 mg 投与群（溶媒+andexanet 群又はリバーロキサバン+andexanet 群）で約 400～500 µg/mL（約 11 µmol/L）であった。15 分間の出血時間終了時点での、andexanet の平均血漿中濃度は 75 mg 投与群で約 1/2 の 200～300 µg/mL（約 7 µmol/L）に減少した。Andexanet の投与量の増加に伴い、andexanet の血漿中濃度は比例して増加した。Andexanet の 100 mg 又は 125 mg 投与群においては、5 分間ボラス投与終了後の andexanet の平均濃度は約 17～20 µmol/L であり、出血時間終了時点では約 11～12 µmol/L に減少した（Table 2）。

Table 2: ウサギにおけるリバーロキサバンによる抗凝固作用の有無別の血漿中 andexanet の平均濃度

Group/Dose	AnXa µg/mL (µM) End of AnXa Administration	Molar Ratio AnXa/Total Rivaroxaban	AnXa µg/mL (µM) Study Termination	Molar Ratio AnXa/Total Rivaroxaban
Riva/ Andexanet 75 mg/rabbit	465.9 ± 51.3 (11.4)	1.15	282.3 ± 52.5 (6.9)	0.97
Riva/ Andexanet 100 mg/rabbit	669.7 ± 109.0 (17.1)	1.49	437.2 ± 66.4 (10.7)	0.95
Riva/ Andexanet 125 mg/rabbit	802.6 ± 98.0 (19.6)	1.75	498.6 ± 81.1 (12.2)	1.1
Vehicle (no Riva) Andexanet 75 mg/rabbit	483.9 ± 29.8 (11.8)	NA	270.1 ± 52.0 (6.6)	NA

IV = Intravenous; µM = Micromolar; NA = Not applicable; Riva = Rivaroxaban; SD = Standard deviation

Notes: Rivaroxaban was administered IV at 1.0 mg/kg. Andexanet was administered just prior to liver injury by IV infusion over 5 minutes (from 30 to 35 minutes). Data are shown for the 35-minute time point (end of andexanet administration), and the 50-minute time point (end of the study and blood collection period). Andexanet concentrations are expressed as mean concentration ± SD (µg/mL) or as mean molarity (µM).

血漿中の総リバーロキサバン濃度に対する Andexanet 濃度のモル比が約 1.5:1 のとき、非結合型リバーロキサバン濃度の平均値は 2.9±1.9 ng/mL（andexanet 100 mg 投与）まで減少したが、高用量の andexanet 投与（125 mg）では、非結合型リバーロキサバン濃度は 2.1±1.1 ng/mL まで減少し、andexanet 投与直後にこのモル比は 1.8:1 まで増加したが、両群で統計学的有意差は認めなかった。特に andexanet の高用量群では、非結合型リバーロキサバン濃度は出血時間終了時点まで低く推移し、血漿中濃度は 8.5±3.4 ng/mL であった。これに対し、andexanet 100 mg 投与群における平均血漿中濃度は約 30 ng/mL であった。以上より、andexanet は最初に血管内の抗凝固剤に結合するが、組織から血管内に再分布してくる抗凝固剤に対しても結合するため、andexanet が血漿中に抗凝固剤に比べ過剰なモル比で存在することの重要性が示された。

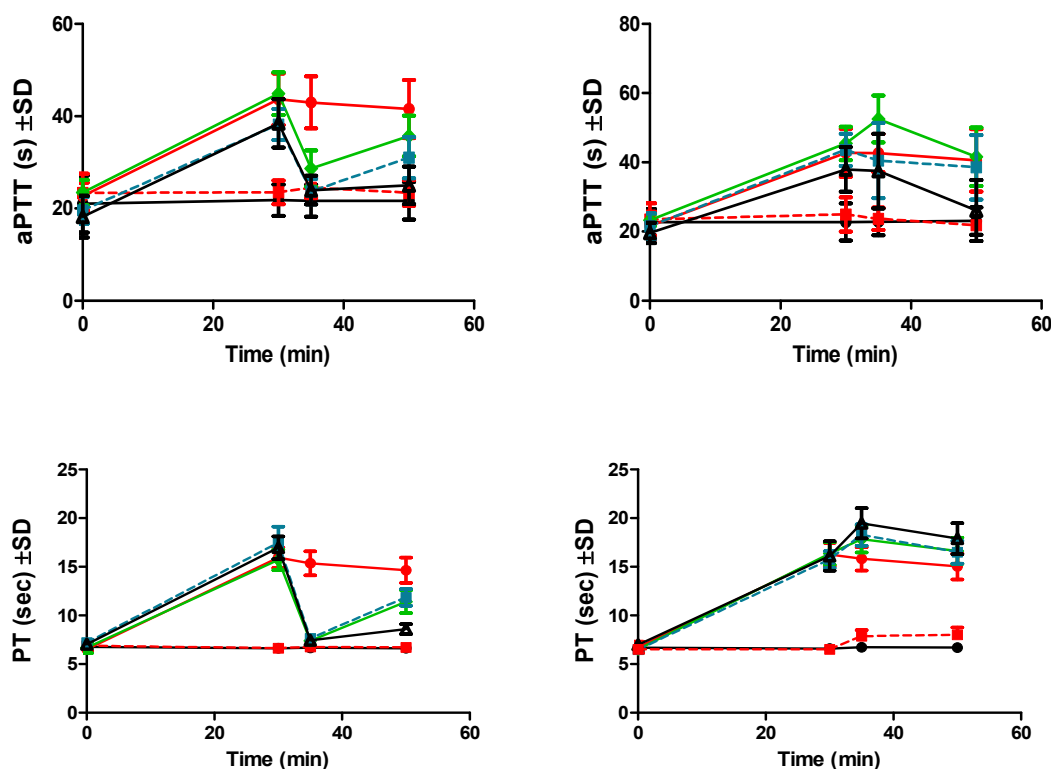
PT 及び aPTT はすべての採血時点で測定した（Figure 25）。PT はリバーロキサバン投与により約 2～3 倍延長した。Andexanet 投与により PT 延長は顕著に短縮され、高用量群（125 mg）ではベースラインまで完全に回復し、この作用は 15 分間の出血評価期間を通じて維持された。PT 延長の用量依存的回復がみられ、andexanet の 75 mg 及び 100 mg 投与群ではベースラインレベルまで回復したが、低用量群では回復は維持されなかった。同様に、aPTT 延長も用量依存的に回復し

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

た。対照的に、4F-PCC の投与では、抗凝固状態下のウサギに高用量投与（100 IU/kg）した群でのみ aPTT のベースラインレベルまでの回復が認められ、その他の群では PT 及び aPTT 延長のいずれの回復も認められなかった。

Figure 25: リバーロキサバン投与による PT 及び aPTT 延長の andexanet 投与による回復



Legend: PT (top panels) and aPTT (bottom panels) were prolonged following anticoagulation with rivaroxaban.

Left Panels: Andexanet treatment dose-dependently reduced both PT and aPTT prolongation, and the high dose of andexanet (125 mg) corrected PT to baseline levels, which were maintained throughout the 15 minute blood loss period. PT was measured using PT-fibrinogen (HemosIL). ● = Vehicle alone; ■ dashed line = Andexanet (75 mg/rabbit) alone; ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = Andexanet, 75 mg; ■ = Andexanet, 100 mg; △ = Andexanet, 125 mg.

Right Panels: Kcentra (4F-PCC; 100 IU/kg) decreased aPTT by the end of the study period (50 min). aPTT was measured using SynthASil (HemosIL). ● = Vehicle alone; ■ dashed line = 4F-PCC (50 IU/kg) alone; ● = Rivaroxaban, (1 mg/kg); ◆ = 4F-PCC, 25 IU/kg; ■ = 4F-PCC, 50 IU/kg; △ = 4F-PCC, 100 IU/kg.

Andexanet と rFVIIa 又は 3F-PCC の比較

強力な凝固促進剤及び一般的な止血剤として承認されている rFVIIa は、血友病患者又は FVIIa 欠損患者の出血の治療薬として開発され、3F-PCC は、ワルファリンの抗凝固作用による出血亢進患者の治療薬として開発された。これらの薬剤は、直接作用型 FXa 阻害剤により抗凝固状態にある患者の出血治療のための使用が推奨されている。本試験では、ウサギ肝臓創傷モデルにおいて、andexanet の作用を rFVIIa (150 µg/kg) 又は 3F-PCC (60 IU/kg) 投与群と比較した (NC-13-0561-R0001 及び NC-13-0561-R0002)。麻酔下雄性 NZW ウサギ (約 3 ヶ月齢、各群 6~12 例) に溶媒 (85% PEG300、8% H₂O、5% glycerin、2% DMSO) 又はリバーロキサバン (1 mg/kg) をボーラス投与し、30 分経過後に 5 分間かけて溶媒 (andexanet : 10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80 ; rFVIIa : histidine 溶解液 ; 3F-PCC : 蒸留水) 又は andexanet (75 mg/例)、rFVIIa (150 µg/kg) 又は 3F-PCC (60 IU/kg) をボーラス投与した。肝臓創傷後、重量測定済

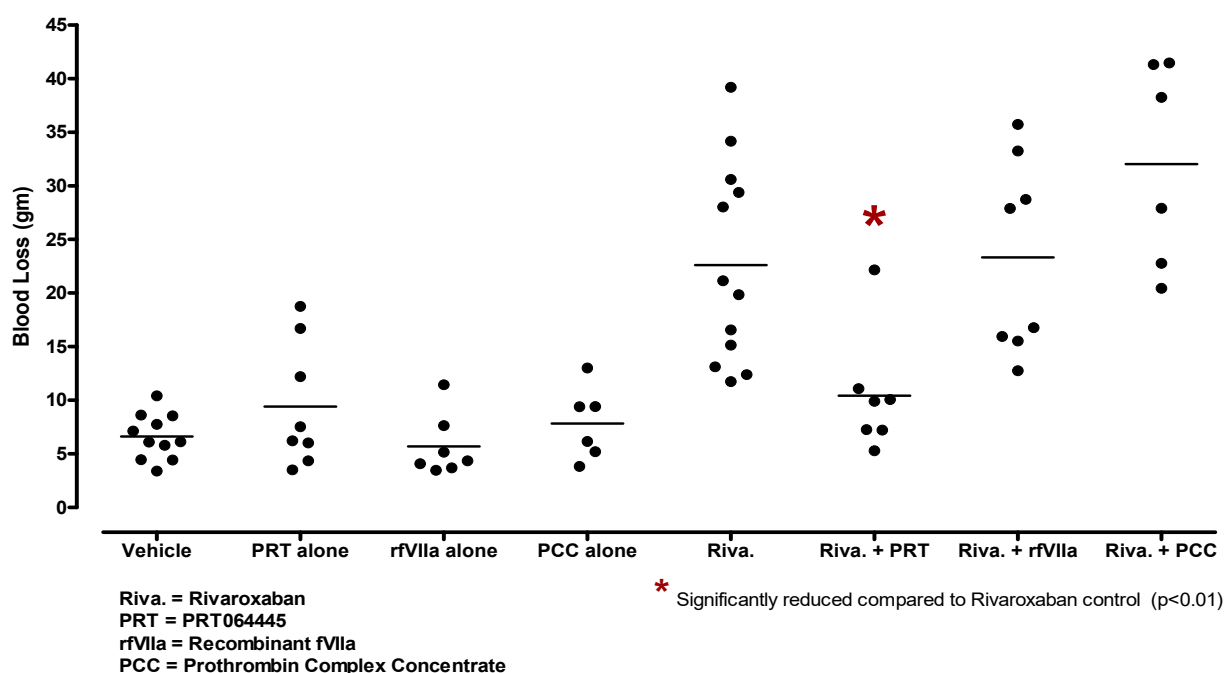
2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

みのガーゼで 15 分間血液を採取し、採取後速やかに出血量を測定した。その他のエンドポイントは、抗 FXa 活性、PT、aPTT、血漿中リバーロキサバンの非結合型及び総濃度並びに血漿中 andexanet 濃度とした。

平均出血量に対する有意な影響は、3F-PCC 又は rFVIIa をリバーロキサバン投与の抗凝固状態下のウサギに投与した場合には認められなかった（Figure 26）。抗凝固状態下のウサギでの andexanet の 5 分間ボラス投与では、出血量の平均値がリバーロキサバン単独投与群の 22.67 ± 9.32 g から 10.43 ± 5.56 g に有意に減少した（ $P < 0.01$ ）。対照的に、rFVIIa 又は 3F-PCC のいずれかを投与したウサギの出血量は、それぞれ 23.33 ± 9.05 g 又は 31.90 ± 9.57 g であった（それぞれ $P = 0.88$ 及び $P = 0.07$ ）。

Figure 26: 抗凝固状態下のウサギでの andexanet、rFVIIa 及び 3F-PCC による出血量の変化

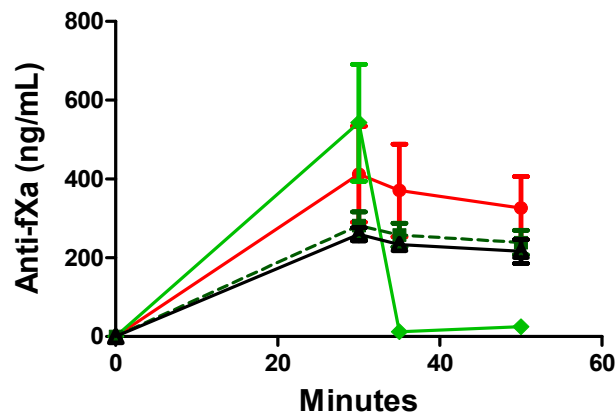


PCC = Bebulin, a 3-factor prothrombin complex concentrate; PRT = Andexanet

Legend: Administration of rivaroxaban increased mean blood loss ~3-fold. In the absence of rivaroxaban, administration of andexanet, rFVIIa or PCC alone did not affect blood loss. Prophylactic administration of andexanet (75 mg/rabbit) significantly reduced blood loss ($p < 0.01$ vs. rivaroxaban alone). Administration of rFVIIa (150 µg/kg NovoSeven) or PCC (60 IU/kg Bebulin) in rivaroxaban-anticoagulated rabbits had no effect on blood loss.

抗 FXa 活性は andexanet 投与群のみで減少し、rFVIIa 又は 3F-PCC 投与群での減少は認められなかった（Figure 27）。抗 FXa 活性は andexanet 投与群を除いて試験期間を通じて各群内でほぼ一貫した推移を示した。Andexanet 投与群での抗 FXa 活性のピーク値は、投与前と比較し有意に減少した（ $P < 0.0001$ ）（Figure 27）。この減少は 50 分時点まで持続した。リバーロキサバンの抗凝固作用により増加した抗 FXa 活性は、rFVIIa 又は Bebulin 投与群においては、投与前又はリバーロキサバン単独投与群と比較して顕著な変化はなかった。

Figure 27: リバーロキサバンにより誘導される抗 FXa 活性に対する andexanet、rFVIIa 及び Bebulin 投与の影響



fXa = Factor Xa; rFVIIa = Recombinant factor VIIa
Legend: Anti-fXa activity increased significantly 30 minutes following rivaroxaban and was rapidly reduced at the end of andexanet administration (at the time liver injury was induced), while neither rFVIIa nor Bebulin reduced anti-fXa in anticoagulated rabbits.
 ● = rivaroxaban + vehicle, (1 mg/kg); ◆ = rivaroxaban + andexanet, 75 mg;
 ■ = rivaroxaban + rFVIIa (150 µg/kg NovoSeven); ▲ = rivaroxaban + PCC (60 IU/kg Bebulin).

PT 及び aPTT も採血したすべての時点で測定した。Andexanet を投与したウサギにおいて、リバーロキサバン投与で誘導した抗凝固作用による PT 及び aPTT 延長は、それぞれ 74%及び 66% 短縮された (NC-13-0561-R0001)。対照的に、rFVIIa 投与では出血量に影響は認めなかったが、PT は 85%、aPTT は 54%短縮された。PCC 投与では PT 又は aPTT への影響は限定的であった。リバーロキサバンの非結合型及び総血漿中濃度に rFVIIa 又は Bebulin 投与による影響は認められなかった。

要約すると、rFVIIa、3F-PCC 及び 4F-PCC の投与は、出血量、抗 FXa 活性又はリバーロキサバンの血漿中非結合型濃度に影響を及ぼさなかった。これらのデータは、これらの *in vivo* モデルにおける andexanet の有効性は主に andexanet による抗凝固剤の捕捉に起因するものであり、andexanet の作用機序は rFVIIa、3F-PCC 又は 4F-PCC とは異なっており、直接作用型 FXa 阻害剤による抗凝固状態の無効化は、抗凝固療法を受けている患者の急性出血時に血液凝固因子を補充するよりも有益である可能性が高いと考えられた。

3 副次的薬理試験

3.1 *In vitro* 試験

In vitro 試験では以下の結果が示された。

- Andexanet は、ATIII 依存性阻害剤（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）に高い結合親和性を示した。
- Andexanet は、組織因子経路インヒビター（TFPI）を除き、主要な血漿中凝固関連タンパクとの顕著な相互作用は示さなかった。Andexanet-TFPI 間相互作用は、FXa 阻害剤非存在下での IIa 産生にはほとんど影響を及ぼさなかった。ただし、andexanet の TFPI への結合により、FXa 阻害剤存在下での IIa 産生阻害に対する無効化が亢進した。
- Andexanet は、FXa のペプチジル基質又は FXa の生理的基質であるプロトロンビン及び血液凝固第 VII 因子（FVII）に対する触媒活性は示さなかった。細胞アッセイで、andexanet はヒトの血小板、白血球又は内皮細胞を活性化しなかった。

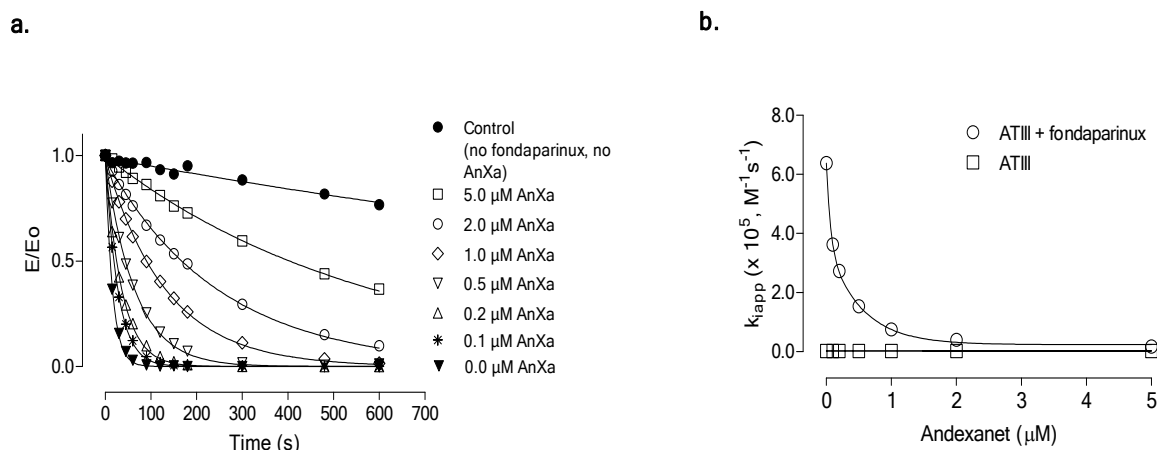
3.1.1 Andexanet の ATIII 依存性阻害剤との結合性

Andexanet と ATIII 依存性阻害剤との相互作用

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等の間接作用型 FXa 阻害剤は、ATIII と結合することで抗 FXa 活性を発揮する。Andexanet はその結合部位が内在性 FXa と類似することから、ATIII-ヘパリン（H）複合体（H はフォンダパリヌクス又はエノキサパリン）への結合能を持つ。フォンダパリヌクスを代表的な ATIII 依存性 FXa 阻害剤として用い、精製ヒト FXa 及び ATIII を用いた液相評価系（20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 5 mmol/L Ca²⁺）においてフォンダパリヌクスの有無条件下（0～100 nmol/L）で andexanet（0～5.0 µmol/L）の影響を評価した（NC-12-0455-R0001）⁶⁾。

予測されたとおり、andexanet は ATIII-フォンダパリヌクス複合体に選択的に結合し、用量依存的に FXa 阻害活性を無効化したが、ATIII のみによる FXa 阻害にはほとんど影響しなかった（Figure 28）。阻害活性の経時変化曲線による解析から、andexanet/ATIII-フォンダパリヌクス複合体の解離定数は 53 nmol/L であった。

Figure 28: ATIII-フォンダパリヌクスによる FXa 阻害に対する andexanet の影響



AnXa = Andexanet; ATIII = Antithrombin III; FXa = Factor Xa; K_d = Binding constant; K_i = Inhibition constant

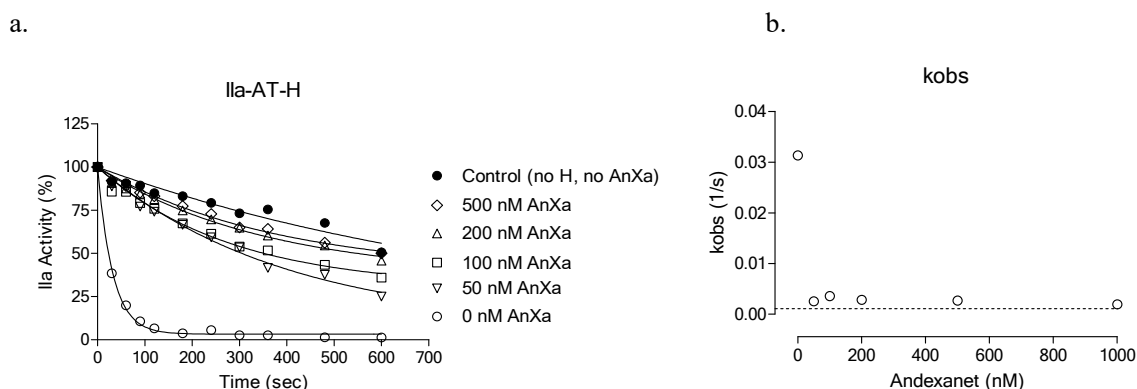
Legend: Kinetics of FXa inhibition by ATIII and the ATIII-fondaparinux complex were carried out under pseudo-first order reaction conditions. For FXa inhibition by ATIII in the absence of fondaparinux, ATIII concentration exceeded the FXa concentration in the FXa+ATIII reaction. In reactions containing fondaparinux, a limiting amount of fondaparinux was mixed with saturating ATIII concentrations. Both ATIII and fondaparinux concentrations used were over the reported K_d for the ATIII-fondaparinux complex formation ($K_d = 32$ nM)⁷. The reaction mixtures contained human FXa (20 nM), human ATIII (200 nM), and fondaparinux (100 nM) along with different concentrations of andexanet (AnXa) in tris-buffered saline containing Ca^{2+} (5 mM). Following initiation of the reaction, 10 μL of reaction mixture were removed at various time points and assayed for residual FXa activity by measuring Spectrozyme-fXa cleavage. FXa activity was normalised by comparing it to the activity at $t=0$ before addition of either fondaparinux or ATIII (E/Eo).

a. Reversal of inhibition of FXa activity was measured in the presence of different concentrations of andexanet. The solid lines represent the non-linear fitting of the experimental data with a single exponential decay function. An apparent association rate constant (kobs) for the reaction was calculated with different concentrations of andexanet. In the absence of fondaparinux, andexanet had minimal effect on the inhibition of FXa by ATIII (data not shown).

b. Effect of andexanet on the kinetic parameter kiapp, the apparent second order rate constant for FXa inhibition by the ATIII-fondaparinux complex or ATIII alone. kiapp was defined as kobs divided by the total concentration of ATIII-fondaparinux complex (equal to the limiting reagent, 100 nM fondaparinux) or ATIII in the reaction mixture. Kinetic parameters of the series of ATIII-fondaparinux and andexanet reactions were further analysed by Dynafit software to yield K_d for andexanet to ATIII-fondaparinux complex.

同様の実験では、ヘパリン (0.02 IU/mL, ~13 nmol/L) と IIa (20 nmol/L) 及び ATIII (200 nmol/L) を用いた *in vitro* 液相評価系 (20mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 5mmol/L Ca^{2+}) において andexanet (0~1000 nmol/L) の抗 IIa 活性への影響を評価した (NC-16-0738-R0001)。その結果、andexanet による抗 IIa 活性の無効化が示された。Figure 29 に示すように、andexanet は ATIII-ヘパリン複合体による IIa 阻害を無効化した。

Figure 29: 液相における andexanet による ATIII-ヘパリンの IIa 阻害の無効化



AnXa = Andexanet; AT = Antithrombin III; H = Heparin; IIa-AT-H = Thrombin-antithrombin III-heparin; kobs = Apparent second order rate constant

Legend: Inhibition of IIa activity was measured in a buffered solution containing IIa (20 nM), ATIII (200 nM) and heparin (0.02 IU/mL, ~13 nM), and andexanet (0 ~ 1000 nM). At different time points, a small aliquot of the reaction mixture was taken and quenched into a 96-well plate containing protamine (50 µg/mL) and a IIa chromogenic substrate (S2238, 100 µM). Residual IIa activity was measured in a plate reader by monitoring the initial rate of substrate cleavage at 405 nm.

- a. Time-course of IIa inhibition by ATIII-heparin. Residual IIa activity at different time points was normalized to starting IIa at $t=0$.
- b. Effect of andexanet on the apparent second order rate constant (kobs). The apparent second order rate constant (kobs) was calculated by fitting the time-course curves with a one-phase exponential decay function. Dashed line represents the kobs in the absence of heparin.

3.1.2 ヒト血漿中での ATIII 依存性阻害剤による抗 FXa 活性の無効化

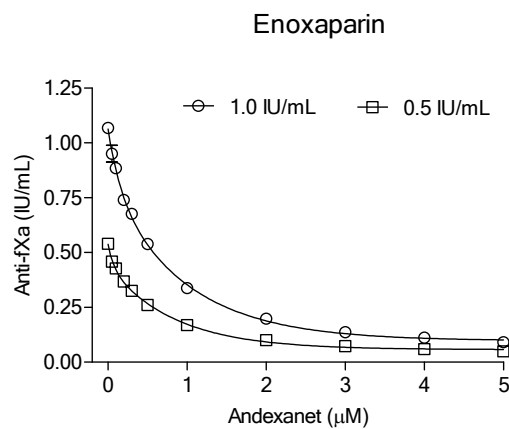
2.1.2 項と同様のアッセイにおいて、Andexanet (0~5.0 µmol/L) はヒト血漿中でのエノキサパリン (0.5 IU/mL、1.0 IU/mL、Figure 30a) 及びフォンダパリヌクス (1.0 µg/mL) 等の間接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 活性も用量依存的に無効化した (NC-12-0434-R0002)。

エノキサパリンは抗 IIa 活性に比して抗 FXa 活性が高い (3.9 以上) が、ヒト血漿を用いた抗 IIa 活性発色アッセイ (N=2) において、andexanet (0~5.0 µmol/L) はエノキサパリン (2.0 IU/mL) の抗 IIa 活性 (Figure 30b) も用量依存的に無効化した (NC-16-0738-R0001)。

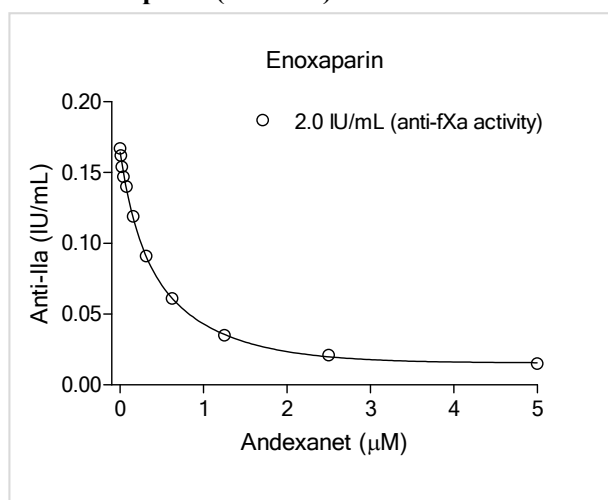
また、andexanet は、ATIII 依存性間接作用型阻害剤 (フォンダパリヌクス及びエノキサパリン等) の抗 FXa 活性及び抗 IIa 活性の両方を無効化することができる。対照的に、プロタミン (0~20 µg/mL) は長鎖ヘパリンを無効化するものの、エノキサパリンの抗 FXa 活性に関しては約 60% しか無効化することができなかった。Andexanet による ATIII 依存性阻害剤の無効化の作用機序は、ヘパリンに直接結合するプロタミンなどの他の正電荷分子とは異なっている。

Figure 30: ヒト血漿中での間接作用型 FXa 阻害剤の抗 FXa 活性の andexanet による無効化

a. Enoxaparin (Anti-fXa)



b. Enoxaparin (Anti-IIa)



FXa = Factor Xa; IU = International unit

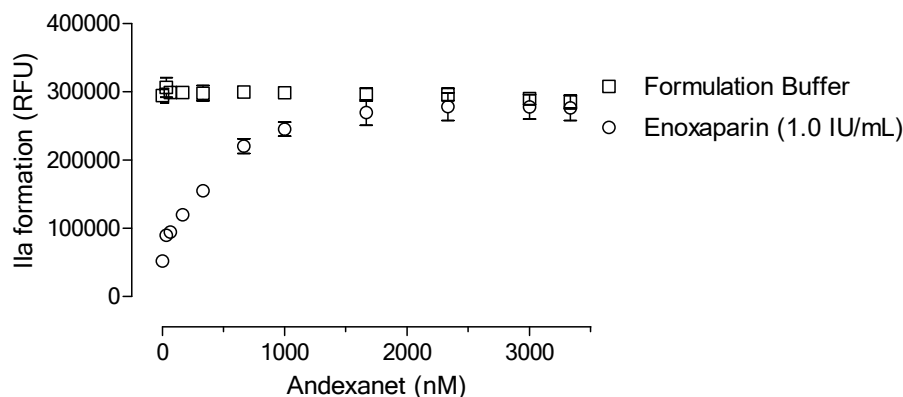
Legend: The plasma samples contained a fixed concentration of a FXa inhibitor and increasing concentrations of andexanet. Following pre-incubation, residual anti-fXa or anti-IIa activity was measured and expressed as ng/mL for direct FXa inhibitors and IU/mL for the indirect FXa inhibitor enoxaparin.

- 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.
- 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.

3.1.3 ヒト血漿中での IIa 産生の回復

2.1.3 項と同様のヒト血漿を用いた社内 IIa 産生アッセイにおいて、andexanet (0~3.3 μmol/L) は ATIII 依存性間接作用型 FXa 阻害剤であるエノキサパリン (1.0 IU/mL、Figure 31、N=2) 及び フォンダパリヌクス (1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、Figure 32、N=2~4) による IIa 産生阻害も用量依存 的かつ完全に無効化した (NC-12-0458-R0001)。

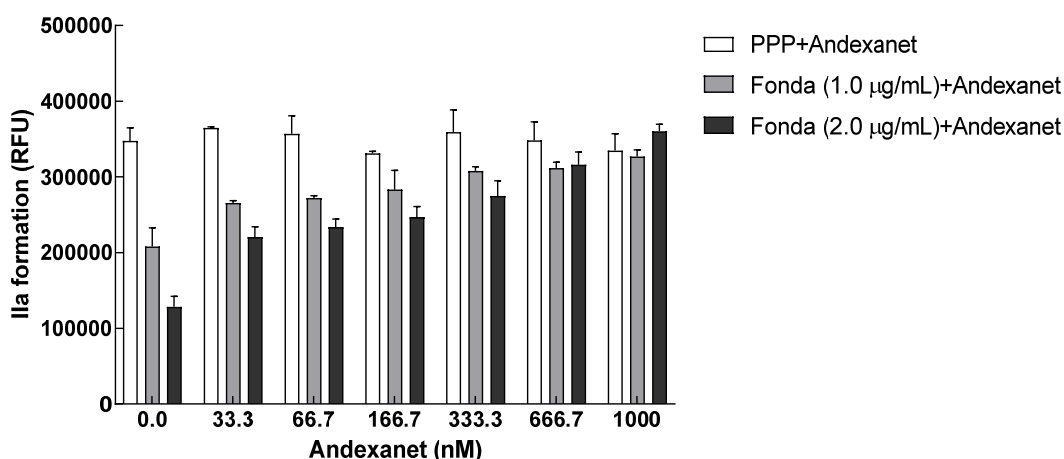
Figure 31: ヒト血漿中における間接作用型 FXa 阻害剤エノキサパリンの IIa 産生阻害の andexanet による用量依存的無効化



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.

Figure 32: ヒト血漿中における治療用量 (1 µg/mL) 又は治療用量を超える用量 (2 µg/mL) のフォンダパリヌクスの IIa 産生阻害に対する andexanet の影響



Fonda = Fondaparinux; RFU = Relative fluorescence unit; PPP = Platelet poor plasma

Legend: Reversal of indirect FXa inhibitor fondaparinux (Fonda)-induced inhibition of thrombin generation was performed in human plasma using an in-house assay. Therapeutic (1 µg/mL) or supratherapeutic (2 µg/mL) concentration of fondaparinux 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 fondaparinux.

最後に、TF-CAT アッセイを用いたフォローアップ試験 (N=2、溶媒: PPP-reagent、5 pmol/L TF/4.0 µmol/L phospholipid) において、正常血漿又は血液凝固第 IX 因子 (FIX) 枯渇血漿での TF 誘導性 IIa 産生プロファイルに対する間接作用型 FXa 阻害剤 (エノキサパリン: 0~1.0 IU/mL、フォンダパリヌクス: 0~2.0 µg/mL) の影響を評価し、直接作用型 FXa 阻害剤 (リバーロキサバン: 0~2.0 µmol/L、アピキサバン: 0~1.0 µmol/L) と比較した (RPD-000594)。

エドキサバンによる IIa 産生プロファイル (Figure 4) と同様に、リバーロキサバン及びアピキサバンは、IIa ピーク値の抑制及び広域化を引き起こし、5 つの CAT パラメータすべてを阻害し

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

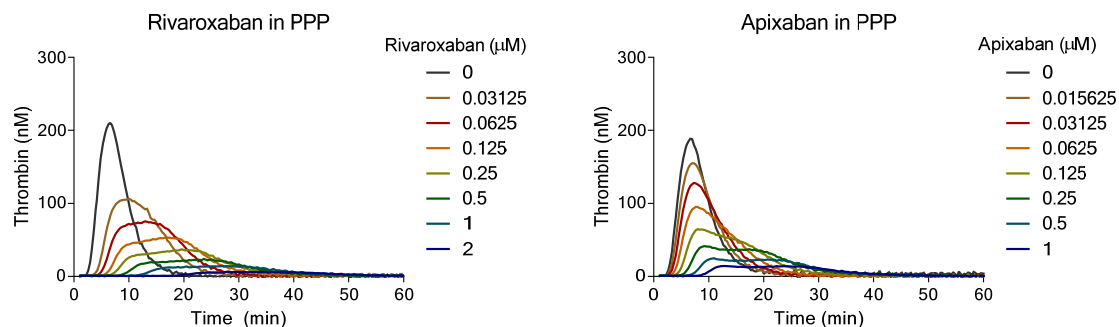
た（Figure 33、パネル a）。ATIII 依存性の純粋な FXa 阻害剤であるフォンダパリヌクスは、直接作用型 FXa 阻害剤と同様の IIa 産生プロファイルを示した。逆に、エノキサパリンは主に IIa ピーク値の抑制を引き起こし、ETP、Peak 及び Velocity Index（VelIndex）を阻害したが、ラグタイム又は Time-to-peak（ttPeak）に対する影響は小さかった（Figure 33、パネル b）。

正常血漿を用い、エノキサパリン又はフォンダパリヌクスの存在下及び非存在下において、CAT プロファイルに対する andexanet（0～4.0 $\mu\text{mol/L}$ ）による無効化の影響を評価した（Figure 34）。エノキサパリン（1.25 IU/mL）及びフォンダパリヌクス（2.0 $\mu\text{g/mL}$ ）は、臨床的に妥当な濃度において、IIa 産生を完全に又はほぼ完全に阻害した。Andexanet は、エノキサパリン（1.25 IU/mL）誘導性の抗凝固作用を用量依存的かつ完全に無効化した（ETP 及び IIa ピーク値により評価）。同様に、andexanet はフォンダパリヌクス（2 $\mu\text{g/mL}$ ）誘導性の抗凝固作用を用量依存的に無効化したが、IIa ピーク値はエノキサパリンと比較してはるかに広域であった。結果として、andexanet は IIa ピーク値に対するフォンダパリヌクス誘導性の阻害を対照血漿のベースライン値にまで回復させたが、ETP は対照血漿のベースライン値を上回る値にまで増加した（Figure 35）。

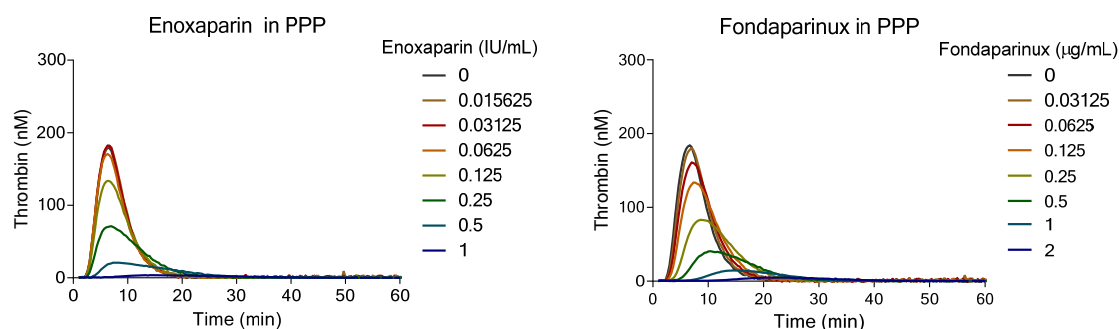
TF-TGA（RFU）アッセイによるヒト血漿を用いた過去の *in vitro* 試験と一致して、TF-CAT アッセイによる本試験においても、andexanet は ATIII 依存性 FXa 阻害剤を無効化することが確認された。*In vitro* での添加試料と比較して *in vivo* では抗 IIa 活性に対する抗 FXa 活性比が高い可能性があり、*in vivo* 又は臨床試験で採取したエノキサパリン試料の分析に TF-CAT アッセイを使用する場合には、エノキサパリン及びフォンダパリヌクスに対する andexanet の影響が異なっていた点に注意する必要がある。また、*in vitro* 試験及び健康被験者での *ex vivo* 試験においては、*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 33: 正常血漿における TF-CAT プロファイルに対する FXa 阻害剤の影響

a. Direct FXa inhibitors (rivaroxaban and apixaban)



b. ATIII-dependent FXa inhibitors (enoxaparin and fondaparinux)



CAT = Calibrated automated thrombogram; TF = Tissue factor; PPP = Platelet poor plasma

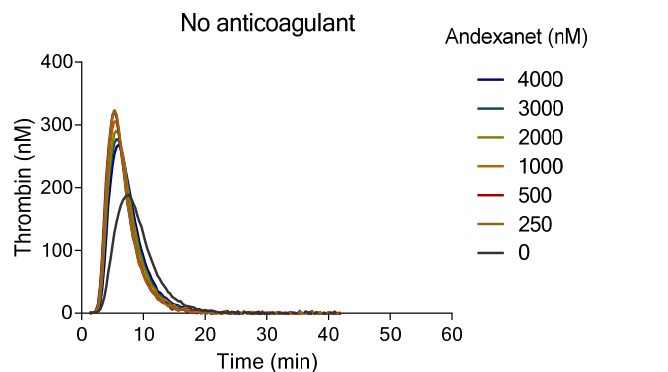
Legend: The TF-CAT experiments were performed using the PPP-reagent (5 pM TF/4.0 μM phospholipid) and the pooled plasma spiked with different FXa inhibitors.

a. Direct FXa inhibitors: rivaroxaban (0 – 2.0 μM), apixaban (0 – 1.0 μM).

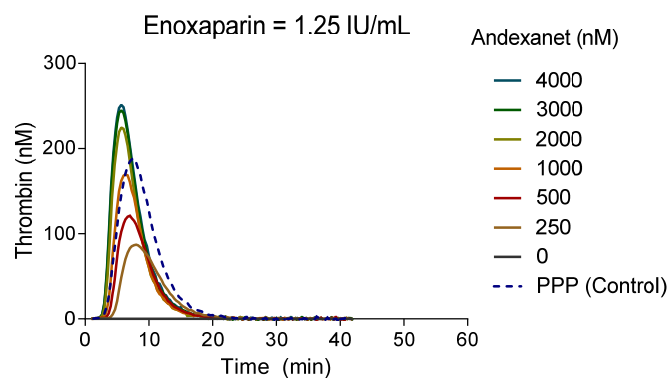
b. ATIII-dependent FXa inhibitors: enoxaparin (0 – 1.0 IU/mL), fondaparinux (0 – 2.0 $\mu\text{g/mL}$).

Figure 34: 様々な ATIII 依存性 FXa 阻害剤存在下での正常血漿における TF-CAT プロファイルに対する andexanet の影響

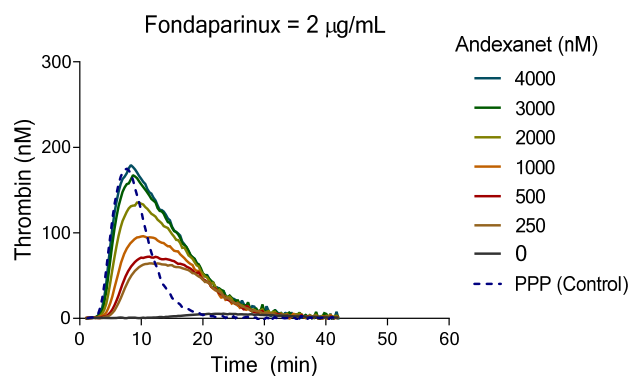
a. No anticoagulant (control plasma)



b. Enoxaparin



c. Fondaparinux



CAT = Calibrated automated thrombogram; IU = International unit; PPP = Platelet poor plasma; TF = Tissue factor; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor

Legend: The TF-CAT experiments were performed using the PPP-reagent (5 pM TF/4.0 µM phospholipid) and the pooled plasma spiked with andexanet (0 – 4.0 µM) and different FXa inhibitors.

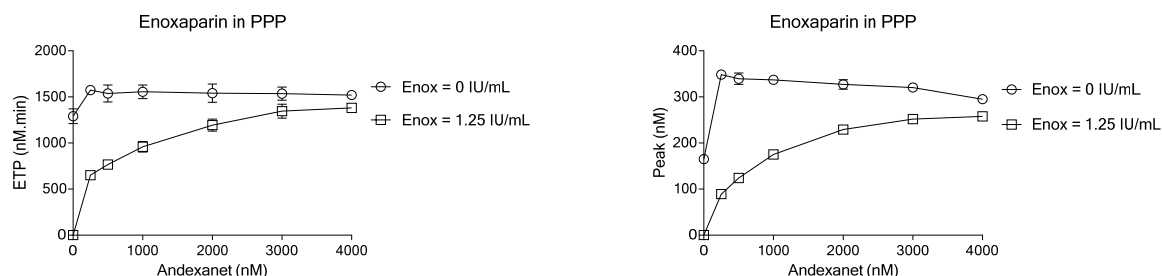
a. no anticoagulant (control plasma): addition of andexanet mainly caused increase in peak thrombin due to the known effect of andexanet-TFPI interaction.

b. representative enoxaparin (1.25 IU/mL) profiles: addition of andexanet dose-dependably and completely reversed enoxaparin-induced inhibition of thrombin generation.

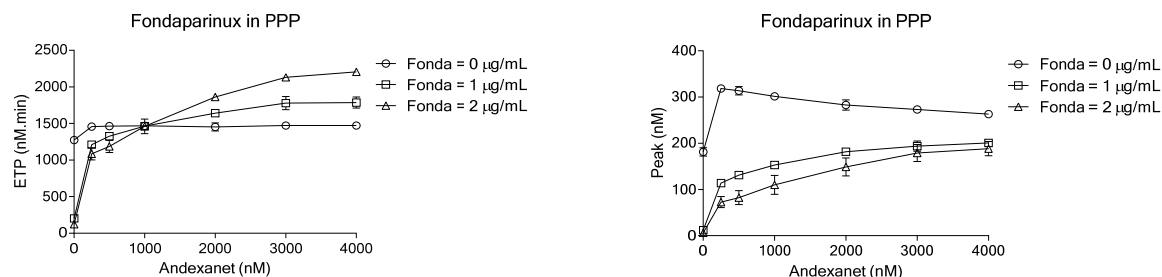
c. representative fondaparinux (2.0 µg/mL) profiles: addition of andexanet dose-dependably and completely reversed fondaparinux-induced inhibition of thrombin generation with a much broader peak.

Figure 35: 様々な ATIII 依存性 FXa 阻害剤存在下での正常血漿における TF-CAT パラメータに対する andexanet の影響

a) Enoxaparin



b) Fondaparinux



ATIII = Antithrombin III; ETP = Endogenous thrombin potential; Enox = Enoxaparin; FXa = Factor Xa; IU = International unit; PPP = Platelet poor plasma

Legend: Representative results showing andexanet's ability to reverse different ATIII-dependent FXa inhibitors as assessed by ETP and Peak thrombin.

- reversal of enoxaparin: andexanet dose-dependently and completely reversed enoxaparin (1.25 IU/mL)-induced inhibition of ETP or Peak.
- reversal of fondaparinux: andexanet dose-dependently and completely reversed fondaparinux (1.0 and 2.0 µg/mL)-induced inhibition of thrombin generation of ETP and Peak, with ETP increased to the levels above the baseline level in control plasma.

3.1.4 Andexanet と他の主要な血漿中凝固関連タンパクとの相互作用

直接作用型及び間接作用型 FXa 阻害剤との結合に加え、andexanet と他の主要な血漿中凝固関連タンパクとの相互作用について、Biacore®システムを用いて内在性 FXa と比較した。

結合能の解析データから、TFPI を除き、andexanet と他の血漿中凝固関連タンパク、プロトロンビン、血液凝固第 V 因子 (FV) 及び FX 又は血漿中阻害因子 (ATIII、 α -1-アンチトリプシン及び α -2-マクログロブリン) との顕著な相互作用は Table 2 に示す濃度範囲において認められなかった (NC-12-0459-R0001、NC-12-0460-R0001 及び NC-12-0461-R0001) (Table 3)。TFPI は、ナノモル濃度での FXa ($K_d=0.85\sim14.5$ nmol/L) 及び andexanet ($K_d=0.64\sim0.70$ nmol/L) に対する結合親和性を有することが示された。Biacore で測定した FXa-TFPI 間の結合親和性は、動態に基づく文献報告よりも弱く ($1/34$ 以下、 $K_i=0.025$ nmol/L) ⁸⁾、おそらくは強固な結合相互作用を測定する際の Biacore システムの測定限界によるものと推察された。

したがって、andexanet の TFPI との相互作用については、さらに FXa 酵素アッセイ、細胞アッ

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

セイ及びヒト血漿を用いた IIa 産生により評価を実施した。

Table 3: 主要な血漿中凝固関連タンパクに対する andexanet の結合親和性 (K_d 値) (Biacore*)

Protein	K_d fXa (nM)	K_d AnXa (Lot 1) (nM)	K_d AnXa (Lot 2) (nM)
TFPI	0.81-14.5	0.64	0.70
ATIII	1060-13200	no binding	<i>not tested</i>
α -2-Macroglobulin	no binding	no binding	<i>not tested</i>
α -1-Antitrypsin	no binding	no binding	<i>not tested</i>
FVII	2970	2780	<i>not tested</i>
FX	no binding	no binding	no binding
Prothrombin	no binding	no binding	<i>not tested</i>
FV	no binding	no binding	<i>not tested</i>

AnXa = Andexanet; ATIII = Antithrombin III; fXa = Factor Xa; FVII = Factor VII; FV = Factor V; FX = Factor X; HPLC = High performance liquid chromatography; K_d = Binding constant; NHS-EDC = N-Hydroxysuccinimide - ethyl(dimethylaminopropyl) carbodiimide; nM = Nanomolar; PBS = Phosphate-buffered saline; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor.

* Andexanet or human fXa was immobilised on the surface of a Biacore® 3000 Sensor Chip CM5 using NHS-EDC chemistry. Coupling was carried out in acetate buffer (10 mM sodium acetate, 100 mM NaCl, pH = 5.0) for fXa (~0.2 mg/mL). Andexanet Lot 1, an early research lot (Lot 14, 1 x PBS, pH = 7.4), was diluted with HPLC grade water to ~0.2 mg/mL. Andexanet Lot 2, a manufactory lot (Eng. Lot [REDACTED] with the formulation buffer), was first buffer exchanged to 1 x PBS (pH = 7.4), followed by dilution with HPLC grade water to ~0.2 mg/mL.

3.1.5 FXa 阻害剤の存在下及び非存在下における andexanet と TFPI の相互作用

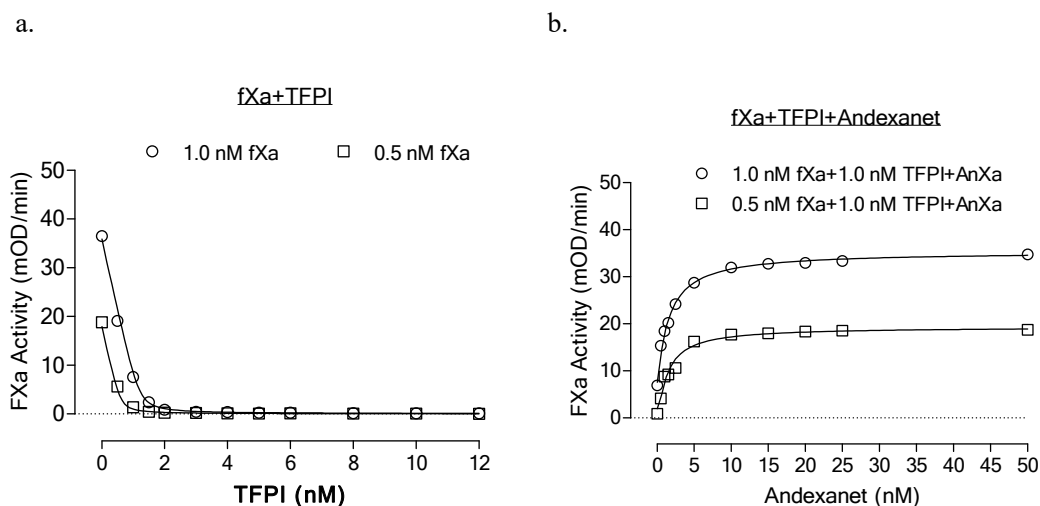
Andexanet と TFPI の相互作用

ヒト FXa 改変分子である andexanet は、TF 誘導性血液凝固経路を抑制する主要な生理的阻害因子の 1 つである TFPI と相互作用を示すことが推測される。

TFPI は 3 つの Kunitz 様ドメインを持ち、K2 は FXa と、K1 は FVIIa/TF と相互作用する。TFPI による FVIIa/TF 複合体活性阻害は、FXa-TFPI 複合体形成に依存する。したがって、andexanet (0 ~ 50 nmol/L) の TFPI (0 ~ 12 nmol/L) に対する結合親和性及び FVIIa/TF 複合体機能への影響を解析した (NC-12-0450-R0001)。

精製ヒト FXa 及び組換え TFPI を用いた FXa 酵素アッセイ (NC-12-0450-R0001、溶媒: 20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 5 mmol/L Ca^{2+}) において、andexanet は TFPI に結合し、用量依存的に TFPI による FXa 阻害を無効化した (Figure 36)。速度論的解析から、andexanet-TFPI の結合親和性は FXa-TFPI の結合親和性と同等であることが示された (Table 4)。また、測定した FXa-TFPI の結合親和性は、文献の結果と一致した⁸⁾。

Figure 36: Andexanet の TFPI への結合及び TFPI の FXa 阻害活性の用量依存的無効化



AnXa = Andexanet; FXa = Factor Xa; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor

Legend: Human FXa and TFPI were pre-incubated with or without AnXa in a buffer containing 5 mM Ca^{2+} for 2 hours at room temperature. Residual FXa activity was measured by cleavage of Spectrozyme-fXa substrate (100 μM). Kinetic parameters were obtained by data analysis using Dynafit.

a. Inhibition of FXa activity by TFPI.

b. Reversal of TFPI-induced inhibition of FXa by andexanet.

Table 4: 速度論的解析により決定した TFPI の FXa 及び andexanet に対する結合親和性

Results from Figure Panels	Reaction Components	TFPI-fXa K_i (nM)	TFPI-AnXa K_d (nM)
a.	FXa+TFPI	0.021 ± 0.001	NA
b.	FXa+TFPI+AnXa	0.026 ± 0.005	0.070 ± 0.017

AnXa = Andexanet; FXa = Factor Xa; K_d = Binding constant; K_i = Inhibition constant; NA = Not applicable; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor.

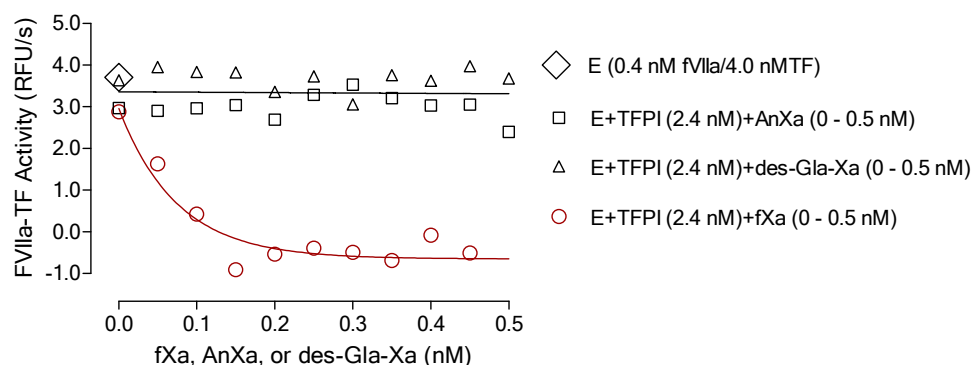
Andexanet-TFPI 複合体の FVIIa/TF 複合体活性に及ぼす影響

TFPI の主な生理的機能は、FVIIa/TF 複合体活性を減弱することである。このことから、andexanet-TFPI 複合体の FVIIa/TF 複合体活性に対する相互作用の影響を検討した。

酵素アッセイ（溶媒：20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 5 mmol/L Ca^{2+} ）において、FVIIa/TF 複合体活性は、予測されるとおり、用量依存的かつ完全に FXa-TFPI 複合体により阻害された。一方、andexanet-TFPI 複合体は FVIIa/TF 複合体活性を阻害しなかったが、これは andexanet が Gla ドメインを欠失しているためと考えられた。このことは、des-Gla FXa (Gla ドメイン欠失 FXa) を用いて実施した対照試験で、des-Gla FXa-TFPI 複合体が同様のアッセイ下で FVIIa/TF 複合体活性を阻害しなかったことから裏付けられた (Figure 37)。

同様な結論は、TFPI 及び andexanet 存在下で FVIIa/TF 複合体による FX 活性化を評価した試験で、andexanet が TFPI の FVIIa/TF 複合体阻害活性を無効化することにより FXa 形成を用量依存的に増加させた結果からも示された (NC-12-0450-R0001)。

Figure 37: Andexanet-TFPI 複合体の FVIIa/TF 複合体活性に及ぼす影響



AnXa = Andexanet; FII = Factor II (prothrombin); fVIIa = Recombinant factor VIIa; TF = Tissue factor; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor; Z-VVR-AMC = Z-VAL-VAL-ARG-7-Amino-4-MethylCoumarin

Legend: The enzyme complex, FVIIa/TF (E), was prepared from purified human fVIIa (0.4 nM), TF and phospholipids from Innovin (4.0 nM TF) in a buffer with 5 mM Ca^{2+} . The reaction mixture contained a fixed concentration of TFPI (2.4 nM) and different concentrations of fXa, des-Gla fXa or AnXa. Following incubation of the mixture for 2 hours at room temperature, residual FVIIa/TF activity was measured by cleavage of a fluorogenic substrate Z-VVR-AMC.

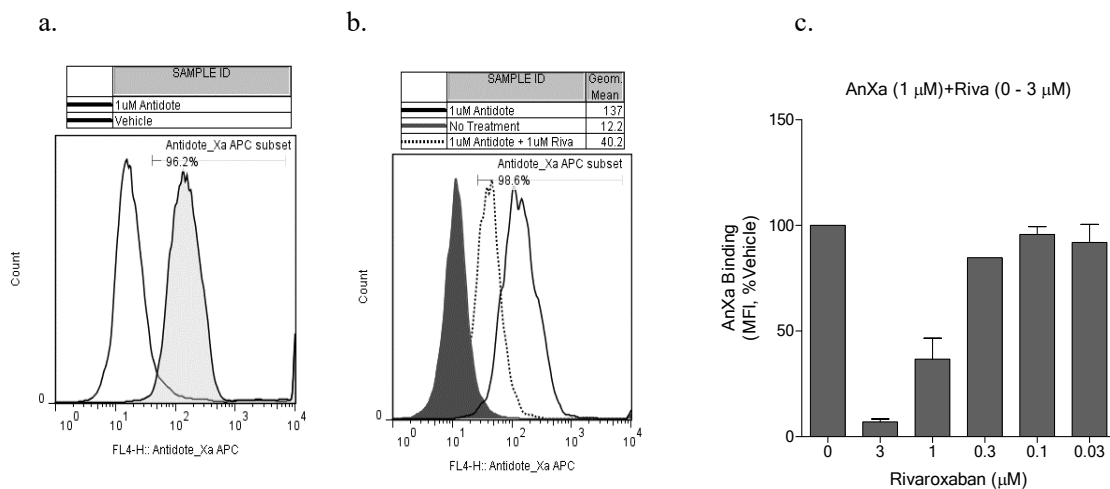
HUVEC 細胞における andexanet の TFPI への結合に対するリバーロキサバンの阻害作用

Andexanet は直接作用型 fXa 阻害剤及び TFPI と高い親和性で結合する。Andexanet が TFPI 及び fXa 阻害剤のリバーロキサバンに競合的に結合するか否かを、TFPI を発現することが知られているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた細胞アッセイで評価した (NC-15-0662-R0001)。

細胞アッセイ (N=2~3) において、HUVEC の TFPI 発現は抗 TFPI 抗体を用いた FACS で確認した。Andexanet (1 $\mu\text{mol/L}$) 又はヒト fXa (1 $\mu\text{mol/L}$) の HUVEC への結合は、ヒト FX/fXa を認識するモノクローナル抗体を用いて観察した。Andexanet の HUVEC への結合は、抗 TFPI-K2 抗体により部分的に阻害されたことから、この結合は HUVEC に発現する TFPI との andexanet の相互作用によるものであることが示された。

さらに、andexanet (1 $\mu\text{mol/L}$) をリバーロキサバン (0~3 $\mu\text{mol/L}$) と共インキュベーションした場合、andexanet の TFPI への結合は fXa 阻害剤により用量依存的に阻害され、3 $\mu\text{mol/L}$ では完全に阻害された。このことから、過剰量の fXa 阻害剤の存在下では、andexanet への結合に対して、TFPI とリバーロキサバンは競合することが示唆された (Figure 38)。

Figure 38: HUVEC を用いた細胞アッセイにおける andexanet-TFPI 間相互作用に対する
リバーロキサバンの影響



Antidote = Andexanet (AnXa); APC = Allophycocyanin; FACS = Fluorescence-activated cell sorting; FX = Factor X; fXa = Factor Xa; HUVEC = Human umbilical vascular endothelial cells; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor; MFI = Mean fluorescence intensity

Legend: TFPI expression on HUVECs was detected by using a goat anti-TFPI polyclonal antibody. Binding of andexanet or human fXa to HUVECs, with or without rivaroxaban (riva), was detected by monoclonal anti-human FX/FXa (Light + Heavy chain) antibodies. The fluorescence was measured by FACS using Allophycocyanin (APC)-conjugated secondary antibodies.

a. Binding of andexanet on HUVECs is detected by FACS.

b. – c. Rivaroxaban is able to dose-dependently and completely block the binding of andexanet to HUVECs.

リバーロキサバン単独又はリバーロキサバンと andexanet 存在下での IIa 産生と抗 FXa 活性との 相関性

抗 FXa 活性及び IIa 産生は、FXa 阻害剤の最も妥当な PD 測定方法である。抗 FXa 活性は FXa 酵素活性阻害を直接的に測定する指標であり、IIa 産生は FXa 阻害の下流に位置する生理学的関連性のある指標である。これら 2 つの PD マーカーの相関性を比較し、FXa 阻害剤の無効化における andexanet-TFPI 間相互作用の影響を明らかにするため、リバーロキサバン単独及びリバーロキサバンと andexanet を含む血漿試料を用いた抗 FXa 活性アッセイ及び IIa 産生 CAT アッセイを実施した (Table 5) (NC-15-0659-R0003)。

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: 抗 FXa 活性アッセイ及び CAT アッセイに用いたリバーロキサバン及び andexanet の血漿中濃度

Sample ID	Riva Alone (μM)	Riva + AnXa		
		Riva (μM)	AnXa (μM)	Molar Ratio
1	1	1	2	2.00
2	0.75	1	1	1.00
3	0.5	1	0.75	0.75
4	0.25	1	0.5	0.50
5	0.125	1	0.25	0.25
6	0.0625	1	0.125	0.13
7	0.03125	1	0.0625	0.06
8	0.015625	1	0.03125	0.03
9	0	1	0	0

AnXa = Andexanet; CAT = Calibrated automated thrombography; fXa = Factor Xa; Riva = Rivaroxaban

最初の試験では、血漿試料に異なる濃度のリバーロキサバン（0～1.0 $\mu\text{mol/L}$ ）のみを添加して実施した（N=1～3）。予測されるとおり、血漿中リバーロキサバン濃度の増加に伴って抗 FXa 活性が増加した。抗 FXa 活性と血漿中リバーロキサバン濃度には高い相関性が認められた（ $R^2=0.998$ ）。同様に、IIa 産生もリバーロキサバン濃度の増加に伴って阻害され、その IC_{50} （ETP の 50%阻害濃度）は 0.330 $\mu\text{mol/L}$ と算定された（Figure 39a）。

第二の試験では、リバーロキサバン濃度を固定（1.0 $\mu\text{mol/L}$ ）し、異なる濃度の andexanet（0～2.0 $\mu\text{mol/L}$ ）を血漿試料に加えて実施した（N=1～5）。Andexanet は、予測されたとおり、リバーロキサバンの抗 FXa 活性を用量依存的に無効化し、モル濃度比約 1 : 1 の条件下で完全に無効化した。同様に、andexanet は、リバーロキサバン誘導 IIa 産生阻害も用量依存的に無効化し、その EC_{50} （ETP の 50%有効濃度）は 0.413 $\mu\text{mol/L}$ と算出された（Figure 39b）。

しかしながら、IIa 産生が抗 FXa 活性と相関する場合、andexanet を含む第二の試験では、最初の試験に比べ、同程度の抗 FXa 活性における IIa 産生が亢進していた（Figure 39c）。最大の影響は約 50%の抗 FXa 阻害（リバーロキサバンに対する andexanet のモル濃度比は約 0.5）で認められたが、リバーロキサバンを含有しない andexanet 単独条件下では IIa 産生への影響は限定的であった（Figure 39d）。

この IIa 産生の亢進は、リバーロキサバンと andexanet の併用下における andexanet-TFPI 間相互作用によるものと考えられた。この解釈は、外因性 TFPI を添加した別試験又は TFPI の免疫除去血漿を用いた別試験によっても支持された（NC-15-0659-R0003）。

TFPI 除去血漿では、andexanet の存在下及び非存在下における IIa 産生プロファイルが類似していたことから、TFPI 非存在下において andexanet は IIa 産生に影響を及ぼさないことが示された。また、IIa 産生の程度（ETP により測定）は、(a) リバーロキサバン（0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）又は (b) リバーロキサバン（1.0 $\mu\text{mol/L}$ ）+andexanet（0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）を含む TFPI 除去血漿において同程度であった。(b) のリバーロキサバン濃度は (a) の 2 倍であったが、化学量論的に andexanet のリバーロキサバンへの結合は 1:1 であることから、両試料で同程度の非結合型リバーロキサバン濃度（0.5 $\mu\text{mol/L}$ ）となった。

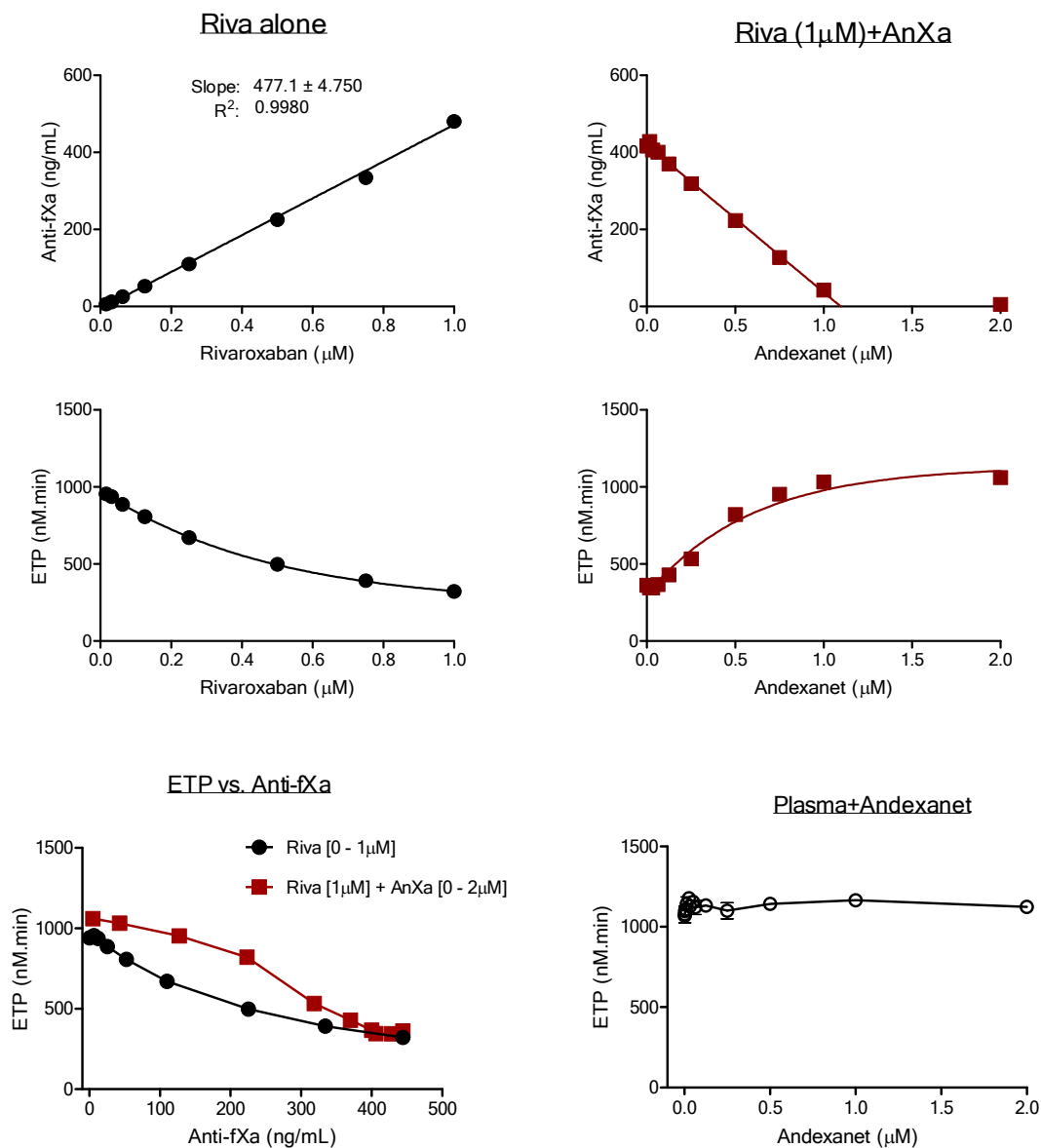
これらの結果は、リバーロキサバンの抗凝固作用に対する andexanet による無効化は、andexanet-TFPI 間相互作用とは無関係に達成されることを示している。しかしながら、FXa 阻害剤に対して

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

臨床的に適切な用量／レジメンの andexanet が用いられる場合には、andexanet と TFPI 及び FXa 阻害剤との競合的相互作用により、患者の抗凝固作用の無効化が促進される可能性がある。

Figure 39: リバーロキサバン単独又はリバーロキサバンと andexanet 共存下での IIa 産生と抗 FXa 活性の相関性



CAT = Calibrated automated thrombography; fXa = Factor Xa; PPP = Platelet poor plasma; Riva = Rivaroxaban; ETP = Endogenous thrombin potential

Legend: Pooled human plasma (CRYOcheck™) was spiked with rivaroxaban (0-1 µM) or rivaroxaban (1 µM) + andexanet (0-2 µM). Each sample was divided into two aliquots for anti-fXa and thrombin generation assays. Anti-fXa activity was measured using a modified chromogenic anti-fXa assay described previously. Thrombin generation was measured by the CAT using reagents supplied by the manufacturer (). Plasma (80 µL, triplicate) and PPP-reagent (20 µL, 5 pM TF) or calibrator were prepared in a 96-well plate. The reaction was initiated by addition of 20 µL FluCa (a mixture of Ca^{2+} and fluorogenic substrate) and thrombin generation was monitored at 37°C for 90 minutes.

- Dose-dependent inhibition of FXa activity and thrombin generation by rivaroxaban.
- Dose-dependent reversal of rivaroxaban-induced anti-fXa and inhibition of thrombin generation by andexanet.
- Correlation between thrombin generation (ETP) and anti-fXa.
- Minimal effect of andexanet on thrombin generation in the absence of a FXa inhibitor.

Andexanet-TFPI 間相互作用が確認されたことから、相補的なアッセイとして aPTT 試薬（XXXXXXXXXX社）を用いた非 TF 誘導性 IIa 産生アッセイを実施した。本アッセイは andexanet 製剤の医薬品適正製造基準各種バッチ（例：凍結と凍結乾燥製剤）の無効化活性の比較に用いられている。Betrixaban は andexanet の出荷試験で用いられたことから、これらの試験に用いた。

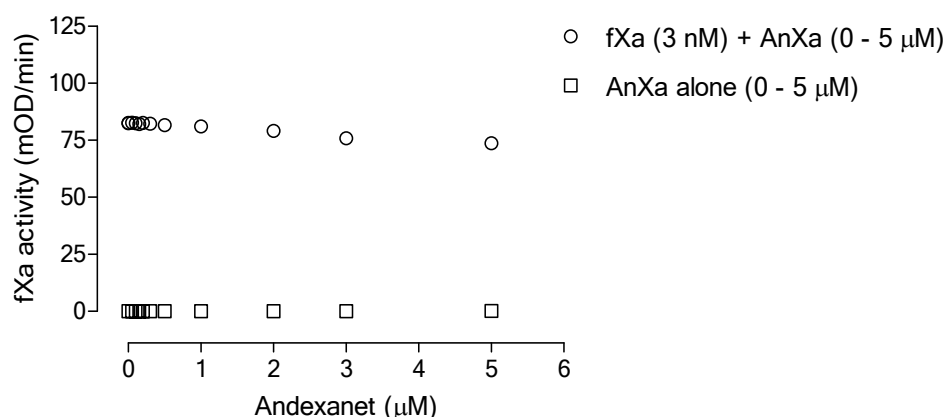
TF 誘導性 IIa 産生アッセイと同様、いずれのアッセイにおいても andexanet は FXa 阻害剤による IIa 産生阻害を用量依存的かつ完全に無効化させた。FXa 阻害剤非存在下では andexanet は、IIa 産生に対して明らかな影響を示さなかった。詳細は [NC-13-0560-R0001](#) 及び [NC-14-0569-R0001](#) に記載する。

以上より、用いた IIa 産生アッセイ方法に関係なく、andexanet は FXa 阻害剤の抗凝固活性を完全に無効化することが示された。TF 誘導性 IIa 産生アッセイを、以下の 3 つの理由から PD マーカーとして選定した。第一に、過去の FXa 阻害剤の臨床試験に関する公知例において、TF を誘導因子とする CAT が用いられている^{14),15)}。第二に、TF は、凝固カスケードにおいて最も関連性のある内因性誘導因子と考えられている。第三に、andexanet と TFPI との相互作用が確認されており、TF 誘導性 IIa 産生は、andexanet の無効化作用を測定する上で、非 TF 誘導性 IIa 産生と比較し、より生理学的に適切な PD マーカーである。

3.1.6 Andexanet の凝固促進及び抗凝固作用

Andexanet は、内因性 FXa の触媒活性を除去するように改変されている。精製ヒト FXa (3.0 nmol/L) 及び FXa ペプチジル基質である Spectrozyme-FXa (CH₃O-CO-D-CHG-Gly-Arg-pNA·AcOH、100 µmol/L) を用いた液相試験系 (20 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.1% BSA, 5 mmol/L Ca²⁺) において、予測されたとおり、andexanet は広範囲濃度域 (0~5.0 µmol/L) で FXa 発色基質である Spectrozyme-FXa を切断しなかった ([NC-12-0435-R0001](#)) ([Figure 40](#))。FXa (3.0 nmol/L) 存在下での FXa による基質切断の速度は、andexanet の広範囲濃度域で影響を受けず、これは andexanet の触媒活性欠失及び Spectrozyme-FXa 基質への低結合親和性と一致していた。

Figure 40: Andexanet の触媒活性評価



AnXa = Andexanet; fXa = Factor Xa

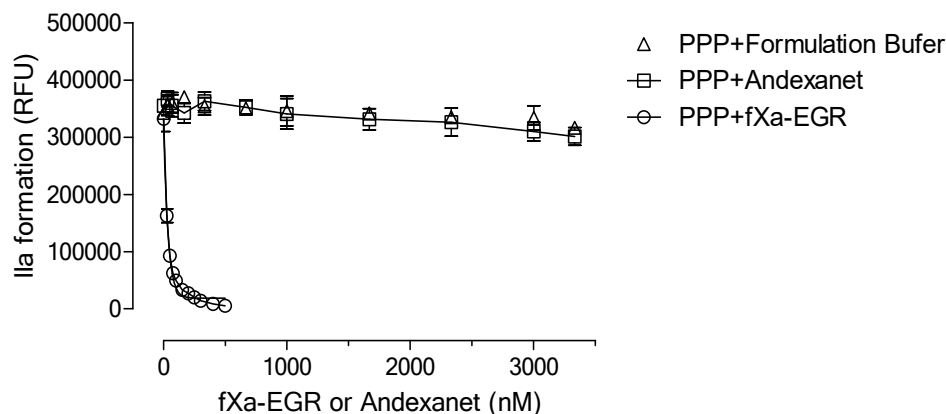
Legend: The reaction mixture contained andexanet (AnXa) with or without human FXa (3 nM) and 100 µM Spectrozyme FXa in an assay buffer. The initial velocity of substrate cleavage was measured and expressed as mOD/min.

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

加えて、andexanet の抗凝固活性は Gla ドメインの除去により取り除かれている。2.1.3 に記載した IIa 産生アッセイにおいて、ヒト血漿中で andexanet は広範囲濃度域（0～3.3 $\mu\text{mol/L}$ ）で、TF 誘導性 IIa 産生に対して影響しなかった。対照的に、活性化部位を阻害して Gla ドメインを保持したヒト FXa（FXa-EGR）は、プロトロンビナーゼ複合体に対する競合的阻害剤であり、同じアッセイにおいて強力な阻害を示した（ $\text{IC}_{50}=25 \text{ nmol/L}$ ）（NC-12-0451-R0001）（Figure 41）。

Figure 41: ヒト血漿中での IIa 産生アッセイにおける andexanet 及び FXa-EGR の活性比較



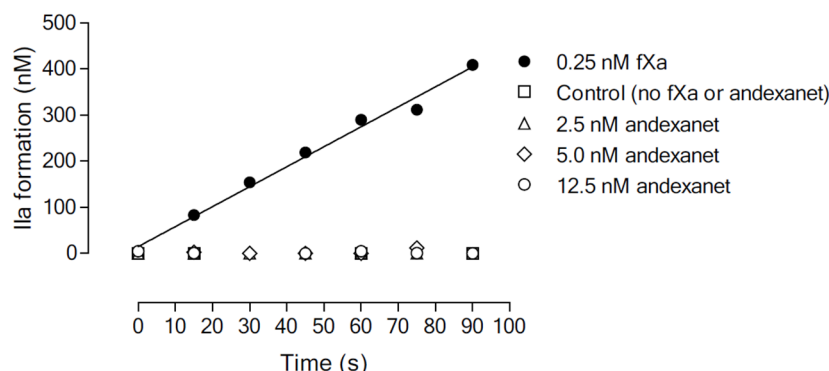
FXa = Factor Xa; PPP = Platelet poor plasma; FXa-EGR = FXa with active site inhibited by Glu-Gly-Arg (EGR); RFU = Relative fluorescence unit

Legend: TF-initiated thrombin generation was performed using an in-house assay as described previously. The reaction mixture consisted of pooled PPP, andexanet (0-3.3 μM), equivalent volume of formulation buffer (as control) at each andexanet concentration, or FXa-EGR (0-0.5 μM), a human FXa with the active site inhibited by a tripeptidyl inhibitor Glu-Gly-Arg-chloromethylketone. Thrombin generation was expressed as RFU. Lack of anticoagulant activity with andexanet was evident by comparing to FXa-EGR.

また、Andexanet の凝固促進及び抗凝固作用を評価するために、精製タンパクを用いた再構成系でのプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化（NC-15-0667-R0001、andexanet : 0～12.5 nmol/L）、ヒト全血を用いた TF 誘導性 IIa 産生（NC-12-0439-R0001、andexanet : 0～2 $\mu\text{mol/L}$ ）並びに細胞アッセイを用いた血小板、白血球（TF-1 細胞）又は HUVEC の活性化（NC-12-0438-R0001、andexanet : 0～100 又は 1000 nmol/L）への andexanet の影響を検討した。

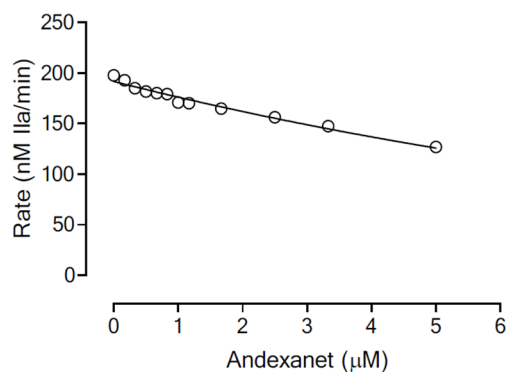
精製タンパクを用いた再構成系でのプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化に対する andexanet の影響を検討した試験（NC-15-0667-R0001、溶媒 : 20 mmol/L Tris/150 mmol/L NaCl_2 /5 mmol/L Ca^{2+} /0.1% BSA, pH 7.4）では、andexanet が凝固促進作用を有さないことを確認するために、ヒト精製 FXa（0.25 nmol/L）又は andexanet（0～12.5 nmol/L）存在下におけるプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化を経時的に測定した結果、ヒト精製 FXa の 50 倍の濃度においても andexanet はプロトロンビン活性化を示さなかった（Figure 42）。また、andexanet の存在下（0～5 $\mu\text{mol/L}$ ）におけるプロトロンビナーゼ複合体（ヒト精製 FXa:0.25 nmol/L）によるプロトロンビン活性化を測定した結果、andexanet のプロトロンビン活性化への影響はほとんど見られなかった（Figure 43）。

Figure 42: 精製タンパクを用いた再構成系でのプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化: andexanet (0~12.5 nmol/L)



Trombin (IIa) formation over time was measured using a reconstituted system in buffer. The prothrombinase complex containing 0.25 nM fXa was used as a positive control for prothrombin activation. In addition, a negative control (no fXa or andexanet) was also included in the experiment. When the fXa in the prothrombinase complex was replaced by andexanet, no thrombin formation was measurable with andexanet concentrations up to 12.5 nM.

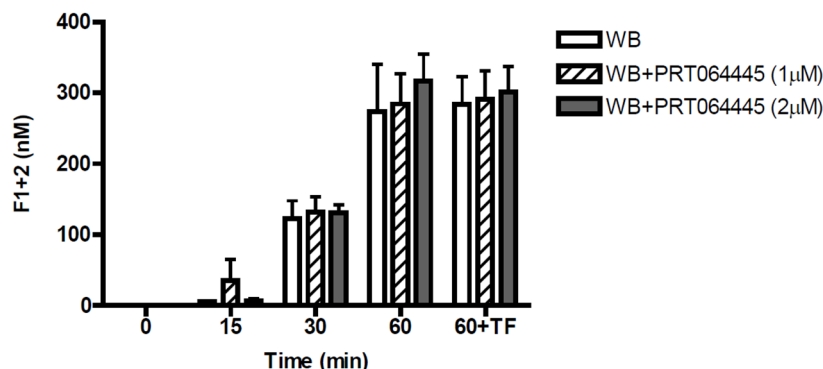
Figure 43: 精製タンパクを用いた再構成系でのプロトロンビナーゼ複合体によるプロトロンビン活性化: andexanet (0~5 μ mol/L)



The inhibition of the rate of thrombin formation with increasing concentrations of andexanet was measured using a reconstituted prothrombinase complex in a buffer system. Andexanet concentrations up to 5 μ M had minimal effect on the rate of thrombin formation, with an estimated $K_i > 8.0 \mu$ M for andexanet.

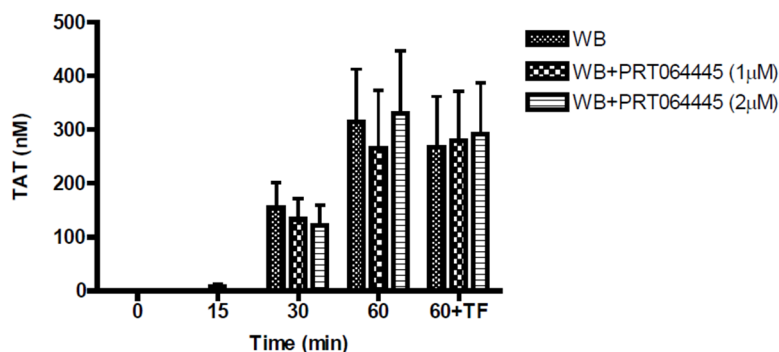
ヒト全血を用いた TF 誘導性 IIa 産生に対する andexanet の影響を検討した試験 (NC-12-0439-R0001、溶媒: 10 mmol/L Tris, 95 mmol/L L-arginine, 4% sucrose, and 0.01% Polysorbate-80) では、F1+2 及び TAT を TF 誘導性 IIa 産生の指標とした。ヒト全血に andexanet (0~2 μ mol/L) を添加し、TF 及び Ca^{2+} 存在下、37°C で 60 分間培養し、培養液中の F1+2 及び TAT を ELISA で測定した結果、andexanet は F1+2 及び TAT の形成に影響を及ぼさなかった (Figure 44 及び Figure 45)。

Figure 44: ヒト全血を用いた TF 誘導性 IIa 産生に対する andexanet の影響: F1+2



WB: Whole Blood. Time; the incubation time in the presence or absence PRT064445 (andexanet) prior to measurement. At each timepoint, F1+2 measurements are expressed as the mean and standard error of the mean, as determined using citrated (0.32%) human whole blood from three healthy volunteers. Plotted as raw data. In the control experiment (60+TF), whole blood was incubated with andexanet and tissue factor (Innovin, 3 pM) for 60 minutes.

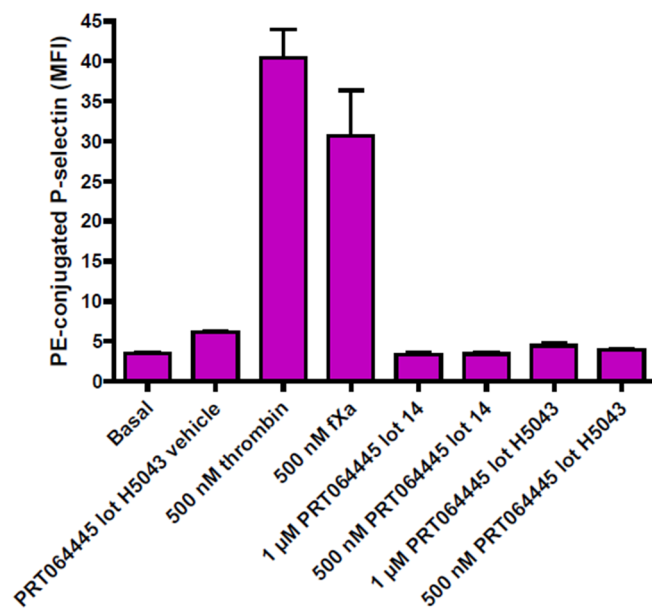
Figure 45: ヒト全血を用いた TF 誘導性 IIa 産生に対する andexanet の影響: TAT



WB: Whole Blood. Time; the incubation time in the presence or absence PRT064445 (andexanet) prior to measurement. In the absence of Ca^{2+} , TAT levels were below the limit of quantification and were not included in this figure. At each timepoint, TAT measurements are expressed as the mean and standard error of the mean, as determined using citrated (0.32%) human whole blood from three healthy volunteers. Plotted as raw data. In the control experiment (60+TF), whole blood was incubated with andexanet and tissue factor (Innovin, 3 pM) for 60 minutes.

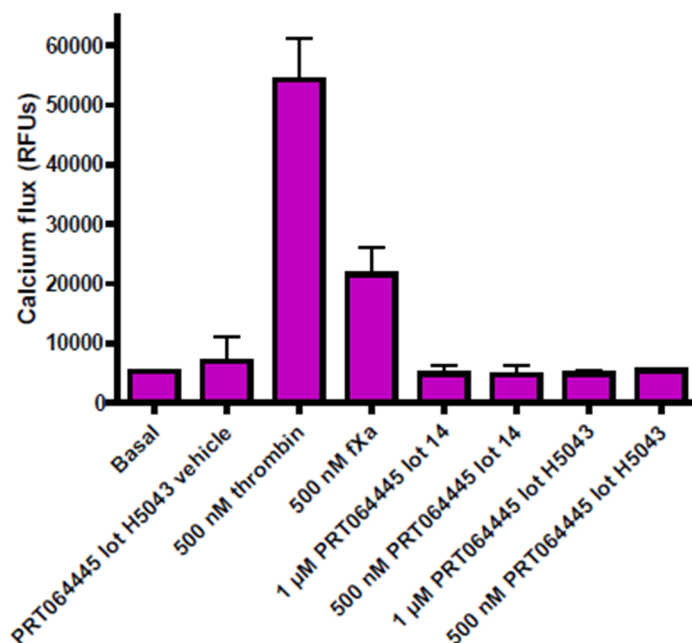
血小板、白血球（TF-1 細胞）又は HUVEC の活性化に対する andexanet の影響を検討した試験（NC-12-0438-R0001、溶媒：10 mmol/L Tris, 95 mmol/L L-arginine, 4% sucrose, 0.01% polysorbate-80, pH 7.8）では、ヒト血小板を IIa（500 nmol/L）、FXa（500 nmol/L）又は andexanet（0.5～1 μmol/L）と培養後、血小板活性化の指標として培養液中の P-セレクチン量を測定した。その結果、溶媒対照と比較して IIa 及び FXa は P-セレクチン量を増加させたのに対し、andexanet の P-セレクチン量への影響はみられなかった（Figure 46）。白血球への影響は細胞内 Ca^{2+} 濃度を指標とした。白血球（TF-1 細胞）を IIa（100 nmol/L）、FXa（100 nmol/L）又は andexanet（100 nmol/L）と培養後、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した結果、IIa 及び FXa は細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させたのに対し、andexanet の細胞内 Ca^{2+} 濃度への影響はみられなかった。HUVEC を IIa（500 nmol/L）、FXa（500 nmol/L）又は andexanet（0.5～1 μmol/L）と培養後、細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した結果、andexanet は 500 nmol/L 及び 1 μmol/L のいずれの濃度でも細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響を及ぼさなかった（Figure 47）。

Figure 46: ヒト血小板に対する andexanet の影響：P-セレクチン



Data are from 1 representative experiment performed on platelets from 5 different donors. Mean $\pm$ standard deviation of replicate mean fluorescent intensity. PRT064445 is andexanet.

Figure 47: HUVEC に対する andexanet の影響：細胞内 Ca^{2+} 濃度



Mean $\pm$ standard deviation of replicate RFUs values. Data are from 1 representative experiment from 3 different determinations. PRT064445 is andexanet.

以上の結果、一貫して andexanet には凝固促進及び抗凝固作用は認められなかった。

3.1.7 *In vitro* 試験の要約

In vitro 試験により、andexanet は間接作用型 FXa 阻害剤（未分画ヘパリン、エノキサパリン及

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

びフォンダパリヌクス）に高親和性で結合することが示された。Andexanet は TFPI を除き、他の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、FXa 阻害剤誘導 IIa 産生阻害に対する無効化を促進させる可能性があるが、FXa 阻害剤非存在下では IIa 産生への影響は限定的であった。加えて、andexanet 自体は内因性の凝固促進及び抗凝固作用を有しないことが示された。

3.2 *In vivo* 試験

3.2.1 間接作用型 FXa 阻害剤を投与した抗凝固状態下のラットにおける andexanet の作用

げっ歯類予防的モデル

間接作用型 ATIII 依存性 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投与した抗凝固状態下のラット尾切断モデルにおいて、出血量及び PD マーカーを測定した。エノキサパリン（ヒトの推奨用量の最大約 5 倍）を投与した抗凝固状態下のラットに、尾切断の 5 分前（予防的モデル）又は 10 分後（治療的モデル）に andexanet をボーラス投与した⁶⁾。経時的に血液試料を採取し、andexanet の血漿中濃度及び抗 FXa 活性（エノキサパリン濃度の指標として）を測定した。

雄性 Sprague-Dawley ラット（各群 5～6 例、体重：337 ± 15 g）にエノキサパリン（4.5 mg/kg）又は溶媒（生理食塩水）をボーラス投与し、その 10 分後に溶媒（10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）又は andexanet を 5 分間かけてボーラス投与した（4 mg/kg、頸静脈留置カテーテルによる投与）。その後、尾を切断し温生理食塩水中で 45 分間出血させた。ボーラス投与と持続静脈内投与の併用では、ボーラス投与終了時（尾切断時点）に andexanet（4 mg/hr）又は溶媒の投与を開始した。抗 FXa 活性及び andexanet の血漿中濃度を評価するため、血液試料を経時的に採取した（NC-12-0432-R0001）。

エノキサパリン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 のボーラス投与後に 4 mg/hr で静脈内投与）すると、平均出血量が非抗凝固状態下のラットのレベルまで減少し（Table 6）、いずれの投与法でも抗 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。累積出血量は両群で同程度であり、抗凝固状態下のラット対照群での平均 1,095±361 µL から、andexanet のボーラス投与単独群で 192±126 µL、ボーラス投与と持続静脈内投与併用群で 244±189 µL と、いずれも統計学的有意差を持って減少した（いずれも P<0.003）。投与法にかかわらず、andexanet 投与の両群の平均出血量には、非抗凝固状態下のラット（238±139 µL）との比較で統計学的有意差はなかった（P>0.05）。

Andexanet の単回ボーラス投与では、試験終了時まで抗 FXa 活性の減少は維持されなかったが、andexanet の持続静脈内投与では、抗 FXa 活性の減少が維持された（Table 6）。試験終了時において、andexanet 濃度はボーラス投与単独の方が、ボーラス投与と持続静脈内投与併用群よりも低かった。ボーラス単独群（andexanet 4 mg を 5 分間かけて投与）の andexanet の平均血漿中濃度は投与終了時点で 3.1 µmol/L、試験終了時点（出血時間 45 分）で 0.46 µmol/L であった。Andexanet のボーラス投与と持続静脈内投与併用群（4 mg のボーラス投与後に 4 mg/hr で静脈内投与）の andexanet の血漿中濃度はボーラス投与終了時点で 3.2 µmol/L、試験終了時点で 1.7 µmol/L であった。平均抗 FXa 活性は andexanet のボーラス投与単独群でボーラス投与と持続静脈投与併用群より高く、これはボーラス投与単独群における andexanet の血漿中濃度が低かったことと一致する。

Table 6: エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のラットに尾切断前に andexanet を投与したときの薬力学マーカー及び出血量

Group	Andexane t (μM) T = 0	Andexanet (μM) T = 45	Anti-fXa (IU/mL) T = (-)5	Anti-fXa (IU/mL) T = 0	Anti-fXa (IU/mL) T = 45	Blood loss (μL) T = 45
Vehicle	ND	ND	ND	ND	ND	238 ± 139
Enoxaparin 4.5 mg/kg	ND	ND	5.4 ± 1.21	4.23 ± 0.96	1.98 ± 0.52	1,095 ± 361
Enoxaparin 4.5 mg/kg Andexanet 4 mg	3.1	0.46	5.72 ± 0.77	1.07 ± 0.26 ^a	2.22 ± 0.50	192 ± 126 ^c
Enoxaparin 4.5 mg/kg Andexanet 4+4 mg/hr	3.2	1.7	4.46 ± 0.47	1.00 ± 0.21 ^a	1.14 ± 0.23 _b	244 ± 189 ^c

ND = Not determined; T = Time, in minutes

Legend: Enoxaparin was administered IV at 4.5 mg/kg. Andexanet was administered as a 4 mg IV bolus over 5 minutes (“4 mg”), or as a 4 mg bolus, followed by a 4 mg/hr infusion (“4+4 mg/hr”). Andexanet units are expressed as μM; anti-fXa activity is expressed as IU/mL. Blood loss is expressed in μL. Data are expressed as mean ± SD. N=6 animals/group, except vehicle, which was N=5.

^a p < 0.001 vs. anti-fXa activity at the start of andexanet injection.

^b p < 0.004 vs. enoxaparin alone at study termination.

^c p < 0.003 vs. enoxaparin alone.

要約すると、これらの結果は、andexanet への短時間曝露がエノキサパリンによる抗凝固作用の無効化に十分であり、抗 FXa 活性の減少及びエノキサパリンの抗凝固作用による出血の回復をもたらすことを示唆している。Andexanet と ATIII の化学量論比は約 1:1 であった。ラットの血漿中 ATIII 濃度は約 3.5 μmol/L と報告されている¹⁾。

エノキサパリン（4.5 mg/kg、溶媒：生理食塩水）を投与した抗凝固状態下の雄性 Sprague-Dawley ラット（各群 6～7 例、体重：323 ± 18 g）に andexanet（6 mg ボーラス投与後に 6 mg/hr で持続静脈内投与、溶媒：PBS pH7.4）を投与した試験（NC-12-0454-R0001）において、15 分間の出血量が大幅に減少したことが示された（対照群での 917±549 μL に対して andexanet 投与群では 172±122 μL）。本試験では、エノキサパリンの抗凝固作用の中和剤である硫酸プロタミン（プロタミン）を陽性対照として使用した。プロタミン（0.9 mg を 5 分間かけてボーラス投与、溶媒：生理食塩水）は、出血量を平均 163±86 μL まで減少させ、非抗凝固状態下のラット（128±90 μL）との有意差は認められなかった（P>0.05、非抗凝固状態下のラットと andexanet 投与群又はプロタミン投与群との比較）。抗 FXa 活性は、抗凝固状態下のラットでは 4 IU/mL であったが、中和剤投与直後には andexanet 投与群では 2 IU/mL、プロタミン投与群では 0.7 IU/mL に減少した。Andexanet の血漿中濃度は、andexanet ボーラス投与終了時点で 8.5 μmol/L、15 分間の出血時間終了時点で 5.6 μmol/L であった。

エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のラットで認められた結果と同様に、フォンダパリヌ

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

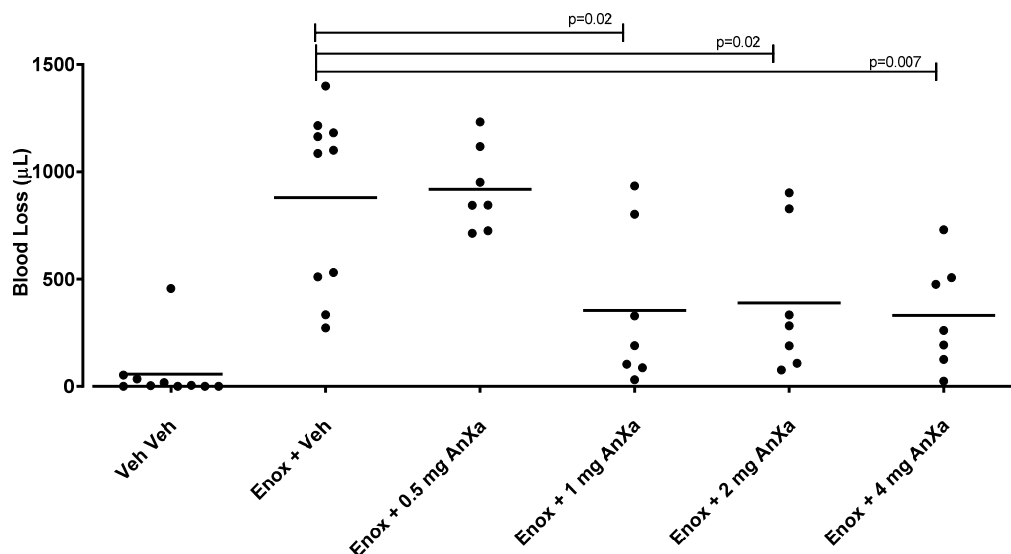
クス（25 mg/kg、溶媒：生理食塩水）を投与した抗凝固状態下の雄性 Sprague-Dawley ラット（各群 6～7 例、体重：287 ± 19 g）に andexanet の 6 mg/kg ボーラス投与後に 6 mg/hr で持続静脈内投与（溶媒：PBS pH7.4）した予防的投与試験（NC-12-0456-R0001）で、出血量が非抗凝固状態下のラットと同程度まで減少した（ $P < 0.0001$ 、フォンダパリヌクス単独群との比較）。Andexanet の平均血漿中濃度は、andexanet のボーラス投与終了時点で約 8.7 $\mu\text{mol/L}$ 、15 分間の出血時間終了時点で 7.0 $\mu\text{mol/L}$ であった。本試験において、ボーラス投与終了時点の抗 FXa 活性は、andexanet 投与直前の値と比較して 97% 低く、試験終了時点の抗 FXa 活性は andexanet 投与前値と比較して 94% 低かった（ $P < 0.0001$ 、フォンダパリヌクス単独群との比較）。これらの結果は、フォンダパリヌクスによる抗凝固作用の無効化（血漿中抗 FXa 活性の減少により測定）により、出血量が減少することを示した⁶⁾。

げっ歯類治療的モデル

Andexanet の作用を、治療的モデルにおいても評価した（NC-12-0437-R0001）。本試験では、エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のラットで尾切断から 10 分後に、様々な用量の andexanet（0.5、1.0、2.0 又は 4.0 mg/例、溶媒：10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L Arg、4% Sucrose、0.01% Tween 80）を 2 分間かけてボーラス投与した。雄性 Sprague-Dawley ラット（各群 7～10 例、体重：322 ± 16 g）に溶媒（生理食塩水）又はエノキサパリン（4.5 mg/kg）をボーラス投与した。5 分後に尾を切断し、10 分間温生理食塩水を入れたバイアル中で出血させた。その後、バイアルを新しいバイアルに交換し、andexanet を投与した。さらに 45 分間出血させ、分光光度法により出血量を測定した。追加の評価項目として、抗 FXa 活性及び andexanet の血漿中濃度を測定した。

これらの条件下において、検討した andexanet の 3 用量（1、2 及び 4 mg）で出血量の統計学的有意な減少が認められた（ $P \leq 0.02$ 、エノキサパリン単独群との比較）。Andexanet の濃度はラットにおける ATIII 濃度を超えていたが（報告されているラット血漿中 ATIII 濃度は 3.5 $\mu\text{mol/L}$ 、andexanet 4 mg 投与群の平均 andexanet 濃度は 4.3 $\mu\text{mol/L}$ ）、非抗凝固状態下のラット（溶媒単独）でみられた出血量と同程度レベルへの完全な回復は認められなかった（Figure 48）。本試験で使用した andexanet の最低用量（0.5 mg）では、抗凝固状態下の対照群動物と比較して出血量が減少することはなかった。Andexanet の各用量における平均累積出血量、andexanet の血漿中濃度及び抗 FXa 活性を Table 7 に示す。

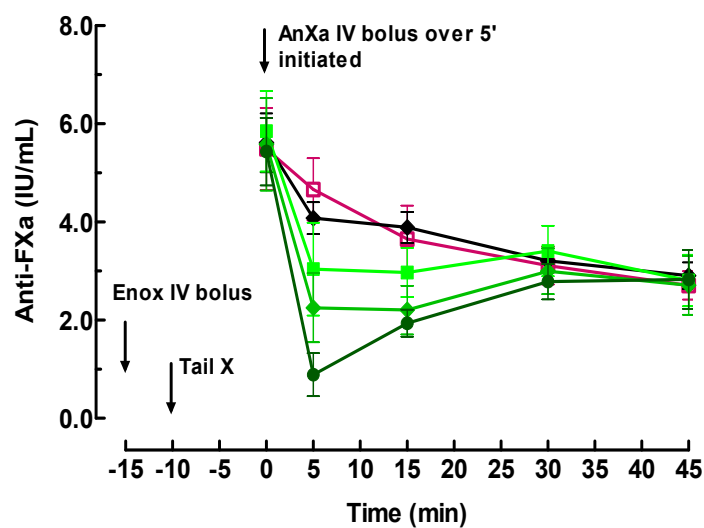
Figure 48: ラット尾切断モデルにおける andexanet によるエノキサパリン誘導性出血の抑制



Legend: Cumulative blood loss following administration of various doses of andexanet (0.5 mg, 1 mg, 2 mg, and 4 mg) to rats anticoagulated with enoxaparin. Rat tails were transected 10 minutes prior to initiating the administration of andexanet, and blood was collected for an additional 45 minutes after the initiation of andexanet injection (55 minutes total bleed time). All dose levels of andexanet significantly reduced blood loss as shown in the figure.

出血動物に andexanet を投与した結果、抗 FXa 活性が用量依存的に減少し（Figure 49）、抗 FXa 活性は投与終了時点の andexanet の血漿中濃度と反比例していた（Table 7）。抗凝固状態下のラットにおける andexanet 1 mg の 5 分間ボラス投与で、平均抗 FXa 活性は 5.8 IU/mL（エノキサパリン投与 15 分後、andexanet 投与直前）から andexanet 投与終了時点で約 3.0 IU/mL に減少した。Andexanet 投与終了直後の抗 FXa 活性は、andexanet 2 mg 及び 4 mg 投与群でそれぞれ 2.25 ± 0.90 IU/mL 及び 0.89 ± 0.44 IU/mL とさらに減少した（andexanet 1、2 及び 4 mg 投与群で $P < 0.002$ 、andexanet 0.5 mg 投与群で $P > 0.05$ ）。

Figure 49: エノキサパリンを投与した抗凝固状態下の出血ラットにおける尾切断後に投与した andexanet による用量依存的な抗 FXa 活性の減少



AnXa = Andexanet; Enox = Enoxaparin

Legend: Anti-fXa activity (IU/mL) vs. time at various doses of andexanet administered following tail transection. Rats were administered enoxaparin, and after 5 minutes, the tail was transected (Tail X), animals were allowed to bleed for 10 minutes, and then vehicle or andexanet was administered at doses of 0.5, 1, 2, or 4 mg. $P < 0.002$ enoxaparin plus 1, 2, or 4 mg andexanet at the start vs. end of andexanet administration; $p > 0.05$, enoxaparin plus 0.5 mg andexanet at the start vs. the end of andexanet administration. □ = Vehicle; ◆ = 0.5 mg andexanet; ■ = 1 mg andexanet; ◆ = 2 mg andexanet; ● = 4 mg andexanet.

Table 7: エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のラットで尾切断後に andexanet を投与したときの薬力学マーカー及び出血量

Group	Andexanet (μ M) T = (+)5	Andexanet (μ M) T = 45	Anti-fXa (IU/mL) T = 0	Anti-fXa (IU/mL) T = (+) 5	Anti-fXa (IU/mL) T = 45	Blood Loss (μ L) T = 45
Vehicle	ND	ND	ND	ND	ND	56 $\pm$ 142
Enoxaparin 4.5 mg/kg	ND	ND	5.49 $\pm$ 0.84	4.66 $\pm$ 0.64	2.71 $\pm$ 0.29	880 $\pm$ 418
Enoxaparin 4.5 mg/kg Andexanet 0.5 mg	0.54	0.1	5.61 $\pm$ 0.6	4.08 $\pm$ 0.32	2.91 $\pm$ 0.27	919 $\pm$ 196
Enoxaparin 4.5 mg/kg Andexanet 1 mg	1.1	0.2	5.85 $\pm$ 0.82	3.04 $\pm$ 0.95 ^a	2.81 $\pm$ 0.53	354 $\pm$ 366 ^b
Enoxaparin 4.5 mg/kg Andexanet 2 mg	1.8	0.3	5.58 $\pm$ 0.94	2.25 $\pm$ 0.90 ^a	2.71 $\pm$ 0.60	389 $\pm$ 338 ^b
Enoxaparin 4.5 mg/kg Andexanet 4 mg	4.3	0.7	5.43 $\pm$ 0.69	0.89 $\pm$ 0.44 ^a	2.83 $\pm$ 0.60	330 $\pm$ 249 ^c

fXa = Factor Xa; IV = Intravenous; ND = Not determined; SD = Standard deviation

Legend: Enoxaparin was administered IV at 4.5 mg/kg 5 minutes prior to tail transection. The tails were allowed to bleed for 10 minutes, and then andexanet was administered as an IV bolus over 5 minutes (15 minutes following the enoxaparin injection). Andexanet units are expressed as μ M; anti-fXa activity is expressed as IU/mL. Blood loss is expressed in μ L. Data are expressed as mean $\pm$ SD. N=7-10 animals/group.

^a $p \leq 0.002$ vs. anti-fXa activity from the start vs. the end of andexanet administration.

^b $p \leq 0.02$ vs. enoxaparin alone at study termination.

^c $p \leq 0.007$ vs. enoxaparin alone at study termination.

要約すると、エノキサパリンを投与した抗凝固状態下で実施した予防的ラット尾切断モデルの結果は、andexanet と ATIII のモル濃度比が約 1:1 である場合、出血量が非抗凝固状態下のラットのレベルまで減少することを示している（ラット血漿中 ATIII 濃度は約 3.5 μ mol/L¹⁾）。フォンダパリヌクスを投与した抗凝固状態下のラットにおいて、出血を完全に回復させ、抗 FXa 活性を顕著に減少させる andexanet と ATIII のモル濃度比は約 2:1 であったが、低用量フォンダパリヌクスでの検討は行わなかった。同様に、尾切断及び活動性出血の発現後に andexanet を投与した動物では、出血量が顕著に減少した。Andexanet の血漿中濃度が 1 μ mol/L の場合、抗凝固状態下のラットの出血量はエノキサパリン単独投与ラットと比較して約 40%減少し、andexanet の血漿中濃度が推定血漿中 ATIII 濃度を上回る場合においても、エノキサパリン誘導性の出血量のさらなる減少は認められなかった。

ウサギ予防的モデル

エノキサパリンの抗凝固作用に対する無効化について、ウサギ予防的肝臓創傷モデルを用いて検討した（NC-15-0611-R0001）。麻酔下の雄性 NZW ウサギ（約 3 ヶ月齢、各群 7~16 例）にエノキサパリン（4 mg/kg、溶媒：生理食塩水）をボーラス投与し、20 分後に溶媒（10 mmol/L Tris [pH

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）又は andexanet（5、15、35、75 又は 125 mg/例）を 5 分間かけてボーラス投与した後、肝臓に創傷を施した。創傷後 15 分間出血させ、出血量を測定した。実験の経過の概略図を Figure 50 に示す。

エノキサパリン（4 mg/kg）投与により、出血量が、溶媒単独群の 10.1 ± 4.2 g と比較しエノキサパリン単独投与群では 21.1 ± 3.9 g と約 2 倍増加した。抗凝固状態下のウサギに andexanet を肝臓創傷前に投与したところ、125 mg 投与群を除く全 andexanet 投与群で出血量がエノキサパリン単独投与群と比較して有意に減少した（ $P \leq 0.03$ 、最大 62.7%の減少）。125 mg 投与群では、出血量のばらつきが他の群よりも大きかったため、有意な減少は認められなかった（ $P = 0.07$ ）（Figure 51）。

出血量減少と一致して、andexanet は抗 FXa 活性を用量依存的に減少させた（Figure 52）。Andexanet 投与直前（エノキサパリンのボーラス投与 20 分後）の抗 FXa 活性は、エノキサパリン投与の全群で増加（平均 3.95 IU/mL、範囲 3.55～4.57 IU/mL）が認められ、血漿中 ATIII 濃度を上回っていた可能性があった。Andexanet 投与直後、高用量の 2 群（75 mg 及び 125 mg）では抗 FXa 活性が用量依存的に 70%～77%減少し、これは *in vitro* 試験及びラット尾切断試験で認められた最大の無効化と一致していた。15 分間出血の終了時点で、andexanet 投与群の抗 FXa 活性はエノキサパリン単独投与群とほぼ同程度の値に戻っていた（Figure 52、Table 8）。

Andexanet 投与終了時点（25 分）における抗 FXa 活性と andexanet 濃度の相関を Figure 53 に示す。Andexanet 濃度の増加に伴い抗 FXa 活性は減少したが、高用量の 2 群（75 mg 及び 125 mg）においてこの作用は 10 μ mol/L 以上で横這いになり、残存する抗 FXa 活性は約 1.0 IU/mL であった。

エノキサパリン投与により PT がわずかに延長（2.4%）したが、aPTT はベースライン（投与 0 分後）と比較して約 1.9 倍（投与 20 分後）延長した。Andexanet は、延長した aPTT を andexanet 投与直前（20 分）の aPTT 値と比較して 5、15、35、75 及び 125 mg 投与群でそれぞれ 44%、51%、45%、57%及び 58%用量依存的に短縮した。一方、エノキサパリン単独投与群では、aPTT の回復は認められなかった（Figure 54）。

要約すると、エノキサパリンを投与した抗凝固状態下で実施したウサギ予防的肝臓創傷モデルでの結果は、andexanet がエノキサパリンの抗凝固作用による出血量を顕著に減少させることを示しており、これは PD マーカー（抗 FXa 活性、aPTT）の回復と関連していた。エノキサパリンは、内在性の ATIII と結合して ATIII-エノキサパリン複合体を形成することにより抗凝固作用を発揮するため、エノキサパリンの用量が 4 mg/kg の場合には ATIII が限定反応物質となる可能性が高い。

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

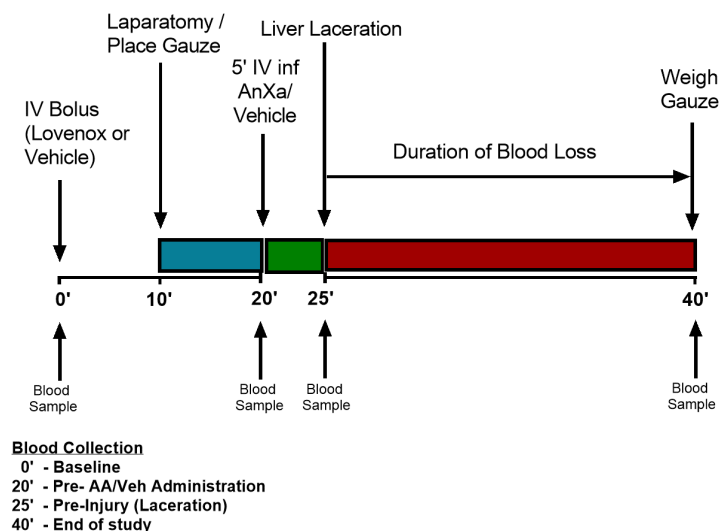
Table 8: エノキサパリンを投与した抗凝固状態下のウサギにおいて肝臓創傷前に andexanet を投与したときの薬力学マーカー及び出血量

Treatment Group	Enoxapa rin Dose	Andexanet Dose	Andexanet Concentraion (μM)		Anti-fXa Activity (IU/mL)			Blood Loss (gram)	
	(mg/kg)	mg/Rabbit	T=25	T=40	T=20	T=25	T=40	Mean±SD	P-value
Veh+Veh	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10.1 ± 4.2	NA
Enox+Veh	4	0	0.0	0.0	3.62	3.11	2.41	21.1 ± 3.9	NA
Enox+andexan et 5 mg	4	5	0.8	0.4	4.57	3.02	2.54	17.6 ± 1.7	0.03
Enox+andexan et 15 mg	4	15	2.6	1.2	3.76	2.22	2.14	16.0 ± 1.4	0.002
Enox+andexan et 35 mg	4	35	4.0	2.4	3.71	1.84	1.99	15.6 ± 3.2	0.003
Enox+andexan et 75 mg	4	75	9.3	5.9	3.55	1.04	1.82	14.2 ± 4.7	0.0007
Enox+andexan et 125 mg	4	125	16.5	10.3	4.47	0.98	2.28	16.6 ± 7.5	0.07

Enox = Enoxaparin; Veh = Vehicle; NA = Not applicable

Note: Anti-fXa activity and andexanet concentrations were measured at the indicated time points at T=20 min (prior to andexanet administration), T=25 min (at the end of 5 min andexanet administration) and T=40 min (at the end of 15 min blood loss). P-value was comparison between andexanet group vs Enox+Veh.

Figure 50: ウサギ肝臓創傷モデル試験経過の概略図



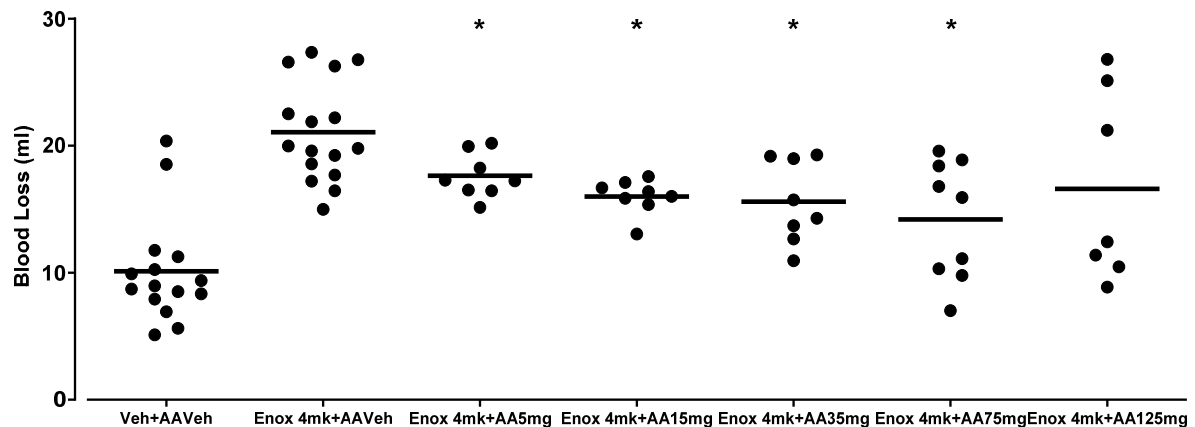
AnXa = Andexanet; aPTT = Activated partial thromboplastin time; IV = Intravenous; PT = Prothrombin time

Legend: Anesthetized rabbits were administered enoxaparin (4 mg/kg, IV bolus) and after 20 minutes, a 5-minute IV infusion of vehicle or andexanet (5, 15, 35, 75, or 125 mg/rabbit) was administered, and subsequently the liver was lacerated. Bleeding was allowed to continue for 15 minutes after the injury and blood loss was measured. Serial blood samples were obtained for measurement of anti-fXa activity, plasma concentrations of andexanet, and PT and aPTT.

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Figure 51: 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肝臓創傷後の andexanet による出血量の減少

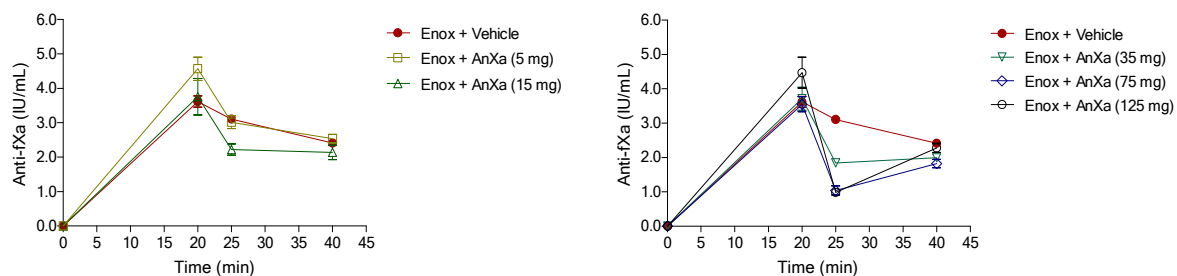


Enox = Enoxaparin; AA = Andexanet; mk = mg/kg; Veh = Vehicle

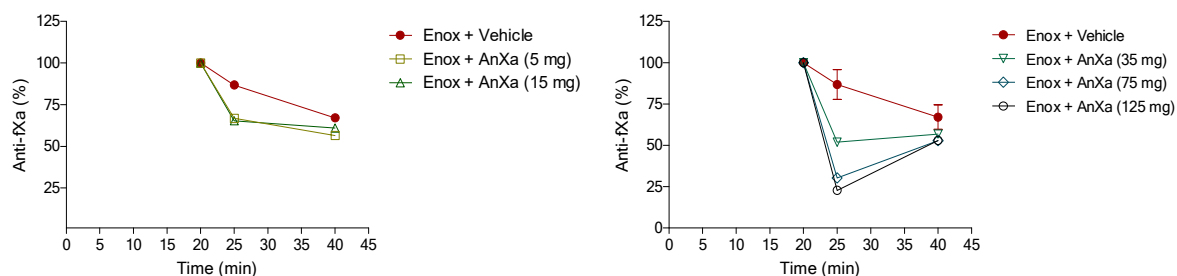
Legend: Andexanet reversed the anticoagulative effect of enoxaparin. A greater than 2-fold increase in blood loss was observed in rabbits treated with enoxaparin-plus-andexanet vehicle, vs those treated with vehicle-plus-vehicle. Andexanet administration to anticoagulated rabbits significantly reduced 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 Lovenox and administered andexanet vehicle.

Figure 52: 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 andexanet による抗 FXa 活性の無効化

a. Anti-fXa (IU/mL)



b. Anti-fXa (%)



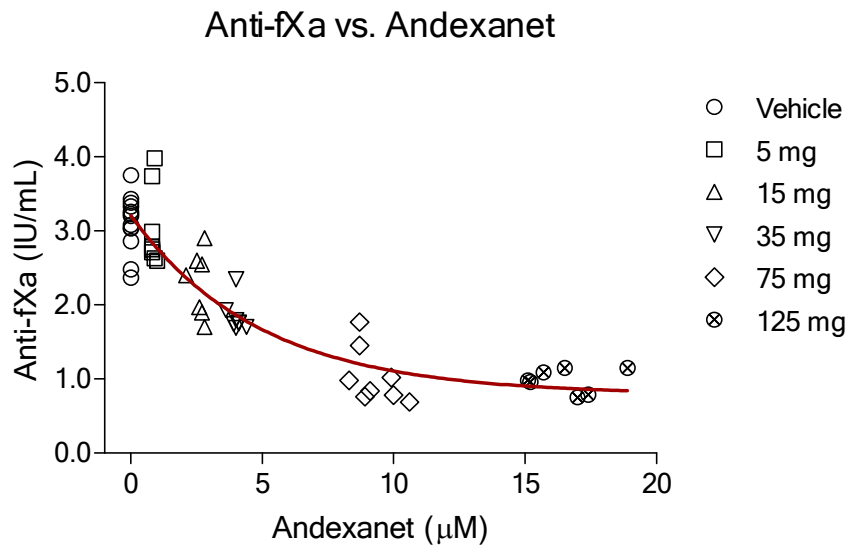
AnXa = Andexanet; Enox = Enoxaparin; fXa = Factor Xa; IV = Intravenous

Legend: Anti-fXa activity was below the limit of quantitation prior to anticoagulant administration and increased significantly 20 min following enoxaparin administration at the time of andexanet infusion. At the beginning of andexanet administration, anti-fXa activity levels were similar for both groups. After the 5-min IV bolus administration of andexanet (25-min time point), mean anti-fXa levels decreased for all andexanet dose levels.

a. Anti-fXa (IU/mL): mean anti-fXa level for each treatment group

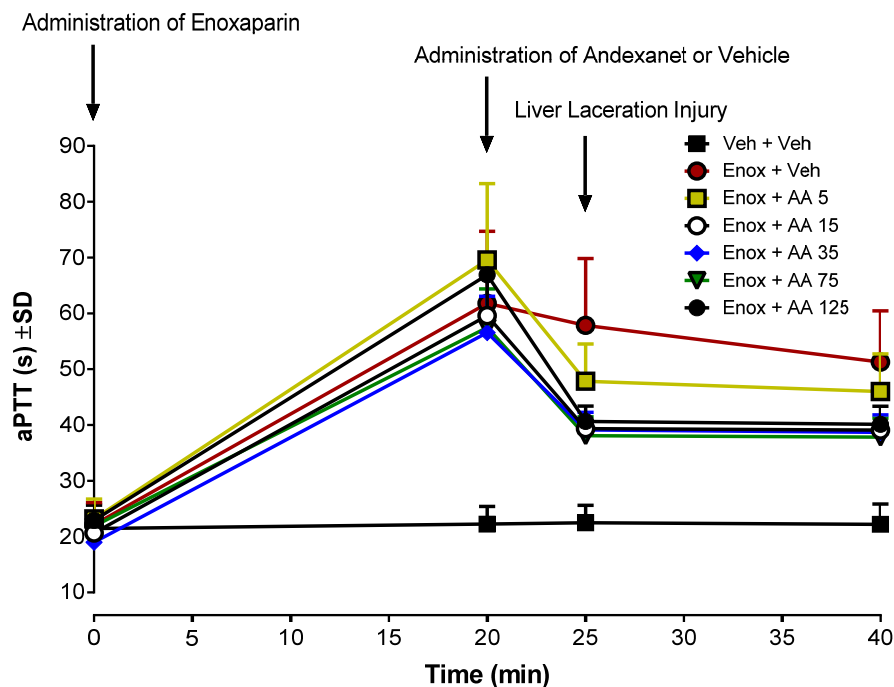
b. Anti-fXa (%): anti-fXa level normalized to pre-andexanet time point (20 min)

Figure 53: 抗 FXa 活性と andexanet 濃度の相関性



The anti-fXa activity (at 25 min) was plotted against the concentration of andexanet at the end of bolus (at 25 min) to show the dose-dependent reversal of anti-fXa activity by andexanet. Each data point represents an individual rabbit.

Figure 54: 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 andexanet による aPTT 延長の無効化



AA = Andexanet; aPTT = Activated partial thromboplastin time; Enox = Enoxaparin; Veh = Vehicle

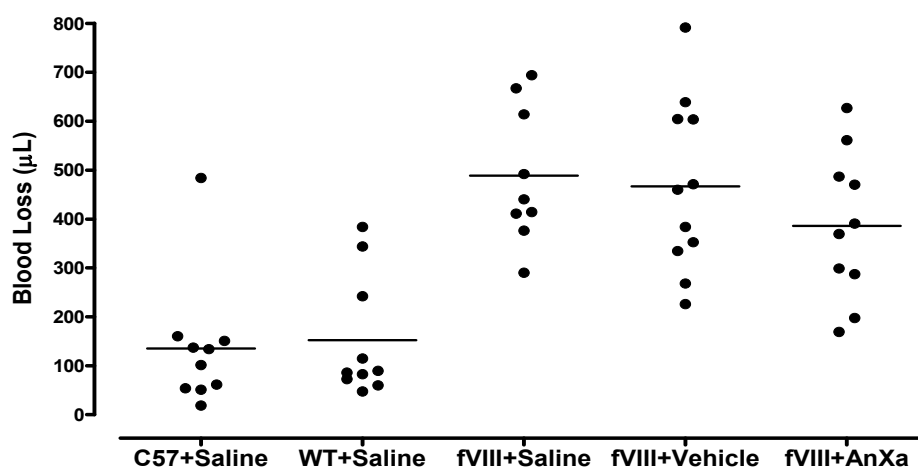
Andexanet の凝固促進及び抗凝固作用

Andexanet の凝固促進（血栓形成促進）又は抗凝固作用について、複数の血栓症モデルを用いて評価した。

雄性 Sprague-Dawley ラット（体重：315 ± 4 g、各群 4 例）での尾切断出血モデルにおいて、andexanet（溶媒：10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）は、全身曝露濃度 5 µmol/L までの単独投与で、凝固促進又は凝固阻害作用を示さなかった（NC-12-0444-R0001）。

Andexanet の出血時間に対する影響を、第 VIII 因子欠損（FVIII^{-/-}、7～10 週齢、雄、遺伝子改変マウス出血モデル）マウス、C57BL/6 マウス（1 親系統、9 週齢、雄）及び FVIII 野生型マウス（C57BL/6 と 129S1 F1 の交配による F2 ハイブリッド、7 週齢、雄）で比較した（NC-13-0512-R0001）。麻酔下の雄性マウス（各群 9～11 例）を用い、尾切断の 2 分前に andexanet を投与した（600 µg/200 µL/例、外側尾静脈からのボーラス投与、溶媒：10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）。尾先端を切断した後、尾を温生理食塩水に 15 分間浸して出血させた。マウス尾切断モデルと同様に、andexanet 投与（全身曝露濃度 2.5 µmol/L）による血栓形成促進及び出血量減少は認められなかった（Figure 55）。平均出血量は、生理食塩水（489 µL）又は andexanet 溶媒（467 µL）投与の FVIII^{-/-}マウスと andexanet（403 µL）投与マウスにおいて同程度であった（生理食塩水投与群との比較で P=0.2、溶媒投与群との比較で P=0.4）。出血量は、C57BL/6 又は FVIII 野生型マウス（F2 ハイブリッド）に比べ、FVIII^{-/-}マウスで約 3 倍増加した。

Figure 55: FVIII 欠損マウスにおける andexanet の出血量に対する影響



AnXa = Andexanet; fVIII = Factor VIII-deficient mouse; C57 = C57BL/6 mice; WT = Wild type mouse F2 hybrid resulting from F1 x F1 mating (C57BL/6 x 129S1), the background strain for fVIII^{-/-} mice.

Legend: Anesthetised mice were administered saline, vehicle, or andexanet 2 minutes prior to tail transection, and tails were allowed to bleed into warm saline for 15 minutes. At the end of the blood loss period, mice were sacrificed and a terminal blood sample was obtained via cardiocentesis for determination andexanet concentration. Each data point represents an individual mouse.

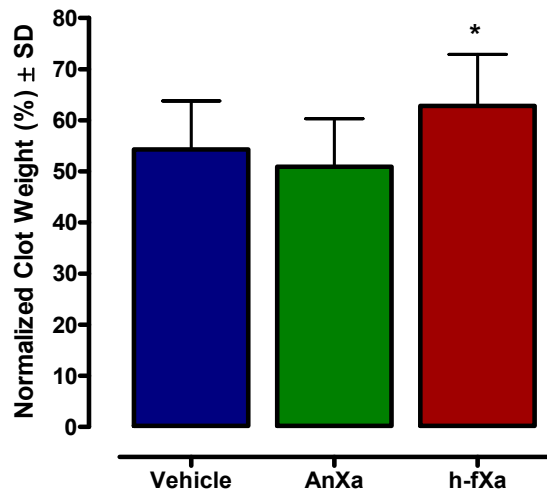
ラット Wessler 静脈うっ血性血栓症モデル（体重：380.7 ± 32.9 g、雄性 Sprague-Dawley ラット、各群 12～14 例）では、ラット全血及び希釈トロンボプラスチンに、溶媒（10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80）、andexanet（最終濃度 3 µmol/L）又はヒト FXa（陽性対照、最終濃度 50 nmol/L）のいずれかを予め混合したカクテル 100 µL を頸静脈の特定部位から投与した（NC-12-0420-R0001）。血管枝を速やかに結紮し、30 分間血栓が生じる状態を維

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

持した。頸静脈の該当部位を回収した後、補正血栓重量を測定した。補正血栓重量%はヒト FXa 投与群 ($62.8 \pm 10.08\%$) で溶媒投与群 ($54.3 \pm 9.52\%$) に比較して顕著に増加した ($P=0.04$) (Figure 56)。Andexanet 投与群 ($50.9 \pm 9.41\%$) では、溶媒投与群と比較して静脈の特定部位での補正血栓重量に顕著な差異は認められず ($P=0.36$)、andexanet はこの濃度では凝固促進作用を有さないことが示された。

Figure 56: ラット Wessler 静脈うっ血性血栓症モデルにおける Andexanet の凝固促進作用



AnXa = Andexanet; h-fXa = Human factor Xa

Legend: Andexanet pro- or anticoagulant effects were assessed in the rat Wessler venous stasis model. Whole blood (875 μ L) was added to a dilute mixture of thromboplastin (50 μ L) and 100 μ L of one of the test agents (vehicle, andexanet, or human FXa), mixed rapidly, and injected via a catheter into an isolated segment of the rat jugular vein. The vein segment was immediately ligated and clot formation allowed to occur for 30 minutes. The segment was harvested, and the clot weighed. Normalised clot weight was expressed as a percentage of the solid thrombus weight divided by the total weight of the segment minus the vessel and ligature weight. Human FXa increased clot weight significantly ($p = 0.04$ vs. vehicle), while andexanet had no effect ($p = 0.36$ vs. vehicle). N=12-14 per group.

Andexanet の抗凝固作用は、andexanet とプロトロンビン複合体との結合能を保持する不活化 FXa のヒト EGR-FXa を併用投与した雄性 Sprague-Dawley ラット（体重： 335 ± 18 g、各群 5～6 例）を用いて評価した (NC-12-0445-R0001)。EGR-Xa は広く用いられており、様々な動物種において PT 及び aPTT 延長で示される強力な抗血栓作用を示すことが知られている^{10),11)}。本試験において、麻酔下ラットに PT 及び aPTT が約 30%～50%延長する曝露濃度まで EGR-Xa (0.5 mg/kg/hr、溶媒：20 mmol/L Hepes、150 mmol/L NaCl、pH 7.4) を 45 分間静脈内投与し、その後は、andexanet (溶媒：10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80) のボラス投与 (1 mg/例) に引き続き 1.5 mg/hr での 45 分間静脈内投与を併用した。EGR-Xa (1.0 mg/kg/hr) の投与は、対照として抗凝固作用増加の確認のために行った。血液試料は EGR-Xa 及び andexanet の濃度測定と抗凝固パラメータの測定のために経時的に採取した。

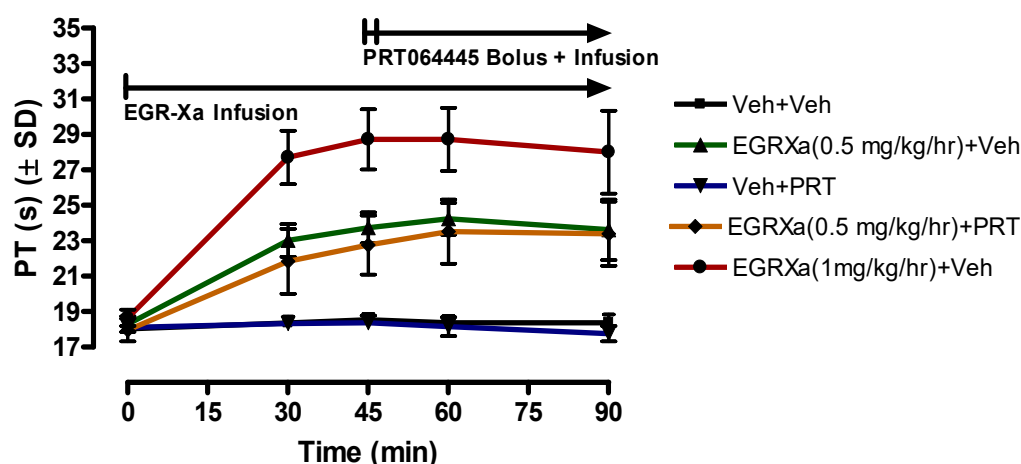
Andexanet は上記条件下では抗凝固作用を示さなかった (Figure 57)。0.5 mg/kg/hr の静脈内投与では、EGR-Xa の平均血漿中濃度は試験期間を通じて約 0.05～0.06 μ mol/L で推移し、ボラス投与 15 分後及び持続静脈内投与並びに血液試料採取の期間を通じて、andexanet が EGR-Xa に比べ 10 倍程度高い濃度を示した。90 分の試験終了時では、PT の平均値は溶媒投与群の 14.5 ± 0.42 秒から、EGR-Xa (0.5 mg/kg/hr) + 溶媒群で 19.9 ± 0.04 秒に、また EGR-Xa+andexanet 群で 22 ± 1.28 秒と

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

延長した ($P>0.05$ 、EGR-Xa 投与群と EGR-Xa+andexanet 投与群との比較)。両群とも溶媒投与群に比べて同程度の有意な PT 延長を示した ($P=0.004$ 、溶媒投与群と各被験物質投与群との比較)。aPTT も同様な傾向であった。Andexanet を EGR-Xa と併用投与した場合、PT のさらなる延長は認められなかったことから、これらの条件下において andexanet は抗凝固作用を有しないことが示された。

Figure 57: Andexanet と EGR-Xa 併用時のプロトロンビン時間に及ぼす影響



aPTT = Activated partial thromboplastin time; EGR-Xa = Glu-Gly-Arg-Xa (an active site inhibited FXa); PRT = Andexanet; PT = Prothrombin time; Veh = Vehicle

Legend: Andexanet does not increase PT or aPTT (data not shown), co-administered with a potent anticoagulant, EGR-Xa). EGR-Xa was infused at 0.5 mg/kg/hr or 1.0 mg/kg/hr for 90 minutes, resulting in a dose-dependent increase in PT prolongation. Administration of andexanet as an IV bolus (1 mg), followed immediately by infusion (1.5 mg/hr) for 45 minutes, did not result in a further increase in PT prolongation, demonstrating that andexanet does not have anticoagulant effects in rats.

Andexanet の FXa 阻害剤に対する選択性は、直接作用型 IIa 阻害剤を投与した抗凝固状態下のウサギを用いて評価し、予防的試験デザインで肝臓創傷後の出血量を測定した (NC-13-0495-R0001)。本試験では、直接作用型 IIa 阻害剤である bivalirudin (総投与量 1.62 mg/kg、未承認製剤) 又は溶媒 (生理食塩水) を雄性 NZW ウサギ (約 3 ヶ月齢、各群 5~8 例) に持続静脈内投与した。抗凝固剤又は溶媒の投与開始から 10 分後に、andexanet (75 mg/例、溶媒 : 10 mmol/L Tris [pH 7.8]、95 mmol/L L-Arg HCl、4% Sucrose、0.01% Tween 80) を 5 分間かけてボラス投与した。Andexanet の投与終了直後に、2.2.1 項に記載したように肝臓に創傷を施し、15 分間にわたり出血量を測定した。抗凝固状態下のウサギにおける平均出血量は、溶媒投与群の約 10 g から約 33 g へ 3 倍増加した。抗凝固状態下のウサギにおける andexanet (曝露濃度 10 $\mu\text{mol/L}$) 投与では、出血量に有意な減少はなかった (約 33 g から約 30 g への変化、 $P>0.05$)。過去の試験で認められたように、非抗凝固状態下のウサギに andexanet を単独投与しても、出血量は減少しなかった ($P>0.05$ 、andexanet 投与群で約 7 g、溶媒投与群で約 10 g)。

結論として、十分に特性が明らかにされている複数の動物モデルにおいて、andexanet は凝固促進及び抗凝固作用を示さなかった。Andexanet 投与による抗凝固作用の無効化は、FXa 阻害剤を投与した動物でのみ認められ、直接作用型 IIa 阻害剤を投与した動物では認められなかった。凝固促進作用を示さないことは、ウサギ出血モデルにおいて抗凝固剤非存在下で andexanet の曝露濃度を 10 $\mu\text{mol/L}$ まで上げた条件下でも確認した。

4 安全性薬理試験

4.1 *In vivo* 安全性薬理試験

4.1.1 Andexanet の呼吸器系及び中枢神経系に関する安全性薬理試験（NC-11-0395-R0001 及び NC-11-0396-R0001）

ヘッドアウトプレチスモグラフィを用いた呼吸機能評価のための医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に適合した試験（NC-11-0395-R0001）では、1 群 8 例の雄性 Crl:CD（Sprague-Dawley）ラットに对照溶媒又は andexanet 3、10 及び 30 mg/kg を 10 mL/kg の投与容量で 3 分間かけて単回静脈内投与した。一回換気量、呼吸数及び分時換気量は、投与前日及び投与直後に測定し、さらに投与 24 時間後に再度測定した。Andexanet の単回投与による死亡例はみられず、一般状態及び呼吸機能（投与 24 時間後までの一回換気量、呼吸数及び分時換気量に基づいて評価）にも影響は認められなかった。

4.1.2 中枢神経系に関する安全性薬理

神経学的機能への影響に関する評価では、1 群 6 例の雄性 Crl:CD（Sprague-Dawley）ラットに对照溶媒又は andexanet 3、10 及び 30 mg/kg を 10 mL/kg の投与容量で単回静脈内投与した（NC-11-0396-R0001）。神経学的影響の評価は、投与前並びに投与後 5 分、1、2、4 及び 24 時間経過後に実施した。全例について改変 Irwin 法総合観察評価を実施し、中枢神経系及び末梢神経系に及ぼす影響を評価した。投与後 24 時間まで、andexanet の単回投与による死亡や一般状態の変化はみられず、改変 Irwin 法総合観察評価（ホームケージ内観察、手持ち観察、オープンフィールド観察及び誘発行動）のいずれの評価項目でも影響は認められなかった。

4.1.3 心血管系に関する安全性薬理（NC-11-0394-R0001）

心血管系の安全性薬理パラメータは、カニクイザルの 14 日間反復投与毒性試験の一環として評価した。本試験（NC-11-0394-R0001）では、andexanet を 6、20 及び 60 mg/kg/day（2 分割し、1 日 2 回投与）で 3 日に 1 回、合計 10 回、毎回 2 分間かけて静脈内投与した。麻酔下カニクイザルの多誘導 ECG データは、投与前及び投与期間 Day 10 の 1 回目投与後約 1 時間に測定した〔各群 10 例（雌雄各 5 例）〕。さらに、自由行動下の覚醒動物での ECG 評価は、体外ジャケット式テレメトリ（JET™）を用いて Day 7 に実施し、血圧測定は Cardell®カフモニターを用いて Day 7 に実施した。結果を对照溶媒投与群と比較した。Day 7 の評価は、andexanet の投与直前、投与中及び投与後 24 時間にわたり実施した。Andexanet を 6、20 及び 60 mg/kg/day の用量で投与したカニクイザルにおいて、血圧及び ECG に異常は認められなかった。

5 薬力学的薬物相互作用試験

該当資料なし

6 考察及び結論

総合すると、一連の *in vivo* 試験から、andexanet による FXa 阻害剤の抗凝固作用に対する速やかな無効化は、種々の出血及び血栓症モデル動物において、凝固促進又は凝固阻害作用を促進することなく止血能を回復させ、間接及び直接作用型 FXa 阻害剤の抗凝固作用により生じる出血を抑制することが示された。重要な点として、エドキサバン及びエノキサパリンなどの複数の FXa 阻害剤を用いた動物モデルでの試験において、抗凝固に関連する PK 及び PD マーカーは、出血量の減少とよく相関していることが示された。

ウサギ肝臓創傷モデルにおける andexanet と他の FXa 阻害剤無効化作用の薬剤 (rFVIIa、3F-PCC 及び 4F-PCC) との比較から、andexanet のみが有意に出血量、抗 FXa 活性、PT 及び aPTT 並びに直接作用型 FXa 阻害剤の血漿中非結合型濃度を減少又は短縮させることが示された。

雄性ラットにおける CNS 及び呼吸器系の安全性薬理試験では、MFD である 30 mg/kg まで有害な作用は認められなかった。Andexanet は、他のタンパク質製剤と同様にイオンチャネルと強く相互作用する可能性がほとんどないため、hERG 及びプルキンエ線維などの *in vitro* 試験では検討されていない。カニクイザルを用いた 14 日間反復静脈内投与毒性試験の一環として、andexanet の心血管系に対する安全性評価を実施した。その結果、ECG パラメータや血圧への影響は認められなかった。

7 参考文献

- 1) van Amsterdam, R., et al., *Synthetic analogues of the antithrombin III-binding pentasaccharide sequence of heparin. Prediction of in vivo residence times.* Arterioscler Thromb Vasc Biol., 1995. 15(4): p. 495-503.
- 2) Perzborn, E., et al., *In vitro and in vivo studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct Factor Xa inhibitor.* J. Thromb. Haemost., 2005. 3(3): p. 514–521.
- 3) Pinto, D., Orwat MJ, Koch S, Rossi KA, Alexander RS, Smallwood A, Wong PC, Rendina AR, Luettggen JM, Knabb RM, He K, Xin B, Wexler RR, Lam PYS., *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, 2007. 50: p. 5339-5356.
- 4) Zhang, P., et al., *Discovery of betrixaban (PRT054021), N-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-(N,N-dimethylcarbamimidoyl)benzamido)-5-methoxybenz amide, a highly potent, selective, and orally efficacious factor Xa inhibitor.* Bioorg Med Chem Lett, 2009. 19(8): p. 2179-85.
- 5) Furugohri, T., Isobe K, Honda Y, Kamisato-Matsumoto C, Sugiyama N, Nagahara T, Morishima Y, Shibano T., *DU-176b, a potent and orally active factor Xa inhibitor: in vitro and in vivo pharmacological profiles.* Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008. 6(9): p. 1542-1549.
- 6) Lu, G., et al., *A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa.* Nature Medicine, 2013. 19: p. 446-451.
- 7) Paolucci, F., et.al., *Fondaparinux sodium mechanism of action: identification of specific binding to purified and human plasma-derived proteins.* Clin Pharmacokinet, 2002. 41(Suppl 2): p. 11-8.
- 8) Baugh, R.J., G.J. Broze, Jr., and S. Krishnaswamy, *Regulation of extrinsic pathway factor Xa formation by tissue factor pathway inhibitor.* J Biol Chem, 1998. 273(8): p. 4378-86.
- 9) Mueck, W., et al., *Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Profile of Rivaroxaban.* Clin Pharmacokinet, 2014. 53: p. 1–16.
- 10) Hollenbach S, S.U., Lin PH, Needham K, Frey L, Hancock TE, et al., *A comparative study of prothrombinase and thrombin inhibitors in a novel rabbit model of non-occlusive deep vein thrombosis.* Thromb Haemostasis, 1994. 71: p. 357-362.
- 11) Wong, A., et al., *Relative efficacy of active site-blocked factors IXa, Xa in models of rabbit venous and arterio-venous thrombosis.* Thrombosis and Haemostasis, 1997. 77(6).
- 12) Grottke O, Braunschweig T, Rossaint R, et al. Transient or extended reversal of apixaban anticoagulation by andexanet alfa is equally effective in a porcine polytrauma model. Br J Anaesth. 2019;123(2):186-195. doi:10.1016/j.bja.2019.04.059
- 13) Oliver Grottke, Necib Akman, Till Braunschweig, Pamela B. Conley, Rolf Rossaint; 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>
- 14) Wong et al, Hosp Pract, 2013, 41(1):19-25.
- 15) Eerenberg et al, Circulation, 2011, 124(14):1573-9.
- 16) “Andexanet-alfa and PER977 (Aripazine) Correct Blood Loss in a Rabbit Liver Laceration Model – Only Andexanet Reverses Markers of fXa-mediated Anticoagulation” Hollenbach et al, AHA2014 Poster

2.6.2 薬理試験の概要文

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

- 17) Lu G, Pine P, Leeds JM, DeGuzman F, Pratikhya P, Lin J, et al. (2018) Andexanet alfa effectively reverses edoxaban anticoagulation effects and associated bleeding in a rabbit acute hemorrhage model. PLoS ONE 13(3): e0195122. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195122>

TABLE OF CONTENTS

2.6.3	薬理試験概要表	2
1	薬理試験：一覧表	2
1.1	In Vitro	2
1.2	In Vivo.....	5
2	効力を裏付ける試験	8
2.1	In Vitro	8
2.2	In Vivo.....	10
3	副次的薬理試験	16
3.1	In Vitro	16
3.2	In Vivo.....	24
4	安全性薬理試験	29
5	薬力学的薬物相互作用試験	30

LIST OF TABLES

Table 1:	Pharmacology – In Vitro	2
Table 2:	Pharmacology – In Vivo.....	5
Table 3:	Primary Pharmacodynamics – In Vitro	8
Table 4:	Primary Pharmacodynamics – In Vivo.....	10
Table 5:	Secondary Pharmacology – In Vitro	16
Table 6:	Secondary Pharmacology– In Vivo.....	24
Table 7:	Safety Pharmacology	29

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

2.6.3 薬理試験概要表

1 薬理試験：一覧表

1.1 In Vitro

Table 1: Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics – <i>In Vitro</i>				
Affinity to FXa Inhibitors				
Andexanet binding affinity to direct FXa inhibitors	Buffered system	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0435-R0001 NC-13-0565-R0001
Reversal of anti-FXa in Human Plasma				
Reversal of direct FXa inhibitor-induced anti-FXa activity	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0436-R0001 NC-13-0565-R0001
Reversal of Inhibition of Thrombin Generation with TF-dependent Thrombin Generation Assay				
Reversal of direct FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0452-R0001 NC-13-0565-R0001
Secondary Pharmacology – <i>In Vitro</i>				
Affinity to FXa Inhibitors				
Andexanet binding affinity to indirect FXa inhibitors	Buffered system	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0455-R0001
Reversal of anti-FXa in Human Plasma				
Reversal of indirect FXa inhibitor-induced anti-FXa activity	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0434-R0002
Reversal of heparin and enoxaparin anti-IIa activity by andexanet	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-16-0738-R0001
Reversal of Inhibition of Thrombin Generation with TF-dependent Thrombin Generation Assay				
Reversal of indirect FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0458-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 1: Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Reversal of direct and indirect FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation in plasma	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	RPD-000594
Interaction with Major Plasma Coagulation Proteins				
Interaction of andexanet with major plasma coagulation proteins and plasma inhibitors (Biacore™)	Biacore	<i>In vitro</i>	██████ ██████ ██████	NC-12-0459-R0001 NC-12-0460-R0001 NC-12-0461-R0001
Interaction with TFPI				
Effect of andexanet on TFPI function in buffered system as measured by FXa and fVIIa/TF activity	Buffered system	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0450-R0001
Andexanet interaction with TFPI on HUVECs with or without rivaroxaban	HUVECs	<i>In vitro</i>	PPI	NC-15-0662-R0001
Effect of andexanet-TFPI interaction on thrombin generation - correlation with anti-fXa using normal and TFPI-depleted plasma	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-15-0659-R0003
Reversal of Inhibition of Thrombin Generation with Non-TF-dependent Thrombin Generation Assay				
Reversal of direct FXa inhibitor (betrixaban)-induced inhibition of thrombin generation	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-13-0560-R0001 NC-14-0569-R0001
Lack of Catalytic Activity				
Effect of andexanet on FXa chromogenic activity in buffer	Buffered system	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0435-R0001
Effect of andexanet on prothrombin activation by the prothrombinase complex in a reconstituted system	Buffered system	<i>In vitro</i>	PPI	NC-15-0667-R0001
Effect of andexanet on TF-initiated thrombin generation in human plasma	Pooled human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0451-R0001
Effect of andexanet on F1+2 and TAT biomarkers in human whole blood	Human whole blood	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0439-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 1: Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Effect of andexanet on non-TF-initiated thrombin generation in human plasma	Human plasma	<i>In vitro</i>	PPI	NC-13-0560-R0001 NC-14-0569-R0001
Cell-based assays for the effect of andexanet on: (a) P-Selectin expression in human platelets (b) Effect of andexanet on intracellular calcium release in TF-1 cells (c) Effect of andexanet on intracellular calcium release in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	(a) Washed human platelets (b) TF-1 cells (c) HUVECs	<i>In vitro</i>	PPI	NC-12-0438-R0001

FXa = Factor Xa; HUVECs = Human umbilical vein endothelial cells; PPI = Portola Pharmaceuticals, Inc.; TAT = Thrombin-Antithrombin complex; TF = Tissue factor; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

1.2 In Vivo

Table 2: Pharmacology – In Vivo

Overview			Test Article: andexanet, other reversal agents, and FXa inhibitors	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Primary Pharmacodynamics – <i>In Vivo</i>				
Tail Transection - Blood Loss	Mouse, C57BL/6	Rivaroxaban, PO gavage Aspirin, PO in drinking water Aandexanet IV, bolus	PPI	NC-12-0457-R0001
PK-PD	Rat, SD	Betrixaban, IV Apixaban, IV Aandexanet, IV bolus infusion for 5 minutes, followed by continuous infusion	PPI	NC-12-0449-R0001
PK-PD	Rat, SD	Rivaroxaban, IV infusion Aandexanet, IV bolus infusion over 5 minutes, followed by continuous IV infusion	PPI	NC-12-0453-R0001
Liver Laceration - Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	Rivaroxaban IV bolus rfVIIa, 3F- PCC, IV bolus Aandexanet IV bolus infusion, 25 mL, 5 mL/min	PPI	NC-13-0561-R0001 NC-13-0561-R0002
Liver Laceration - Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	Edoxaban, IV bolus Aandexanet IV bolus infusion, 25 mL, 5 mL/min	PPI	NC-13-0567-R0001 NC-13-0567-R0002
Liver Laceration - Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	Rivaroxaban IV bolus 4F-PCC IV bolus Aandexanet IV bolus infusion 5 minutes (7.5 mL)	PPI	NC-14-0573-R0001 NC-14-0573-R0002

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 2: Pharmacology – In Vivo

Overview			Test Article: andexanet, other reversal agents, and FXa inhibitors	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
Liver Laceration - Blood Loss (Treatment model)	Rabbit, NZW	Rivaroxaban IV bolus Aandexanet IV bolus infusion, 25 mL, 5 mL/min	PPI	NC-14-0575-R0001
Poly-trauma Model-Blood Loss (Treatment model)	Pig, German Landrace	Apixaban oral dose (20 mg/kg/day) Aandexanet bolus (1000 mg) or bolus plus 2 hour infusion, at 10 mg/min	■■■■■ ■■■■■ ■■■■■	NC-17-0798-R0001
Secondary Pharmacology – In Vivo				
Tail Transection - Blood Loss	Rat, SD	Enoxaparin, IV bolus Aandexanet, IV bolus infusion, followed by continuous IV infusion	PPI	NC-12-0432-R0001
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Rat, SD	Enoxaparin, IV bolus Aandexanet, IV bolus infusion for 5 minutes, followed by continuous infusion protamine sulphate IV bolus	PPI	NC-12-0454-R0001
Tail Transection - Blood Loss	Rat, SD	Fondaparinux IV bolus Aandexanet, IV bolus infusion 5 minutes, followed by continuous infusion protamine sulphate IV bolus	PPI	NC-12-0456-R0001
Tail Transection - Blood Loss	Rat, SD	Enoxaparin, IV bolus Aandexanet, IV bolus infusion	PPI	NC-12-0437-R0001
Liver Laceration - Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	Enoxaparin IV bolus	PPI	NC-15-0611-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 2: Pharmacology – In Vivo

Overview			Test Article: andexanet, other reversal agents, and FXa inhibitors	
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number
		Aandexanet IV bolus infusion 5 minutes		
Tail Transection - Blood Loss	Mouse, fVIII ^{-/-} C57BL/6	Aandexanet IV bolus	PPI	NC-13-0512-R0001
Wessler Venous Stasis Thrombosis Model	Rat, SD	Mixture injected IV	PPI	NC-12-0420-R0001
Tail Transection - Blood Loss	Rat, SD	Aandexanet, IV bolus infusion for 5 minutes	PPI	NC-12-0444-R0001
PK-PD	Rat, SD	hEGR-Xa IV infusion Aandexanet, IV infusion	PPI	NC-12-0445-R0001
Liver Laceration - Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	Bivalirudin IV bolus-plus-infusion Aandexanet IV bolus infusion	PPI	NC-13-0495-R0001
Safety Pharmacology				
Respiratory	Rat, SD	Intravenous	([REDACTED] >)	NC-11-0395
CNS	Rat, SD	Intravenous	([REDACTED] >)	NC-11-0396
Cardiovascular	Cynomolgus Monkey	Intravenous	([REDACTED] >)	NC-11-0394

PPI = Portola Pharmaceuticals, Inc.; 3-F PCC = three factor prothrombin complex concentrate; fVIII = Factor VIII; FXa = Factor Xa; IV = Intravenous; NZW = New Zealand white; PD = Pharmacodynamics; PK = Pharmacokinetics; rfVIIa = Recombinant factor VIIa; SD = Sprague Dawley

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

2 効力を裏付ける試験

2.1 In Vitro

Table 3: Primary Pharmacodynamics – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Primary Pharmacodynamics – <i>In Vitro</i>					
Affinity to FXa Inhibitors					
Andexanet binding affinity to direct FXa inhibitors	Buffered system	Measuring FXa enzymatic activity for cleavage of a peptidyl substrate Spectrazyme-FXa	FXa: 3.0 nM; FXa inhibitors (0-7.5 nM); Andexanet (0-250 nM or 500 nM)	Andexanet dose-dependently and completely reversed inhibition of FXa by rivaroxaban, apixaban, betrixaban and edoxaban with andexanet-inhibitor binding affinity (Kd) ranging from 0.5 nM to 1.5 nM.	NC-12-0435-R0001 NC-13-0565-R0001
Reversal of anti-fXa in Human Plasma					
Reversal of direct FXa inhibitor-induced anti-fXa activity	Human plasma	Measuring anti-fXa activity in human plasma	FXa inhibitor: 100 ng/mL; Andexanet: 0-2.5 µM	Andexanet dose-dependently and completely reversed the anti-fXa activity of each inhibitor (rivaroxaban, apixaban, betrixaban, and edoxaban).	NC-12-0436-R0001 NC-13-0565-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 3: Primary Pharmacodynamics – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Reversal of Inhibition of Thrombin Generation with TF-dependent Thrombin Generation Assay					
Reversal of direct FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation	Human plasma	Measuring TF-initiated thrombin generation in human plasma by an in-house thrombin generation assay (TGA) or the calibrated automated thrombogram (CAT)	In-house TGA: FXa inhibitor (rivaroxaban, apixaban, and betrixaban): 200 nM; Andexanet: 0-1.0 µM. CAT: Edoxaban: 0-1.0 µM; Andexanet: 0-3.0 µM	Andexanet dose-dependently and completely reversed direct FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation.	NC-12-0452-R0001 NC-13-0565-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

2.2 In Vivo

Table 4: Primary Pharmacodynamics – In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Primary Pharmacodynamics – <i>In Vivo</i>						
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Mouse, C57BL/6	Intravenous (andexanet) Oral in drinking water (aspirin) Oral gavage (rivaroxaban)	960 µg/mouse andexanet IV (once only, 200 µL/ mouse); ~100 mg/kg/day aspirin (drinking water, 5-7 days); 50 mg/kg rivaroxaban.	Male N=5-8	Andexanet reduced the increase in blood loss, anti-fXa activity, and whole blood INR in rivaroxaban/aspirin-anticoagulated mice.	NC-12-0457-R0001
PK-PD	Rat, SD	Intravenous bolus (5 minutes) followed by infusion (55 minutes) (andexanet) Intravenous infusion (apixaban) Intravenous infusion (betrixaban)	6 mg + 6 mg/hr andexanet 0.5 mg/kg/hr apixaban 1.0 mg/kg/hr betrixaban	Male N=4-67	Andexanet reversed apixaban anticoagulation as measured by INR or PT at a molar ratio of plasma andexanet:total apixaban of ~1.2:1. For betrixaban, molar ratios of andexanet of ~2.0 (4.4 µM andexanet:2.2 µM betrixaban) were shown to reverse the 2-fold increase in INR. <u>Note:</u> Only 1 dose level of andexanet was used in this study. Andexanet rapidly reversed the 2-fold increase in whole blood INR observed following apixaban or betrixaban infusion.	NC-12-0449-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 4: Primary Pharmacodynamics – In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PK-PD	Rat, SD	Intravenous bolus (5 minutes) followed by infusion (55 minutes) (andexanet) Intravenous infusion (rivaroxaban).	4 mg + 4 mg/hr andexanet 0.25 mg/kg/hr rivaroxaban	Male N=4-5	Reversal of rivaroxaban anticoagulation as measured by decreases in INR or PT could be sustained with an IV bolus-plus-infusion of andexanet. A 2-fold molar ratio of andexanet:rivaroxaban was sufficient to completely reverse the 2-fold increase in whole blood INR. As the molar ratio decreased to less than 2-fold, INR increased corresponding to increased levels of free rivaroxaban. Andexanet reverses anticoagulation for rivaroxaban in a similar manner as for apixaban and betrixaban.	NC-12-0453-R0001
Liver Laceration - Blood Loss Prophylactic	Rabbit, NZW	Intravenous bolus over 5 minutes (andexanet) (rfVIIa) (3F- PCC) Intravenous bolus (rivaroxaban)	150 µg/kg, rfVIIa, 60 IU/kg, 3F-PCC, 75 mg/rabbit andexanet, 1 mg/kg rivaroxaban	Male N=6-12	Prophylactic reversal of anticoagulation in rivaroxaban-treated rabbits with andexanet (75 mg/rabbit) significantly reduced mean blood loss from 22.6 ± 9.32 grams to 10.4 ± 5.56 grams (p < 0.01 anticoagulated rabbits vs. anticoagulated rabbits treated with andexanet). Administration of rfVIIa (150 µg/kg) or 3F-PCC (60 IU/kg) in rivaroxaban-anticoagulated rabbits had no effect on blood loss. Administration of andexanet, rfVIIa or 3F-PCC alone did not affect blood loss in the absence of rivaroxaban, and no evidence of pro-coagulant or anticoagulant activity was apparent for any of the agents tested in this study.	NC-13-0561-R0001 NC-13-0561-R0002

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 4: Primary Pharmacodynamics – In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Liver Laceration - Blood Loss Prophylactic	Rabbit, NZW	Intravenous bolus over 5 minutes (andexanet) Intravenous bolus (edoxaban)	75 mg andexanet 1 mg/kg edoxaban	Male N=5-11	Andexanet (75 mg/rabbit) significantly reduced the edoxaban-induced increase in blood loss from 22.2 ± 8.9 grams in the edoxaban-plus-vehicle treated rabbits to 11.9 ± 3.7 grams ($p=0.003$ vs. edoxaban-plus-vehicle alone). Andexanet reduced the mean anti-fXa activity, which correlated with the reduction in unbound edoxaban plasma concentration. The total (bound and unbound) mean edoxaban plasma concentration increased from $0.64 \mu\text{M}$ just prior to andexanet administration to $6.7 \mu\text{M}$ immediately following andexanet administration, demonstrating that a 1.6:1 molar ratio of andexanet to total edoxaban was able to reverse edoxaban-induced bleeding.	NC-13-0567-R0001 NC-13-0567-R0002

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 4: Primary Pharmacodynamics – In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Liver Laceration - Blood Loss Prophylactic	Rabbit, NZW	Intravenous bolus over 5 minutes (andexanet) Intravenous bolus (rivaroxaban) Intravenous bolus over 5 minutes (4F- PCC)	75 mg andexanet 100 mg andexanet 125 mg andexanet 25 IU/kg 4F-PCC 50 IU/kg 4F-PCC 100 IU/kg 4F-PCC 1 mg/kg rivaroxaban	Male N=10-13	Mean blood loss was reversed in anticoagulated rabbits following the administration of andexanet. Blood loss was reduced from 16.22 ± 3.90 in rivaroxaban-anticoagulated rabbits to 7.86 ± 2.36 grams in animals treated with 125 mg andexanet, which was similar to the blood loss seen in non-anticoagulated rabbits. Mean blood loss was approximately 50% lower at dose levels of 75 or 100 mg, compared with rabbits treated only with rivaroxaban. Likewise, anti-fXa activity and the prolonged PT and aPTT were reduced to levels observed at the start of the study, free fraction of rivaroxaban was rapidly reduced to levels below the IC_{50} of rivaroxaban for factor Xa (100 and 125 mg andexanet), and total (protein bound) rivaroxaban levels increased approximately 10-fold. In contrast, mean blood loss in animals treated with 4F-PCC was approximately 10%, 35%, and 40% lower in animals treated with either 25 IU, 50 IU, or 100 IU/kg of 4F-PCC ($p > 0.05$ for all groups vs vehicle), respectively, compared with animals treated with rivaroxaban-plus-vehicle alone. 4F-PCC administration did not reduce any of the PD markers examined.	NC-14-0573-R0001 NC-14-0573-R0002

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 4: Primary Pharmacodynamics – In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Liver Laceration - Blood Loss, Treatment	Rabbit, NZW	Intravenous bolus over 5 minutes (andexanet) Intravenous bolus (rivaroxaban)	5 mg andexanet 15 mg andexanet 35 mg andexanet 75 mg andexanet 0.5 mg/kg rivaroxaban	Male N=5-15	Andexanet treatment reduced blood loss from 14.0 ± 6.4 grams in rivaroxaban-anticoagulated rabbits to 8.4 ± 3.5 grams in the rabbits treated with 75 mg andexanet, and to 7.3 ± 2.6 grams in the rabbits treated with 35 mg andexanet per rabbit and per rabbit ($p = 0.05$ and $p = 0.02$ for the 75 mg and 35 mg dose groups, respectively). Anti-FXa activity, free fraction of rivaroxaban, and the prolonged PT and aPTT were reduced to levels observed at the start of the study, and total (protein bound) rivaroxaban levels increased 6- to 7-fold at an approximate 1.3:1 molar ratio of andexanet to total rivaroxaban. The lowest effective dose of andexanet in this study was 35 mg/rabbit.	NC-14-0575-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 4: Primary Pharmacodynamics – In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Poly-trauma Model-Blood Loss (Treatment model)	Pig, German Landrace	Intravenous bolus or bolus plus 2-hour infusion (andexanet) oral (apixaban)	20 mg/kg/day, 4 days apixaban 1000 mg + 10 mg/min andexanet	N=5-7	The anti-fXa activity declined to 98% from baseline. The effect of the bolus plus infusion on anti-fXa levels was similar to that in bolus only andexanet animals; however, the duration of the effect lasted the length of the infusion (2 hours) before slowly returning to baseline. Blood loss at this time-point was comparable across the three study groups receiving apixaban prior to andexanet treatment. In the control group, there was a subsequent increase in blood loss over time to 3,403 ± 766 mL and 100 % of the animals exsanguinated with a mean survival time of minutes 135 (range 92-193 min; P < 0.0001 versus sham- and andexanet treated animals). In comparison, all animals in the sham group survived for the full 5 hours. Treatment with andexanet resulted in a significant reduction in total blood loss post-injury. Reductions of 57% (1,264 ± 205 mL) and 59% (1,202 ± 94 mL) were observed with bolus and bolus plus infusion andexanet, respectively, as compared to control (both P < 0.0001)	NC-17-0798-R0001

3F-PCC = Three factor prothrombin complex concentrate; aPTT = Activated partial thromboplastin time; PT = Prothrombin time; FXa = Factor Xa; IC₅₀ = Half-maximum inhibition concentration; INR = International normalized ratio; IV = Intravenous; IU = International unit; NZW = New Zealand White; rfVIIa = Recombinant factor VIIa; SD = Standard deviation; EGR = Glu-Gly-Arg; EGR-Xa = Glu-Gly-Arg-Xa (an activate-sited inhibited FXa); PCC = Prothrombin complex concentrates; PD = Pharmacodynamics; PK = Pharmacokinetics; ATIII = Antithrombin III; CAT = Calibrated automated thrombography; ETP = Endogenous thrombin potential; FACS = Fluorescence-activated cell sorting; HUVECs = Human umbilical vein endothelial cells; Kd = Binding constant; RFU = Relative fluorescence unit; TAT = Thrombin-Antithrombin complex; TGA = Thrombin generation assay; TF = Tissue factor; TFPI = Tissue factor pathway inhibitor; Z-VVR-AMC = Z-VAL-VAL-ARG-7-Amino-4-MethylCoumarin

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

3 副次的薬理試験

3.1 In Vitro

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Secondary Pharmacology – In Vitro					
Affinity to FXa Inhibitors					
Andexanet binding affinity to indirect FXa inhibitors	Buffered system	Measuring FXa enzymatic activity for cleavage of a peptidyl substrate Spectrazyme-FXa	FXa: 20 nM; Human ATIII: 200 nM; Fondaparinux: 100 nM; variable concentrations of andexanet	Andexanet dose-dependently reversed inhibition of FXa by the ATIII-fondaparinux complex with an estimated binding affinity (Kd) of 53 nM for the andexanet/ ATIII-fondaparinux complex.	NC-12-0455-R0001
Reversal of anti-fXa in Human Plasma					
Reversal of indirect FXa inhibitor-induced anti-fXa activity	Human plasma	Measuring anti-fXa activity in human plasma	Enoxaparin: 0.5 or 1.0 IU/mL; Fondaparinux: 1.0 µg/mL; Andexanet: 0-5.0 µM	Andexanet dose-dependently reversed the anti-fXa activity of both enoxaparin and fondaparinux.	NC-12-0434-R0002
Reversal of heparin and enoxaparin anti-IIa activity by andexanet	Human plasma	Measuring anti-IIa activity in human plasma	Enoxaparin: 2 IU/mL; Andexanet: 0-5.0 µM	Andexanet dose-dependently reversed the anti-IIa activity of enoxaparin	NC-16-0738-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Reversal of Inhibition of Thrombin Generation with TF-dependent Thrombin Generation Assay					
Reversal of indirect FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation	Human plasma	Measuring TF-initiated thrombin generation in human plasma by an in-house thrombin generation assay (TGA)	Enoxaparin: 1.0 IU/mL; Andexanet: 0-3.3 µM; Fondaparinux: 1.0 or 2.0 µg/mL; andexanet: 0-1.0 µM	Andexanet dose-dependently and completely reversed indirect FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation.	NC-12-0458-R0001
Reversal of direct and indirect FXa inhibitor-induced inhibition of thrombin generation in plasma	Human plasma	Measuring TF-initiated thrombin generation in human plasma by the calibrated automated thrombogram (CAT)	Rivaroxaban: 0-2.0 µM Apixaban: 0-1.0 µM Fondaparinux: 0-5.0 µg/mL Enoxaparin: 0-1.0 IU/mL Andexanet: 0-4.0 µM;	At clinically relevant concentrations, enoxaparin or fondaparinux completely or near completely inhibited thrombin generation. Consistent with previous in vitro studies in human plasma using the TF-TGA (RFU) assay, the current study using the TF-CAT assay confirmed andexanet's ability to reverse the ATIII-dependent FXa inhibitors. However, a different TF-CAT profile was seen with enoxaparin, compared to fondaparinux and direct FXa inhibitors (rivaroxaban and apixaban). The differential effect of andexanet on enoxaparin and fondaparinux reversal is worth noting when the TF-CAT assay is used for analysis of enoxaparin samples acquired in in vivo or clinical studies, which may have a higher ratio of anti-FXa:anti-IIa in vivo compared to the in vitro spiking samples.	RPD-000594

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Interaction with Major Plasma Coagulation Proteins					
Interaction of andexanet with major plasma coagulation proteins and plasma inhibitors (Biacore™)	Biacore	Comparing binding affinity of andexanet or FXa to prothrombin, fV, fVII, FX, TFPI, ATIII, α -2-Macroglobulin, and α -1-Antitrypsin	Variable concentrations are used based on binding affinity.	Andexanet had no significant interactions with major plasma proteins or inhibitors, except for TFPI ($K_d = 0.64$ - 0.70 nM).	NC-12-0459-R0001 NC-12-0460-R0001 NC-12-0461-R0001
Interaction with TFPI					
Effect of andexanet on TFPI function in buffered system as measured by FXa and fVIIa/TF activity	Buffered system	Tests (a) – (d): Measuring FXa chromogenic activity, with FXa either added as a purified enzyme or formed from FX activation by the fVIIa/TF complex.	(a) FXa-TFPI interaction (b) Andexanet-TFPI interaction with varying andexanet concentration (c) Andexanet-TFPI interaction with varying TFPI concentration (d) FX activation by fVIIa/TF in the presence or absence of TFPI $\pm$ andexanet	Andexanet binds to TFPI (K_d) with high affinity albeit slightly lower than the affinity of FXa-TFPI (K_i): (a) K_i (FXa-TFPI) = 0.021 nM (b) K_i (FXa-TFPI) = 0.026 nM K_d (andexanet-TFPI) = 0.07 nM (c) K_i (FXa-TFPI) = 0.033 nM K_d (andexanet-TFPI) = 0.155 nM (d) Andexanet did not affect FXa activation by fVIIa/TF in the absence of TFPI; andexanet reduced TFPI-mediated inhibition in FX activation; the effect was dependent on pre-incubation of andexanet/TFPI; weaker effect was observed without pre-incubation.	NC-12-0450-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Effect of andexanet on TFPI function in buffered system as measured by FXa and fVIIa/TF activity	Buffered system	Test (e) Measuring fVIIa/TF activity by cleavage of fluorogenic substrate Z-VVR-AMC	(e) fVIIa/TF with TFPI (2.4 nM) and varying concentrations of FXa, andexanet, or des-Gla FXa	(e) Inhibition of fVIIa/TF by TFPI was dependent on the Gla-domain of FXa. Andexanet or des-Gla FXa had much weaker affinity to fVIIa/TF.	NC-12-0450-R0001
Andexanet interaction with TFPI on HUVECs with or without rivaroxaban	HUVECs	Binding of andexanet on HUVECs measured by FACS	Andexanet binding on HUVECs, with or without varying concentrations of rivaroxaban	Andexanet binding on HUVECs was detected by FACS; the binding could be blocked by an anti-TFPI antibody or by rivaroxaban.	NC-15-0662-R0001
Effect of andexanet-TFPI interaction on thrombin generation - correlation with anti-fXa	Human plasma	Anti-FXa activity and TF-initiated thrombin generation assay (CAT)	Rivaroxaban (0-1.0 µM); Rivaroxaban (1.0 µM) + Andexanet (0-2.0 µM)	Andexanet alone had minimal effect on thrombin generation (ETP) in the absence of rivaroxaban. When thrombin generation was correlated with anti-fXa levels, samples that contained andexanet had higher thrombin generation compared to the samples without andexanet <u>at a similar anti-fXa level</u> . The maximal effect was seen at ~50% of anti-fXa reversal (with andexanet:rivaroxaban molar ratio ~0.5).	NC-15-0659-R0003

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Effect of andexanet-TFPI interaction on thrombin generation - correlation with anti-FXa	Human plasma	Anti-FXa activity and TF-initiated thrombin generation assay (CAT)	Rivaroxaban (0-1.0 µM); Rivaroxaban (1.0 µM) + Andexanet (0-2.0 µM)	This enhanced thrombin generation could be attributed to andexanet-TFPI interaction in the presence of rivaroxaban and andexanet. Therefore, competitive interaction of andexanet with TFPI and FXa inhibitors could enhance reversal of anticoagulation in patients at clinically relevant andexanet doses/regimens for FXa inhibitors.	NC-15-0659-R0003
Reversal of Inhibition of Thrombin Generation with non-TF-dependent Thrombin Generation Assay					
Reversal of direct FXa inhibitor (betrixaban)-induced inhibition of thrombin generation	Human plasma	Measuring non-TF-initiated thrombin generation in human plasma using an aPTT reagent () as the activator	Betrixaban: 1.0 µM Andexanet: 0-3.66 µM	Andexanet dose-dependently and completely reversed direct FXa inhibitor (betrixaban)-induced inhibition of thrombin generation using an aPTT reagent () as the activator. Minimal effect was observed with andexanet alone in the absence of a FXa inhibitor.	NC-13-0560-R0001 NC-14-0569-R0001
Lack of Catalytic Activity					
Effect of andexanet on FXa chromogenic activity in buffer	Buffered system	Measuring cleavage of Spectrazyme-FXa by FXa and/or andexanet	FXa with or without Andexanet (0-5.0 µM)	Andexanet had no catalytic activity and did not interfere with the catalytic activity of FXa.	NC-12-0435-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Effect of andexanet on prothrombin activation by the prothrombinase complex in a reconstituted system	Buffered system	Measuring prothrombin activation by the reconstituted prothrombinase in buffer with native fXa or with fXa replaced by andexanet	FXa with or without Andexanet (0 – 12.5 nM)	Andexanet did not demonstrate any catalytic activity for prothrombin activation and had weak effect on prothrombin activation by the prothrombinase complex, with an estimated $K_i > 8.0 \mu\text{M}$ for andexanet.	NC-15-0667-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Effect of andexanet on TF-initiated thrombin generation in human plasma	Human plasma	TF-initiated thrombin generation	Comparing andexanet (0-3.3 µM) and FXa-EGR (0-0.5 µM)	Andexanet had minimal effect on thrombin generation at the highest concentration tested (3.3 µM).	NC-12-0451-R0001
Effect of andexanet on non-TF-initiated thrombin generation in human plasma	Human plasma	Non-TF-initiated thrombin generation	Andexanet (0-3.66 µM) in the absence of a FXa inhibitor	Andexanet had minimal effect on thrombin generation at the highest concentration tested (3.66 µM).	NC-13-0560-R0001 NC-14-0569-R0001
Effect of andexanet on F1+2 and TAT biomarkers in human whole blood	Human whole blood	Measuring F1+2 and TAT formation following initiation of thrombin generation by TF	Andexanet at 0, 1.0 and 2.0 µM	Andexanet has no effect on F1+2 and TAT level following initiation of thrombin generation by TF.	NC-12-0439-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 5: Secondary Pharmacology – In Vitro

Overview			Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Noteworthy Findings	Study Number
Cell-based assays for the effect of andexanet on: (a) P-Selectin expression in human platelets (b) Intracellular calcium release in TF-1 cells (c) Intracellular calcium release in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)	(a) Washed human platelets (b) TF-1 cells (c) HUVECs	Washed platelet or cell-based assay with TF-1 and HUVECs	Andexanet at 0, 0.5 and 1.0 µM	Andexanet did not induce platelet activation or increase Ca ²⁺ release in TF-1 or HUVECs.	NC-12-0438-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

3.2 In Vivo

Table 6: Secondary Pharmacology– In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Secondary Pharmacology – In Vivo						
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Rat, SD	Intravenous bolus over 5 minutes or bolus followed by infusion (andexanet) Intravenous bolus (enoxaparin)	4 mg bolus andexanet 4 mg bolus (1.3 mL) over 5 minutes + 4 mg/hr (1 mL/hr) for 45 minutes andexanet 4.5 mg/kg bolus enoxaparin	Male N=5-6	The single bolus administration of andexanet to enoxaparin-anticoagulated rats did not maintain complete suppression of anti-fXa during the 45 minute blood loss collection period; however, the blood loss was similar between the 2 groups administered either a bolus only or a bolus-plus-infusion regimen.	NC-12-0432-R0001
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Rat, SD	Intravenous bolus (5 minutes), Infusion 15 minutes (andexanet) Intravenous bolus (protamine) Intravenous bolus (enoxaparin)	6 mg bolus + 6 mg/hr infusion (1.21 mg/mL) andexanet 0.9 mg protamine (Sigma) 4.5 mg/kg enoxaparin	Male N=6-7	Prophylactic administration of andexanet to enoxaparin-anticoagulated rats reduced blood loss to levels seen in non-anticoagulated animals and was equally effective in reducing blood loss, anti-fXa activity, and aPTT as was seen with protamine	NC-12-0454-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 6: Secondary Pharmacology– In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Rat, SD	Intravenous bolus (5 minutes) followed by infusion (andexanet) Intravenous bolus (fondaparinux) Intravenous, bolus over 5 minutes, protamine.	6 mg bolus + 6 mg/hr infusion (1.21 mg/ mL) andexanet 25 mg/kg fondaparinux 0.9 mg protamine	Male N=6-7	Andexanet reverses anticoagulation induced by the indirect, FXa inhibitor, fondaparinux. Andexanet treatment reduced blood loss in fondaparinux-anticoagulated animals, compared with fondaparinux alone. Protamine was not effective in reducing blood loss in fondaparinux-anticoagulated animals (p = 0.39 vs. the vehicle control group) and there was no decrease in anti-FXa activity with protamine treatment.	NC-12-0456-R0001
Tail Transection - Blood Loss Treatment	Rat, SD	Intravenous bolus over 2 minutes (andexanet) Intravenous bolus (enoxaparin)	0.5 mg andexanet 1.0 mg andexanet 2.0 mg andexanet 4.0 mg andexanet 4.5 mg/kg enoxaparin	Male N=7-10	Andexanet treatment administered after tail transection resulted in a dose-dependent decrease in anti-FXa activity in enoxaparin-anticoagulated rats, while blood loss was reduced to similar levels in groups administered 1, 2, or 4 mg andexanet. Enoxaparin increased mean blood loss from ~50 µL in the vehicle group to ~886 µL in the enoxaparin-anticoagulated rats. Andexanet reduced mean blood loss to ~383 µL, at 1 mg, ~389 µL at 2 mg, and ~331 µL at 4 mg, with no decrease at 0.5 mg andexanet (all relative to blood loss in anticoagulated rats over the 45 minute blood loss period following andexanet administration).	NC-12-0437-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 6: Secondary Pharmacology– In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Liver Laceration - Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	Enoxaparin IV bolus Aandexanet IV bolus infusion 5 minutes	Enoxaparin 4 mg/kg vehicle or andexanet (5, 15, 35, 75, or 125 mg/rabbit)	Male N=7-16	Lovenox increased mean blood loss by approximately 2-fold (compared with the mean blood loss in the enoxaparin vehicle group). Prior to andexanet (or vehicle) administration, mean plasma anti-fXa levels were approximately 3.95 IU/mL. Following andexanet treatment, the resulting blood loss was 31%, 46%, 50%, 63%, and 94% lower in anticoagulated rabbits treated with andexanet at dose levels of 5, 15, 35, 75, or 125 mg/rabbit, respectively, compared with rabbits treated only with the anticoagulant (p = 0.03, 0.002, 0.003, 0.0007, and 0.07 for the 5, 15, 35, 75, or 125 mg andexanet dose groups, respectively, vs enoxaparin alone). A dose-dependent decrease in anti-fXa activity was observed with increasing concentrations of andexanet from 0 (vehicle) to 125 mg. Anti-fXa activity levels (% Predose) were 86.0, 66.1, 58.9, 29.2, 22.0%, respectively, at the end of andexanet bolus. However, even at the highest dose of andexanet (125 mg), residual anti-fXa activity was still detected at ~1.0 IU/mL.	NC-15-0611-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
 アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 6: Secondary Pharmacology– In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Mouse, fVIII -/ C57BL/6	Intravenous (andexanet)	600 µg/mouse, ~26 mg/kg andexanet (once only, 200 µL /mouse)	Male N=9-11	In a genetic mouse model of bleeding, andexanet did not exhibit procoagulant activity up to plasma exposures of ~3 µM andexanet.	NC-13-0512-R0001
Wessler Venous Stasis Thrombosis Model	Rat, SD	Whole blood injection into the jugular vein	3 µM andexanet 1 mg/mL Human FXa reference agent	Male N=12-14	Andexanet did not alter clot weight following an injection of 100 µL of whole blood, spiked with thromboplastin, and containing 3 µM andexanet, into rat jugular vein pockets. Andexanet did not exhibit procoagulant activity at a concentration of 3 µM in whole blood.	NC-12-0420-R0001
Tail Transection - Blood Loss Prophylactic	Rat, SD	Intravenous bolus over 5 minutes, followed by infusion for 15 minutes	4 mg + 4 mg/hr andexanet	Male N=4	Lot comparison. Andexanet did not promote anticoagulant or procoagulant effects with 2 different lots of material in the rat tail transection model.	NC-12-0444-R0001

2.6.3 薬理試験概要表
アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

Table 6: Secondary Pharmacology– In Vivo

Overview				Test Article: andexanet		
Type of Study	Species/ Strain	Method of Administration	Doses	Gender & No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
PK-PD	Rat, SD	Intravenous bolus followed by infusion (andexanet) Infusion (EGR-Xa)	1.0 mg bolus + 1.5 mg/hr (0.5 mL/hr infusion andexanet, 0.5 mg/kg/hr and 1.0 mg/kg/hr EGR- Xa)	Male N=5-6	A dose-dependent increase in aPTT and PT prolongation was observed with both dose levels of EGR-Xa. Co-administration of andexanet and EGR-Xa did not further prolong PT or aPTT. Plasma levels of andexanet were ~0.5-0.6 µM throughout the 30-90 minute treatment period. Andexanet did not promote a procoagulant or anticoagulant effect when co-administered with an inactive FXa inhibitor.	NC-12-0445-R0001
Liver Laceration – Blood Loss (Prophylactic)	Rabbit, NZW	IV bolus over 5 minutes (andexanet) IV bolus over 2 minutes, followed by infusion over the duration of the study (Bivalirudin)	75 mg/rabbit andexanet 0.75 mg/kg bolus + 1.75 mg/kg/hr (for 30 minutes)	Male N=5-8	The selectivity of andexanet for FXa inhibitors was evaluated in a rabbit liver injury model, in which rabbits were anticoagulated with a direct thrombin inhibitor, Angiomax® and treated prophylactically with andexanet. Andexanet administration (75 mg/rabbit) to rabbits anticoagulated with a bolus + infusion of Angiomax (1.62 mg/kg total dose) did not reverse bleeding in an acute model of liver injury. Administration of andexanet alone did not affect blood loss in the absence of Angiomax, and no evidence of pro-coagulant activity was apparent (~10 µM systemic level of andexanet).	NC-13-0495-R0001

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

4 安全性薬理試験

Table 7: Safety Pharmacology

				Test Article: andexanet			
Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Doses (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Respiratory	Rat/SD	Intravenous	3, 10, 30	Male 8 per group	There were no noteworthy findings in this study and the NOAEL was the high dose of 30 mg/kg, which was the maximum feasible dose.	GLP	NC-11-0395
CNS	Rat/SD	Intravenous	3, 10, 30	Male 6 per group	There were no noteworthy findings in this study and the NOAEL was the high dose of 30 mg/kg, which was the maximum feasible dose.	GLP	NC-11-0396
Cardiovascular	Monkey/ Cynomolgus	Intravenous	6, 20, 60	Male & Female 5 per sex per group	There were no noteworthy findings related to the cardiovascular safety pharmacology assessment phase of a 2-week intravenous bolus BID every 3 rd day study. Findings from the 2-week study are reported elsewhere and the NOAEL for the cardiovascular safety pharmacology assessment was the high dose of 60 mg/kg/day.	GLP	NC-11-0394

BID = Twice daily; CNS =central nerve system; GLP = Good laboratory practice; NOAEL = No-observed-adverse-effect level; SD = Standard deviation

2.6.3 薬理試験概要表

アンデキサネット アルファ（遺伝子組換え）

5 薬力学的薬物相互作用試験

本項は該当しない。