Ropeginterferon alfa-2b

ベスレミ皮下注 250 μg シリンジ

ベスレミ皮下注 500 μg シリンジ

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

ファーマエッセンシアジャパン株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
ET	本態性血小板血症
IFN	インターフェロン
mPEG	メトキシポリエチレングリコール
MPNs	骨髄増殖性腫瘍
PEG	ポリエチレングリコール
PMF	原発性骨髄線維症
PV	真性多血症
P1101	Ropeginterferon alfa-2b; AOP2014

目次

頁
略号一覧表 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
参考文献 4

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

真性多血症（PV）、本態性血小板血症（ET）及び原発性骨髄線維症（PMF）は、血小板増加、白血球増加、赤血球増加、骨髄の線維化などを特徴とするフィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍（MPNs）の病型である。

PV の軽度な症状として、頭痛、疲労、浮動性めまい、視力障害、回転性めまい、耳鳴り、そう痒や肢端紅痛症がみられるが、これらは非特異的で、血球数の増加に伴う血液粘度の上昇に関連している。PV では長期間に渡って衰弱が継続し，血栓や出血といった生命の危険な状態に陥る。また，骨髄線維症や二次性の急性骨髄性白血病に進展する可能性のある状態が長期間持続する[Griesshammer, 2015][Stein, 2015]。

Ropeginterferon alfa-2b（ペグ化プロリンインターフェロン α（IFN-α）-2b 製剤、P1101、別称：AOP2014）は、PV 治療薬として開発中である。本剤は 2 週間ごとに月 2 回皮下投与される。100 μg を開始用量とし、患者の状態（効果と忍容性）に応じて最大 500 μg まで増量される。

本剤は、IFN-α-2b の N 末端にプロリン残基を付加し、当該プロリン残基に共有結合を介して約 40 kDa の二分枝型メトキシポリエチレングリコール（mPEG）に接合させた遺伝子組み換え IFN-α-2b 製剤である。本剤の活性本体は IFN-α-2b であるが、PEG と接合することで *in vivo* 安定性が改善されている。有効成分である PEG 化 IFN-α は、薬物中間体の単一部位（N 末端のプロリン残基）が共有結合を介して約 40 kDa の二分枝型 mPEG に接合した分子構造をとる。本剤のペグ化部位は、主として薬物中間体 N 末端のプロリン残基である（図 2.6.1-1）。

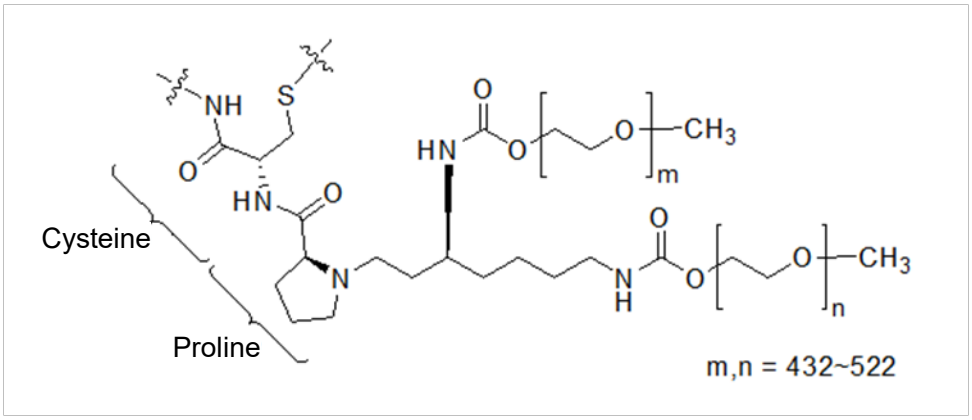


図 2.6.1-1 P1101 の N 末端部分の分子構造

参考文献

Griesshammer, M., H. Gisslinger, and R. Mesa. 2015. Current and future treatment options for polycythemia vera. Ann Hematol,94: 901-10.

Stein, B. L., S. T. Oh, D. Berenzon, G. S. Hobbs, M. Kremyanskaya, R. K. Rampal, C. N. Abboud, K. Adler, M. L. Heaney, E. J. Jabbour, R. S. Komrokji, A. R. Moliterno, E. K. Ritchie, L. Rice, J. Mascarenhas, and R. Hoffman. 2015. Polycythemia vera: an appraisal of the biology and management 10 years after the discovery of JAK2 V617F. J Clin Oncol, 33: 3953-60.

Ropeginterferon alfa-2b
ベスレミ皮下注 250 μg シリンジ
ベスレミ皮下注 500 μg シリンジ

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

ファーマエッセンシアジャパン株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
$AUC_{0-\infty}$	0 時間から無限大時間までの血（清）中濃度－時間曲線下面積
C_{max}	最高血漿（血清）中濃度
CNS	中枢神経系
ECG	心電図
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293（ヒト胎児由来腎細胞 293）
hERG	human Ether-à-go-go Related Gene（ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子）
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	50%阻害濃度
IFN	インターフェロン
MPNs	骨髄増殖性腫瘍
OAS	2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素
P1101	Ropeginterferon α-2b（ペグ化プロリン-IFN α-2b）
PD	薬力学的
Ph-neg	フィラデルフィア染色体陰性
PK	薬物動態
PV	真性多血症

目次

略号一覧表 2
2.6.2 薬理試験の概要文 4
2.6.2.1 まとめ 4
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.2.2.1 雄性カニクイザルを用いた P1011 及びペガシスの PK／PD 比較試験（4.2.2.2.1 Study No. 44104-08-242） 5
2.6.2.2.2 作用機序 8
2.6.2.3 副次的薬理試験 12
2.6.2.4 安全性薬理試験 12
2.6.2.4.1 hERG カリウムチャネル電流に及ぼす影響（4.2.1.3.1 Study No. 7975-106） 12
2.6.2.4.2 カニクイザルの心血管系に及ぼす影響（単回静脈内投与）（4.2.1.3.2 Study No 2872-001） 12
2.6.2.4.3 ラットの中枢神経系に及ぼす影響（単回皮下投与）（4.2.1.3.3 Study No. 2872-002） 14
2.6.2.4.4 ラットの呼吸器系に及ぼす影響（単回静脈内投与）（4.2.1.3.4 Study No. 2872-004） 14
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 14
2.6.2.6 考察及び結論 14
2.6.2.7 図表 18
2.6.2.8 参考文献 19

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

真性多血症（PV）はフィラデルフィア染色体陰性（Ph-neg）骨髄増殖性腫瘍（MPNs）の一種であり、血小板増加、白血球増加、赤血球増加及び骨髄線維化を特徴とする。

Ropeginterferon α-2b（ペグ化プロリン-IFN α-2b）は PV 治療薬として開発中である。

インターフェロン（IFN）α及びペグ化 IFNα は、1980 年代後半から PV 治療薬として適応外で使用されてきた。現在、既に数種のペグ化 IFNα がマーケットで使用されており、また、それらは C 型肝炎治療薬としても承認されている。したがって、ペグ化 IFNα について広範囲の非臨床及び臨床データが利用可能である。

そのため、P1101 の薬力学的（PD）評価としてカニクイザルモデルを用いて生物活性及び既承認のペグ化 IFN α-2a であるペガシス®との同等性を評価した。本試験において、P1101 及びペガシス®の薬物動態（PK）比較も実施した。P1101 及びペガシスの皮下投与により、2', 5'-オリゴアデニル酸合成酵素（OAS）（IFN に反応して誘導される酵素で抗ウイルス防御に影響を及ぼす）の最大血清活性は同程度であった。P1101 は 14 日間プラトーが持続する耐久性のある OAS 活性増加反応を誘発したのに対して、ペガシスでは、OAS 活性は投与後 6 日以降徐々に低下した。この差は、P1101 及びペガシスの活性成分、すなわち、それぞれ IFN α-2b 及び IFN α-2a の PD 効果の違いに起因する。両被験物質の PK プロファイルは非常に類似しており、C_{max}、終末相消失半減期及び全身暴露の違いは 20%未満である。したがって、PD 反応の違いが薬物動態の違いに起因する可能性は低いと考えられる。

In vitro hERG 試験を実施し、心筋再分極の原因となるカリウム電流を P1101 が遮断する可能性について検討した。P1101 は、2.5 μM（50 μg/mL）でテール電流振幅を対照に比べて 49.9%、統計学的に有意に抑制した。2.5 μM（50 μg/mL）は臨床試験での血漿中濃度〔C_{max}=24.84±8.66 ng/mL、P1101-2010 試験（PEGINVERA-PV 試験）〕に比べてはるかに高濃度であることから、本作用は臨床的意義に乏しいものと考えられる。また、カニクイザルの心血管系安全性薬理試験において最高 600 μg/kg までの静脈内投与で QT 延長が全く認められなかったことから、*in vitro* 試験で観察された hERG チャネル阻害は生理学的に意義がないものと考えられる。なお、本試験において、最高 600 μg/kg までの静脈内投与で、体温及び心拍数に一過性の上昇が認められたが、これらの変化は溶媒投与群でもみられたことから有害な変化とは評価されなかった。

ラットを用いて中枢神経系（CNS）及び呼吸器系に対する作用を検討した。その結果、それぞれ最高 20 mg/kg までの皮下投与又は 10 mg/kg の静脈内投与で、CNS 又は呼吸器系に影響はみられなかった。なお、患者の治療における用法・用量としては、50～500 μg（体重 70 kg の患者において 0.0007～0.0071 mg/kg）を 2～4 週間毎にそれぞれ 1 回投与することと規定されている。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 雄性カニクイザルを用いた P1011 及びペガシスの PK／PD 比較試験（4.2.2.2.1 Study No. 44104-08-242）

目的

カニクイザルに P1101 を皮下投与した後の PD／PK プロファイルを検討し、ペガシス（ペグ化 IFN α-2a）と比較した。また、P1101 の静脈内及び皮下投与データからバイオアベイラビリティを明らかにした。

方法

フェーズ I

成熟雄性カニクイザル（4 匹／群）に P1101（グループ 1）又はペガシス（グループ 2）を 30 μg/kg の用量で皮下投与した。投与前、投与後 2、4、6、8、12 及び 24 時間並びに 2、3、4、6、8、10、12 及び 14 日後に採血して PK 及び PD プロファイル測定用サンプルとした。PD 効果は 2’,5’-オリゴアデニル酸合成酵素（OAS）の血清中活性から推測した。OAS 活性は市販のラジオイムノアッセイキット（Eiken, Co., Ltd., Tokyo, Japan）で測定した。PK 分析のための血清中濃度はサンドイッチ ELISA キット（PBL Assay Science, NJ, USA）で測定した。

フェーズ II

このフェーズは 45 日間の休薬期間後に開始した。フェーズ I のグループ 1 の動物には P1101 の 30 μg/kg を静脈内投与し、グループ 2 には P1101 の 300 μg/kg を皮下投与した。PK プロファイル及び OAS 活性はフェーズ 1 と同じ方法及び採血時間で 14 日間測定した。PK 分析用の血液サンプルは静脈内投与の 5、20 分及び 1、2、4、6、8、12、24 時間及び 2、3、4、6、8、10、12、14 日後に採取した。

両フェーズともに、ケージにおいて行動観察を毎日実施し、被験物質の投与前及び投与後は週 1 回詳細な臨床状態観察を実施した。

結果

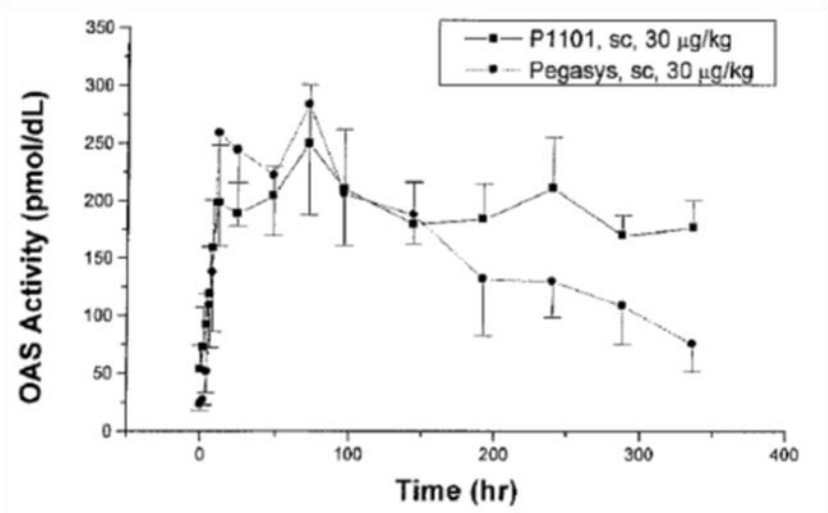
臨床兆候及び体重

試験のフェーズ I 及びフェーズ II 中に被験物質投与に関連する症状及び体重の変化は認められなかった。

薬力学

フェーズ I において、P1101 及びペガシスの皮下投与によりいずれも投与後 72 時間にピークを持つ血清中 OAS 活性の増加が認められた（図 2.6.2-1）。投与後 6 日まで P1101 及びペガシスによって、いずれも同程度の大きさ及び時間経過で OAS 活性が誘発された。その後、ペガシス投与動物では徐々に OAS 活性が低下したのに対して、P1101 では 14 日の試験終了時まで、OSA 活性は持続的に高レベルであった。

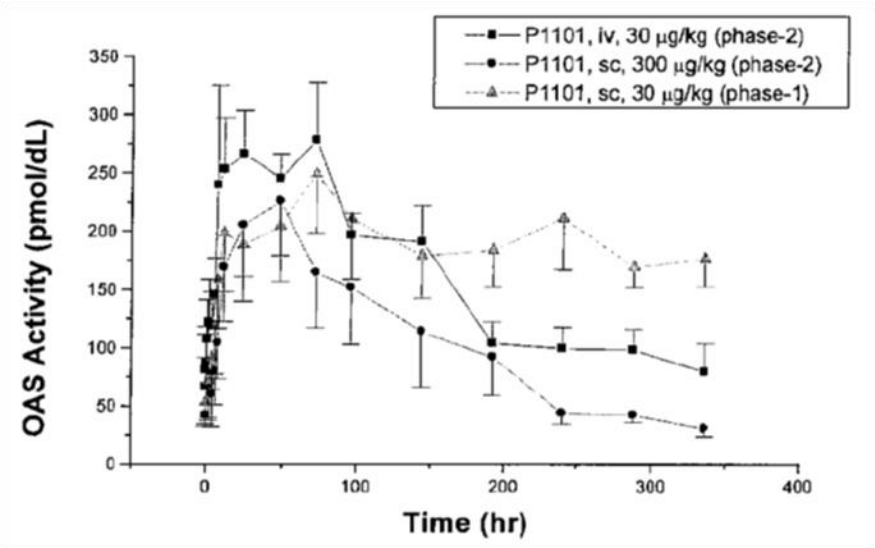
図 2.6.2-1 P1101 及びペガシスによる OSA 活性の誘発



P1101 及びペガシスは 30 µg/kg の用量を皮下投与し、血清中の 2',5'-オリゴアデニル酸合成酵素（OAS）活性を測定した（4 例の平均値±標準誤差）。
Data source：4.2.2.2.1 Study No.44104-08-242 Text Figure 3.

フェーズ II において、P1101 の静脈内投与により血清 P1101 濃度が速やかに上昇したのに一致して、血清 OSA 活性は皮下投与よりも早く増加した（図 2.6.2-2）。興味深いことに、P1101 の 300 µg/kg の皮下投与では、フェーズ I での 30 µg/kg と比較してより高い暴露が得られているにもかかわらず、OAS 反応はより高くはなかった。

図 2.6.2-2 P1101 の皮下及び静脈内投与後の OAS 活性の推移



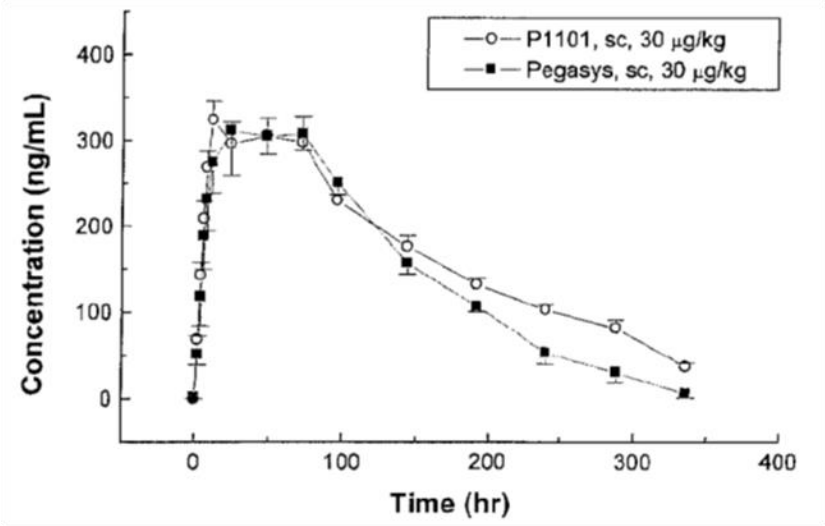
P1101 を 30 µg/kg で静脈内投与並びに 30 及び 300 µg/kg で皮下投与し、図示したタイムポイントで OAS 活性を測定した（4 例の平均値±標準誤差）。
Data source：4.2.2.2.1 Study No.44104-08-242 Text Figure 4.

薬物動態

本試験のフェーズ I において、それぞれ 30 µg/kg の P1101 及びペガシスの皮下投与によりいずれも同程度の曝露と同様の PK プロファイルが得られた（図 2.6.2-3）。P1101 及びペガシス間での

PK パラメータ〔C_{max}、$AUC_{0-\infty}$、平均滞留時間（MRT_{last}）及び終末相消失半減期（$t_{1/2}$）〕の違いはいずれも 20%以下であった（表 2.6.2-1）。

図 2.6.2-3 皮下投与後の P1101 及びペガシスの血清中濃度



P1101 及びペガシスをカニクイザルに皮下投与した後の平均血清中 IFN-α 濃度を示した（4 例の平均値±標準誤差）。
Data source：4.2.2.2.1 Study No.44104-08-242 Text Figure 1.

表 2.6.2-1 P1101 及びペガシスの PK パラメータ

Parameter	Phase I			Phase II	
	P1101 (*s.c.*)	Pegasys (*s.c.*)	P1101/Pegasys Ratio	P1101 (*i.v.*)	P1101 (*s.c.*)
Dose (µg/kg)	30	30	1.00	30	300
t_{max} (hours)	33±13.3	66±15.1	0.50	2±0.0	54±6.0
C_{max} (ng/mL)	332.57±22.94	344.05±35.57	0.97	1235.95±109.18	3457.36±106.14
$t_{1/2}$ (hours)	66.06±7.90	61.72±8.44	1.07	67.03±13.55	22.22±7.97
AUC_{last} (hr·ng/mL)	56883.49±3333.57	49546.20±2739.67	1.15	65209.31±9619.71	312071.43±42179.89
$AUC_{0-\infty}$ (hr·ng/mL)	60528.28±3779.34	50882.71±2438.23	1.19	75447.13±6647.68	314370.16±41219.54
MRT_{last} (hours)	120.87±1.15	100.76±7.41	1.20	63.40±14.53	63.21±7.95
V_z/F (mL/kg)	47.36±4.77	53.45±9.38	0.89	NA	29.51±8.57
CL/F (mL/hr/kg)	0.50±0.034	0.59±0.029	0.85	NA	1.02±0.169
V_z (mL/kg)	NA	NA	NA	37.29±4.54	NA
CL(mL/hr/kg)	NA	NA	NA	0.41±0.036	NA

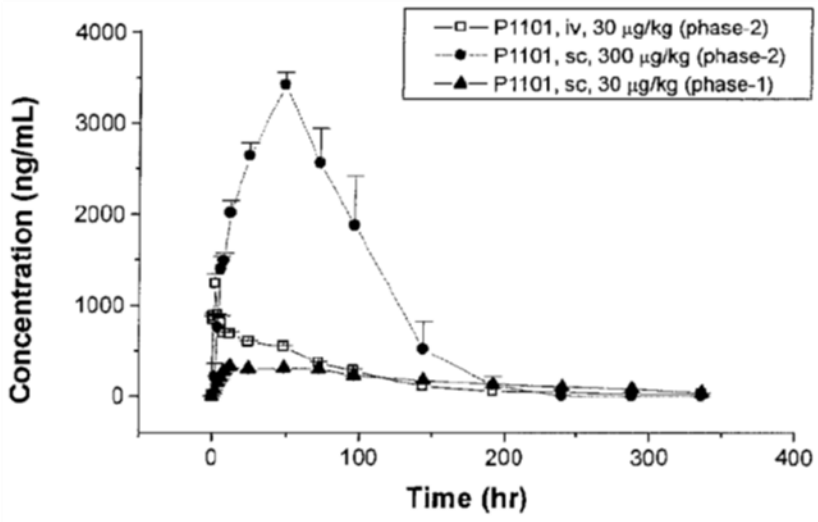
（4 例の平均値±標準誤差）
Data source：4.2.2.2.1 Study No.44104-08-242 Text Table 9.

フェーズ II において、P1101 の 30 µg/kg の静脈内投与により、フェーズ I で実施した同用量の皮下投与よりも高い血清 C_{max} が投与 2～96 時間後の区間で認められた（図 2.6.2-4）。P1101 の PK プロファイルを表 2.6.2-1 に示した。バイオアベイラビリティは 80%と算出されたが、静脈内投与動物中 2 例で P1101 濃度は急速に低下し、投与 144 時間以降のタイムポイントで定量化できなかったため、この数値は高すぎる可能性がある。また、P1101 濃度が急速に低下した理由は、おそらく抗-IFNα抗体が生じたためであると考えられる。分布容積が 37.29 mL/kg であることから、P1101 は血管内に限定されることが示唆された。

P1101 の 300 µg/kg の皮下投与においては、全投与群が投与 6～144 時間後の間で、他のすべての投与群より高い血清中濃度を示した。それ以降のタイムポイントでは血清中 P1101 濃度は急速に減少したが、これも抗-IFNα 抗体の存在によるものと考えられた。バイオアベイラビリティは

42%と算出された。

図 2.6.2-4 P1101 の皮下及び静脈内投与における血清中濃度



フェーズ II において、P1101 を 30 μg/kg の用量で静脈内投与及び 300 μg/kg の用量で皮下投与した。図にはフェーズ I における 30 μg/kg投与時のデータもプロットした（4 例の平均値±標準誤差）。
Data source：4.2.2.2.1 Study No.44104-08-242 Text Figure 2.

結論

サルへの P1101 及びペガシスの皮下投与により、時間依存的に OAS 活性が誘発され大きく増加した。血清中 OAS 反応の強度及び初期のキネティックは両被験物質間で同程度であった。一方で、P1101 はペガシスよりも長い時間血清 OAS 活性を上昇させていると思われた。

両被験物質間で PK プロファイルが類似していることから、OAS 活性のキネティックの違いは P1101 及びペガシスの活性成分（それぞれ IFN-α-2b 及び IFN-α-2a）による生物活性の違いを反映している可能性が示唆された。特に、P1101 及びペガシスの 30 μg/kg を皮下投与した際の PK パラメータは類似性が高く、両被験物質間での PK パラメータの違いは 20%未満であった。

より高用量（300 μg/kg）の P1101 を皮下投与したときに、サル血漿中 C_{max} はより高い濃度を示したにもかかわらず、それに見合った OAS 反応の増加は認められなかった。P1101 のバイオアベイラビリティはフェーズ II の 300 μg/kg 皮下投与で 42%であり、フェーズ I の 30 μg/kg 皮下投与では 80%であった。

2.6.2.2.2 作用機序

IFN α-2b は、I 型 IFN 受容体（IFNAR1 及び IFNAR2 の複合体）に結合することにより IFNAR1 を介して TYK2 チロシンキナーゼが、IFNAR2 を介して JAK1 チロシンキナーゼが活性化される [Kumaran, 2007; de Weerd, 2007; Platanias, 2005]。これらの活性化されたチロシンキナーゼによってシグナル伝達兼転写活性化因子である STAT1 と STAT2 がリン酸化を受け、リン酸化された STAT1 と STAT2 は 2 量体を形成して核内へと移行する（細胞内シグナル伝達経路の JAK-STAT の活性化）。その後、IRF9（IFN-regulatory factor 9）と複合体を形成し、ISRE（IFN-stimulated response element）配列に結合することで、細胞増殖抑制に関連する IFI-16 や NK 細胞増殖と LAK 活性増強に関連する ISG-15 等の多くの IFN 誘導遺伝子（IFN-stimulated genes：ISGs）の発現を誘導する [Platanias, 2005; Samarajiwa, 2009]。

本薬において、I 型 IFN 受容体との親和性や IFN 誘導遺伝子の誘導を検討してないが、ペグインターロン（PEG-IFNα-2b）皮下注用の申請資料（悪性黒色腫における術後補助療法、2.4 非臨床試験の概括評価及び 2.6.2 薬理試験の概要文）において，I 型 IFN 受容体への親和性（Ki=1.23×10-11M）、IFI-16（RNA 量の増加：2.2±1.5 倍）及び ISG-15（RNA 量の増加：33.8±8.8 倍）の誘導が検討されている。

ISGs の中には細胞周期停止や細胞増殖抑制、アポトーシス誘導に関与する遺伝子群が含まれる。細胞周期の停止に関連する ISGs には p21/Waf や p27/Kip1 があり、サイクリン依存性キナーゼの阻害因子として作用し、細胞周期を G1 期に停止させることで細胞の増殖を抑制する[Katayama, 2007, Eguchi, 2000]。また、細胞増殖の抑制は主に上記の細胞周期の停止とアポトーシスの誘導によって惹起され、アポトーシスの誘導に関連する ISGs には FAS ligand や granzyme B、TRAIL（Human TNF-related apoptosis inducing ligand）、caspase-8 などがあり[Parker, 2016]、NK 細胞や T 細胞がこれらの分子を放出することで標的細胞のアポトーシスを誘導する。

IFN は NK 細胞に対しては細胞増殖を促進し [Biron, 1984]、さらに細胞障害性 T 細胞と同様に granzyme B などの細胞障害活性分子を放出することで標的細胞のアポトーシスを誘導する [Biron, 1999; Zitvogel, 2015]。LAK 細胞は IFNα-2b と併用することによって抗腫瘍効果が増強するとの報告があるが、その詳細な機序は明らかではない [Sandrelli, 1992]。

P1101 を用いた作用機序の検討が、マウスの BA-1 細胞（B 細胞性白血病細胞）及び BA-1 細胞移植マウスを用いて検討された[Sakatoku, 2022]。その結果、P1101（5μg/mL）皮下投与により STAT1 のリン酸化がみられ、rIFNα同様、アポトーシスを誘導して腫瘍細胞に対する直接的な増殖抑制作用を示した。アポトーシス関連分子の検討において、P1101 処置により rIFNα と比較してより持続的な p21 の発現と時間依存的な caspase-3 の発現増加がみられた。本薬は BA-1 細胞移植マウスにおいて rIFNα よりも優れた腫瘍増殖抑制作用と生存期間延長作用を示したが、その効果には BA-1 細胞における IFNAR1 発現誘導の関与が示唆されること、P1101 が投与された BA-1 細胞移植マウスの脾臓において、B 細胞、T 細胞及び NK 細胞の増加がみられただけでなく、エフェクターメモリーT 細胞（TEM 細胞）及び幹細胞メモリーT（TSEM）細胞の割合が CD8+、CD4+細胞のいずれにおいても増加したことから、本薬が間接的な免疫機能増強作用を有することが示唆された。これは、BA-1 細胞接種後、本薬の投与により長期間（100 日以上）生存したマウスに再度 BA-1 細胞を移植しても、マウスは初めて BA-1 細胞を移植したマウスと比較して極めて長期間生存し、BA-1 細胞移植に対して抵抗性を示したこと、また、この腫瘍抵抗性は CD8+及び CD4+抗体を用いて CD8+及び CD4+細胞を除去することで消失したことからも支持されている。なお、本薬の免疫機能増強作用には、免疫細胞への IFNα の持続的な送達が関与していると考察されている。さらに、PegIFNα の臨床試験結果からも、その免疫調節作用には免疫細胞の IFNα への持続的な曝露が関与していると考察されており[Brassard, 2002]、また、IFNα が臨床試験やヒト由来サンプルを用いた試験において、様々な免疫調節作用を示すことも報告されている[Corssmit, 2000]。

PV では JAK2V617F 変異が高率に認められることから，変異型 JAK2 が細胞増殖に寄与していることが示唆される[Laubach, 2009]。そのため、PV に対する P1101 の腫瘍増殖抑制作用については、JAK2V617F 変異陽性の HEL 細胞及び UKE-1 細胞（急性白血病細胞）又は JAK2V617F 導入 UT-7 細胞（エリスロポエチン依存性急性巨核芽球性白血病細胞）を用いて検討された[Verger, 2018]。その結果、P1101 は 0.5 μg/mL 及び 2 μg/mL で HEL 細胞の増殖を 9%及び 41%、UKE-1 細胞の増殖を 18%及び 35%それぞれ抑制した。対照薬として用いた rIFNα-2a（500 UI/mL）は

HEL 細胞の増殖を 38%、UKE-1 細胞の増殖を 36%抑制した。JAK2V617F 導入 UT-7 細胞では本薬（2 μg/mL）処置で 40%の抑制がみられたが、野生型の UT-7 細胞では 23%の抑制しかみられなかった。更に、JAK2V617F 変異のある 4 例の PV 患者由来の造血前駆細胞を用いた in vitro 試験において、本薬は赤血球コロニーの形成をエリスロポエチン（EPO）存在下、非存在下のいずれにおいても抑制し、EPO 存在下での抑制率は 0.5 μg/mL で 29%、2 μg/mL で 59%であった。一方、JAK2 変異がみられない正常な造血前駆細胞に対しては、P1101 は赤血球コロニーの形成を抑制しなかった。以上のことから、本薬は JAK2 変異を有する造血前駆細胞の増殖やコロニー形成を抑制するが、野生型の造血前駆細胞の増殖やコロニー形成を抑制しないことが示唆されている。本薬の PV モデル動物を用いた薬効薬理試験は実施されていない。しかしながら、JAK2V617 変異誘発 PV モデルマウスを用いて IFNα の効果が検討されており[Mullally, 2013]、IFNα（リコンビナントマウス IFNα-4 又は IFNα）の長期投与（4～10 週間）により血液パラメータの改善、脾臓重量の低下、MPN 誘発性の変異造血系幹細胞の減少などの効果がみられている。本マウスモデルは、また、IFNα-2a 治療 PV 患者の一部で認められた V617F の遺伝子変異割合（アレルバーデン値）の低下や血液学的反応の機序説明にも利用可能であり[Kiladjian, 2008]、P1101 の Ph1 又は Ph2 試験サンプルを用いた検討においても、アレルバーデン値の低下（1 ヵ月当たり 1.2%の低下）がみられている[Gisslinger 2015]。また、日本人 PV 患者を対象とした Ph2 試験においても本薬によるアレルバーデン値の低下（12 カ月時のベースラインからの変化量は-11.62%）が認められた。

JAK2 チロシンキナーゼはエリスロポエチンやトロンボポエチンなどのサイトカインの受容体に結合して細胞内へのシグナル伝達に中心的役割を担う分子である。この分子の変異が造血幹細胞（血液幹細胞）のレベルで生じることで PV を発症する。JAK2 遺伝子の exon14 に変異を有する JAK2V617F 変異と exon12 に変異を有する JAK2exon12 変異があり、前者は約 96%、後者は約 3%を占めている [Pardanani et al., 2007; Stein et al., 2015; Vannucchi et al., 2008]。これらとは異なる部位に変異を有する場合がごく稀に報告されている [Milosevic Feenstra, 2016]。これらの変異は共通してチロシンキナーゼ活性を負に制御する領域に存在し、そのために JAK2 チロシンキナーゼの恒常的な活性化が生じる。そのことによって下流に存在する STAT5 が恒常的にリン酸化を受け、リン酸化を受けた STAT5 は 2 量体を形成し、核内へと移行し、GAS（gamma-IFN-activated sequence）配列に結合し、細胞周期やアポトーシス抑制に関与する様々な分子の転写を誘導する。その結果、赤血球産生が異常に亢進して PV を発症する [Chen, 2014]。本薬で活性化されるのは I 型 IFN 受容体を介した TYK2 チロシンキナーゼと JAK1 チロシンキナーゼと、その下流に位置する STAT1 と STAT2 であり、PV で恒常的に活性化されるのは JAK2-STAT5 であることから、両者では異なるチロシンキナーゼと STAT タンパク質がそれぞれ活性化されることになる。したがって本薬は PV で恒常的に活性化されている JAK2-STAT5 経路には直接には影響しないと考えられる。

本薬による IFN 受容体を介した JAK-STAT 経路以外の下流シグナル伝達経路への影響が、PV 細胞に対する増殖抑制作用に寄与する可能性として、in vitro の実験において IFN-α が p38 MAPK（p38 mitogen-activated protein kinase）シグナル伝達分子を活性化することで PV 患者由来の JAK2V617F 陽性血液幹細胞（CD34 陽性）の成熟細胞への分化を選択的かつ直接的に抑制することが報告されている [Lu, 2010]。したがって、本薬による IFN 受容体を介した JAK-STAT 経路以外の下流シグナル伝達経路への影響が、PV 細胞に対する増殖抑制作用に寄与する可能性はあると考えられる。

ごく稀に PV 患者において JAK2 シグナルを負に制御する分子である LNK（CBL）の変異が報告されているが、JAK2 変異と同様に JAK2-STAT5 経路の恒常的活性化が生じていると推察される [Aranaz, 2012]。したがって本薬による IFN 受容体を介した下流シグナル伝達経路への影響との関連はないものと考えられる。

IFNα の投与によってマウスの JAK2V617F 陽性血液幹細胞が枯渇する可能性があること [Rao, 2021]、IFNα（本薬も含む）に対する感受性が JAK2V617F を発現した細胞株の方が野生型 JAK2 を発現した細胞株に比して高いこと [Verger, 2018]、本薬を用いた臨床試験においても JAK2V617F 変異量が明らかに減少していることから[Gisslinger, 2020; Edahiro, 2022]、本薬が PV 患者の腫瘍細胞に対する直接的な殺細胞効果と間接的な宿主の免疫増強という複合的機序によって有効性を示すと考えられる。

P1101 の PV 患者を対象とした第 II 相及び第 III 相臨床試験において CHR（血液学的完全奏効）及び脾臓サイズは正常であった。さらに、IFNα-2a（ペガシス）治療 PV 患者や P1101 の第 1 相又は第 II 相臨床試験参加 PV 患者において V617F アレルバーデン値の低下がみられていることから、P1101 は PV に対して有効であると考えられ、事実、本薬の有効性が検証された第 III 相臨床試験（CONTINUATION-PV 試験：5.3.5.1-2-1）においても大部分の患者でアレルバーデン値が低下する分子遺伝学的奏効がみられており、36 ヵ月時の JAK2 V617F アレルバーデンの平均値は P1101 群が 16.6%で、対象群である BAT 群（42.5%）に比べて有意（p <0.0001）に低かった（2.7.3.2-4、表 2.7.3-26）。これらは、P1101 の腫瘍細胞に対する直接的な増殖抑制作用及び間接的な宿主の免疫機能増強作用によると考えられる。

2.6.2.3 副次的薬理試験

P1101 の副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 hERG カリウムチャネル電流に及ぼす影響（4.2.1.3.1 Study No. 7975-106）

方法

hERG（ヒト ether-à-go-go-関連遺伝子）カリウムチャネルを安定的に発現させた HEK293（ヒト胎児由来腎臓細胞）を用いて、hERG カリウムチャネル電流に及ぼす影響について検討した。ホールセルパッチクランプ法を用いて hERG テール電流を測定し、P1101（2 濃度）の影響を 35±2°C で検討した。P1101 は最高濃度として C_{max} 付近の濃度である 2.5 µM（50 µg/mL）及び 0.3 µM（実測濃度 0.25 µM、5 µg/mL）を用い、1 濃度あたり 4 細胞で検討した。溶媒（塩化ナトリウム、ポリソルベート 80、ベンジルアルコール、無水酢酸ナトリウム、酢酸及び水）及び陽性対照（60 nM テルフェナジン）の影響はそれぞれ 3 及び 2 細胞で検討した。各測定の最後に過最大濃度の hERG チャネル阻害薬（E-4031、500 nM）を添加し、内部標準とした。試料分析には検証済の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた。

結果

P1101 による hERG チャネルカリウム電流の阻害作用について表 2.6.2-2 に示した。最高濃度〔2.5 µM（50 µg/mL）〕における阻害率は 50%未満（49.9%）であったことから IC_{50} 値は算出できなかった。なお、陽性対照（60 nM テルフェナジン）での阻害率は 77.1±0.1%（平均値±標準偏差）と、良好な反応が確認された。

表 2.6.2-2 hERG チャネルに対する P1101 の阻害作用

Concentration	% Inhibition (Mean ± SEM)	Measured Cells
0 (Control)	0.4±0.2	3
0.3 µM (0.25 µM, 5 µg/mL actual)	10.8±0.6	4
2.5 µM (50 µg/mL)	49.9±2.9	4

Data source：4.2.1.3.1 Study No.7975-106 Table -2.

試料分析の結果、P1101 の 2.5 µM（50 µg/mL）溶液の実測濃度は標的濃度に比べて-0.4%の差しかみられず、基準内（±15%）であった。一方、0.3 µM 溶液の実測濃度は 0.25 µM（5 µg/mL）（標的濃度との差-16.7%）であり、わずかに基準外であった。

結論

P1101 は、2.5 µM（50 µg/mL）で hERG カリウムチャネル電流を 49.9%阻害した（P<0.05、Dunnett の多重比較検定）。本濃度は臨床試験で得られた血漿中濃度（C_{max}=24.84±8.66 ng/mL、5.3.5.2.2 P1101-2010 試験：PEGINVERA-PV 試験）（2.7.2.2.1.4）よりも非常に高濃度であることから、臨床的関連性は乏しいものと考えられる。

2.6.2.4.2 カニクイザルの心血管系に及ぼす影響（単回静脈内投与）（4.2.1.3.2 Study No 2872-001）

方法

P1101 の薬理活性を示す適切な動物種としてカニクイザルを選択し、心血管系に及ぼす影響に

ついて検討した。無処置雄性カニクイザル（4～5歳、7.0～9.3 kg）（6例）にあらかじめテレメトリー装置を装着した。修正ラテン方格法に従って動物に溶媒（塩化ナトリウム、ポリソルベート80、ベンジルアルコール、無水酢酸ナトリウム、酢酸及び水）又は被験物質を静脈内投与した（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3 Study No.2872-001 における試験群と投与量

Study Day	Animal and Treatment (μg/kg)					
	1 M	2 M	3 M	4 M	5 M	6 M
1	0	600	60	-	-	-
3	-	-	-	60	600	0
15	600	60	0	-	-	-
17	-	-	-	600	0	60

Data source：4.2.1.3.2 Study No.2872-001 p12.

溶媒又は被験物質の単回投与後に、テレメトリー装置により体温、ECG パラメータ（RR、QRS、PR、QT 及び QTc 間隔並びに QTcf）、血圧（収縮期、拡張期及び平均動脈圧）並びに心拍数を測定した。ベースラインデータは投与 2 日前に 22 時間記録した。被験物質投与日には、投与前に 60 分間隔で 2 回全パラメータを測定し、投与後は、15、30、45、60、90 及び 120 分後における各パラメータの平均値をオンラインデジタル収集システムで記録した。その後 1 時間ごとに 6 時間後まで記録し、以後更に 2 時間間隔で 22 時間後まで記録した。死亡の有無、症状観察、体重、体温についても評価した。投与液は濃度分析を実施した。

結果

死亡動物、臨床症状及び体重

試験の終了時まですべての動物は生存し、被験物質投与に関連した臨床症状はみられなかった。体重にも変化はみられなかった。

体温

テレメトリーデータから、高用量（600 μg/kg）投与の約 180 分後から 720 又は 840 分後まで、4 例中 3 例で体温が上昇した（平均最高体温、38.5°C）。また、低用量群（60 μg/kg）及び溶媒群の各 1 例でも体温が上昇した。

心機能

600 μg/kg の投与により体温上昇（投与 180～840 分後）がみられた動物で心拍数が上昇し、それに伴い QT 間隔は短縮した。また、低用量の投与により体温が上昇した 1 例においても QT 間隔は短縮した。更に、高用量群（600 μg/kg）の 2 例で QTcf が減少した。

血圧

平均動脈圧は 600 μg/kg の高用量群の 1 例でのみ上昇した。

製剤分析

投与液分析の結果、すべての投与液濃度が液体処方調整の標的濃度の範囲内（名目濃度の 90～110%）であった。

結論

P1101 の静脈内投与により、体温上昇に伴う QT 及び QTc 間隔の短縮及び心拍数上昇がみられた（600 μg/kg 群の 4 例中 3 例及び 60 μg/kg 群の 4 例中 1 例）が、心血管系への有害な作用とは評価されなかった。

2.6.2.4.3 ラットの中枢神経系に及ぼす影響（単回皮下投与）（4.2.1.3.3 Study No. 2872-002）

方法

雄性 Sprague Dawley ラット（6 週齢、184～210 g）を 4 群（6 例／群）に分け、溶媒（塩化ナトリウム、ポリソルベート 80、ベンジルアルコール、無水酢酸ナトリウム、酢酸及び水）又は P1101（0.2、2 及び 20 mg/kg）を 4 mL/kg の容量で皮下投与した。投与 1、2、4、8、24 及び 48 時間後に Irwin 法により一般行動、自律神経系及び自発運動に及ぼす影響を評価し、投与前及び各評価直後に直腸温を測定した。投与 7 日後まで一般状態を観察した。

結果及び結論

P1101 のいずれの投与群においても、溶媒投与群との比較で、一般行動、自律神経系及び自発運動に対する影響は認められなかった。なお、投与液分析の結果、各投与溶液（低、中及び高用量）の濃度は名目濃度のそれぞれ 220、114 及び 98%であった。

2.6.2.4.4 ラットの呼吸器系に及ぼす影響（単回静脈内投与）（4.2.1.3.4 Study No. 2872-004）

方法

雄性 Sprague Dawley ラットを 4 群（6 例／群）に分け、投与 1 時間前に各動物を 1 例ずつプレチスモグラフボックスに入れて順応させた後、各群のラットにそれぞれ溶媒（塩化ナトリウム、ポリソルベート 80、ベンジルアルコール、無水酢酸ナトリウム、酢酸及び水）又は、P1101 の 0.1、1 及び 10 mg/kg を単回静脈内投与してボックスに戻した。投与前及び投与後 6 時間呼吸パラメータ（1 回換気量、分時換気量及び呼吸数）を測定した。

結果及び結論

P1101（0.1、1 及び 10 mg/kg）は、溶媒投与群との比較で、いずれの呼吸パラメータにも有意な影響を及ぼさなかった（P≥0.05、Dunnett の多重比較検定）。なお、投与液分析の結果、各投与溶液（低、中及び高用量）の濃度は名目濃度のそれぞれ 173、116 及び 95%であった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用を検討する P1101 の非臨床試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

ほとんどの PV 患者（96%）において、本疾患は JAK2 キナーゼの体細胞突然変異（*JAK2V617F*）によって誘発されると推測されており[Stein, 2015]、患者の多機能性造血幹細胞にこの変異が生じると赤血球分化に異常が生じる[Jamieson, 2006]。この変異のほかにも、頻度の低い突然変異がいくつか発見されているが、本疾患の進行における役割は不明である。*JAK2V617F* がドライバー変異であることは、トランスジェニック動物モデルにおいて本対立遺伝子の一塩基変異のみで PV 疾患の表現型を与えるのに十分であることから裏付けられている[Mullally, 2010]。マウスへの突然変異造血幹細胞移植により PV 様疾患の発症がみられたのに対して、移植した造血幹細胞よりも後期の分化ステージで既に赤血球系列に分化することが決まっている骨髄性前駆細胞を移植しても PV 様疾患が生じなかったこと[Mullally, 2010]から、突然変異造血幹細胞を特異的にター

ゲットにすることにより長期間な治療的恩恵が得られる可能性が示唆される。

IFNα及びペグ化IFNαは、PV治療薬として適応外で使用されており、数種のペグ化IFNαがC型肝炎治療薬として承認されている。ペグ化IFNαのPVに対する臨床的有効性は十分報告されており、PV患者を用いた多数の試験において、IFNα-2a又はIFNα-2bの投与により血液学的及び分子レベルでの反応が高率で観察されている[Kiladjian, 2008][Quintás-Cardama, 2009][Stauffer Larsen, 2013]。

P1101のPD評価としてカニクイザルにおけるP1101の生物活性を示す目的で単回投与のPD／PK複合試験を実施し、それを既承認のペグ化IFN α-2aであるペガシスと比較した。PD作用はIFNαによって誘発されるOASの血清中活性から推測した。P1101及びペガシスは、いずれもカニクイザルへの30 μg/kgの皮下投与により同程度の最高血清OAS活性を誘発した。OSA活性はペガシスでは投与144時間後以降、徐々に低下したのに対して、P1101ではより安定した反応を示し最高活性は14日後まで持続した。両被験物質が同様の薬物動態プロファイルを示すことから、この違いは2種の被験物質間の活性部分、即ちP1101のPro-IFNα-2b及びペガシスのIFNα-2aに起因すると考えられた。

結論として、P1101はカニクイザルにおいて他のIFN製剤の投与と同様にPD効果を引き起こし、この効果はペガシスと比較して強度的には同程度であり、持続性はより長かった。また、N末に導入したプロリンのペグ化によりIFNa-2bの生物活性が低下するような影響は受けなかった（社内資料）。

PV治療においてIFNαが臨床使用されているが、その作用機序にはいまだ不明な点が残されている。IFNの治療効果は、免疫系刺激作用などのIFNαの広範囲な生物活性を介するという説と共に突然変異造血系細胞への直接作用も関与しているという説も提唱されている[Kiladjian, 2016]。*JAK2V617*変異誘発PVモデルマウスを用いた試験において、マウスIFNα-4は、長期にわたって存在する変異造血系幹細胞が細胞分裂周期に入ることを誘導したことから、IFNα-4は異常な造血系幹細胞の赤血球系への分化を促進することが示唆されている[Mullally, 2013]。IFNαは、変異造血系幹細胞の増殖や分化に複合的に作用することにより、異常な幹細胞プールの枯渇を促進するものと考えられる。本マウスモデルは、また、IFNα-2a治療PV患者の一部で認められた*V617F*の遺伝子変異割合（アレルバーデン）の低下や血液学的反応の機序説明にも利用可能である[Kiladjian, 2008]。加えて、マウスIFNα-4は*V617F*ノックインマウスにおいて、変異細胞のアポトーシスへの感受性を高め、また、正常幹細胞の細胞周期を進行させることにより、*JAK2V617*変異造血系幹細胞でみられる増殖的優位性を排除し、病態の進行を遅延させると考えられている[Hasan, 2013]。

安全性薬理試験として、*in vitro* hERG試験、カニクイザルの心血管系試験並びにラットのCNS及び呼吸器系試験を実施した。

P1101は、2.5 μM（50 μg/mL）でhERGチャネル電流を49.9%阻害した。本試験成績（検討濃度：0.25及び2.5 μM）からは50%阻害濃度（IC_{50}）は算出できなかったが、最高濃度（2.5 μM、50 μg/mL）での阻害率（平均49.9%、最低値～最高値：42.9%～56.0%）が50%に近いため、2.5 μMをIC_{50}と仮定した。なお、2.5 μMは実際のIC_{50}濃度よりも低いことから、この仮定によりhERG電流に対するP1101の影響を過小評価することはないと考えられる。また、2.5 μM（50 μg/mL）は臨床試験で得られた血漿中濃度（C_{max}=24.84±8.66 ng/mL、P1101-2010試験：PEGINVERA-PV試験）（2.7.2.2.1.4）よりも非常に高濃度であることから、臨床における致死性

不整脈発現のリスクはほとんどないものと考えられる。この考察に一致して、カニクイザルにおいても最高 600 µg/kg までの皮下投与で QT 間隔に有害な影響はみられなかった。

患者に皮下投与する P1101 の最高総用量は 500 µg を超えない予定である。最高臨床用量に匹敵する用量（450 µg）を用いた PK が PEGINVERA 臨床試験（2.5.3.1）で検討されており、450 µg を皮下投与した患者（5 例）における平均血清 C_{max} は 48.64 ng/mL であった。なお、PEGINVERA 臨床試験（2.5.3.1）において 2 例に更に高用量の 540 µg を投与したが、この用量のデータは C_{max} 及び全身曝露が 450 µg 投与患者のデータよりも低かったため、PK 解析には使用されなかった。450 µg を投与した患者での平均血清中 C_{max} は、仮定 IC_{50} である 2.5 µM（50 µg/mL）の 1/1028 であった。また、10.8%の hERG 電流阻害作用がみられた 0.25 µM（5 µg/mL）との比較では、102.8 倍の安全域が認められた。なお、曝露量比較には遊離血漿中濃度ではなく総血清中薬物濃度を用いたため実際の安全域はより大きいと考えられる。

以上のように、*in vitro* で hERG チャネル阻害作用が 0.25 µM で観察されたが、十分な安全域がみられたことから、患者の安全性上、致死性不整脈のリスクはほとんどないものと考えられる。また、P1101 は 40 kDa の巨大なポリエチレングリコール成分が共有結合したタンパク質であり、その大きさのため hERG チャネルを阻害するとは考え難い。したがって、本 *in vitro* 試験でみられた結果は、hERG チャネルとの直接的な相互作用ではなくアーチファクトであると考えられる。

カニクイザルの心血管系試験において、600 µg/kg 群の 4 例中 3 例及び 60 µg/kg 群の 4 例中 1 例に一過性の体温上昇及び心拍数の増加が観察されたが、これらの変化は溶媒投与群でもみられたことから、有害な変化とは評価されなかった。ECG パラメータに有害な変化はみられず、QT 間隔の延長も観察されなかった。本試験において、PK データは測定しなかったが、カニクイザルを用いた 4 週間皮下投与毒性試験で、同程度の用量での P1101 の血清中濃度が測定されている（2.6.6.3.4、4.2.3.2.4 Study 7975-101）。本毒性試験の投与経路（皮下）は安全性薬理試験（静脈内）とは異なるが、カニクイザルにおける P1101 皮下投与時のバイオアベイラビリティが約 80%と推定されること（2.6.4.4.3）を考慮すると、本毒性試験の PK データは安全域の評価に補助的に利用できる。また、本毒性試験には ECG による心機能の評価が含まれており、最高 6.75 mg/kg の投与量まで有害な変化は観察されなかった。動物及びヒトの血清中 P1101 濃度の比較を表 2.6.2-4 に示した。カニクイザルの血清中濃度はヒトの血清中濃度をはるかに超えており、非常に大きな安全域が示された。なお、カニクイザルとヒト間で P1101 の血漿及び／又は血清タンパク結合に大差はないと予測されるため、遊離血漿中濃度ではなく血清中濃度を使用した。タンパク結合（非結合 P1101 濃度）にたとえ差があったとしても、その大きな安全域により補えるものと考えられる。

表 2.6.2-4 カニクイザル及びヒトの血清中濃度の比較

用量	C_{max} [ng/mL] 雄/雌	曝露量比（Multiple of Exposure）[a] 雄/雌
Day 1 (0.675 mg/kg)	6488/8093	133/166
Day 1 (6.75 mg/kg)	82713/81030	1701/1666

[a] 主要毒性試験における初回投与後の血清中 C_{max} と臨床用量 450 mg 投与後のヒト C_{max} の平均値（C_{max}=48.64 ng/mL）との比率として算出

ラットにおいて、P1101 の最高 20 mg/kg までの単回皮下投与により、中枢神経系及び体温に有害な影響はみられなかった。同様に、10 mg/kg の単回静脈内投与により、呼吸器系に有害な影響

はみられなかった。なお、ヒト IFNα-2b はげっ歯類において生物活性を示さないことから、これらの成績をヒトに外挿することは限界がある。カニクイザルの毒性試験では、最高 6.75 mg/kg までの皮下投与において神経系又は呼吸器系への P1101 の影響を示唆する臨床兆候は認められなかった。この知見を支持するものとして、ペグイントロン投与カニクイザルの安全性薬理試験において「中枢神経系（カニクイザル、ラット）…呼吸器系（ラット）・・・に対して、本薬では試験に用いた用量において特記すべき事項は認められていない」との記載がある〔ペグイントロン皮下注用 50 μg/0.5 mL 用の審査報告書（平成 16 年 8 月 10 日）、p19)〕。IFN 投与患者においては神経系及び呼吸器系への有害事象が報告されており、これは Module 2.5 で議論されている。また、添付文書の重要な基本的注意欄に呼吸器症状及び精神神経症状発現の際の注意事項が記載されている〔ペグイントロン皮下注用 50 μg/0.5 mL 用添付文書、2021 年 4 月改定（第 2 版)〕。

結論として、カニクイザルを用いた PD/PK 複合試験において、ペガシスと比較して P1101 は同程度の生物活性を示し、効果の持続時間はペガシスよりも長かった。カニクイザル及びラットを用いた安全性薬理試験において、P1101 は、心血管系、CNS 及び呼吸器系に有害な影響を及ぼさず、良好な安全性プロファイルを示した。

2.6.2.7 図表

図表は本文中に記載した。

2.6.2.8 参考文献

1) Hasan S, Lacout C, Marty C, Cuingnet M, Solary E, Vainchenker W, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNα. Blood. 2013;122(8):1464-77.
2) Jamieson CH, Gotlib J, Durocher JA, Chao MP, Mariappan MR, Lay M, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(16):6224-9.
3) Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. Blood. 2008;112(8):3065-72.
4) Kiladjian JJ, Giraudier S, Cassinat B. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. Leukemia. 2016;30(4):776-81.
5) Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, Heidel FH, Purdon A, Vu T, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-α in a murine model of polycythemia vera. Blood. 2013;121(18):3692-702.
6) Mullally A, Lane SW, Ball B, Megerdichian C, Okabe R, Al-Shahrour F, et al. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. Cancer Cell. 2010;17(6):584-96.
7) Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Manshouri T, Luthra R, Estrov Z, Pierce S, et al. Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. J Clin Oncol. 2009;27(32):5418-24.
8) Stauffer Larsen T, Iversen KF, Hansen E, Mathiasen AB, Marcher C, Frederiksen M, et al. Long term molecular responses in a cohort of Danish patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis treated with recombinant interferon alpha. Leuk Res. 2013;37(9):1041-5.
9) Stein BL, Oh ST, Berenzon D, Hobbs GS, Kremyanskaya M, Rampal RK, et al. Polycythemia Vera: An Appraisal of the Biology and Management 10 Years After the Discovery of JAK2 V617F. J Clin Oncol. 2015;33(33):3953-60.
10) Brassard DL, Grace MJ, Bordens RW. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. J Leukoc Biol. 2002;71(4):565-81.
11) Corssmit EP, de Metz J, Sauerwein HP, Romijn JA. Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. J Interferon Cytokine Res. 2000;20(12):1039-47.
12) Gisslinger H, Zagrijtschuk O, Buxhofer-Ausch V, Thaler J, Schloegl E, Gastl GA, et al. Ropeginterferon alfa-2b, a novel IFNα-2b, induces high response rates with low toxicity in patients with polycythemia vera. Blood. 2015;126(15):1762-9.
13) Grace M, Youngster S, Gitlin G, Sydor W, Xie L, Westreich L, et al. Structural and biologic characterization of pegylated recombinant IFN-alpha2b. J Interferon Cytokine Res. 2001;21(12):1103-15.
14) Lipiäinen T, Peltoniemi M, Sarkhel S, Yrjönen T, Vuorela H, Urtti A, et al. Formulation and stability of cytokine therapeutics. J Pharm Sci. 2015;104(2):307-26.
15) Kiladjian JJ, Giraudier S, Cassinat B. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. Leukemia. 2016;30(4):776-81.

16) Laubach JP, Fu P, Jiang X, Salter KH, Potti A, Arcasoy MO. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. Exp Hematol. 2009;37(12):1411-22.
17) Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, Heidel FH, Purdon A, Vu T, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-α in a murine model of polycythemia vera. Blood. 2013;121(18):3692-702.
18) Sakatoku K, Nakashima Y, Nagasaki J, Nishimoto M, Hirose A, Nakamae M, et al. Immunomodulatory and direct activities of ropeginterferon alfa-2b on cancer cells in mouse models of leukemia. Cancer Sci. 2022;113(7):2246-57.
19) Verger E, Soret-Dulphy J, Maslah N, Roy L, Rey J, Ghrieb Z, et al. Ropeginterferon alpha-2b targets JAK2V617F-positive polycythemia vera cells in vitro and in vivo. Blood Cancer J. 2018;8(10):94.
20) Kumaran J, Wei L, Kotra LP, Fish EN. A structural basis for interferon-alpha-receptor interactions. FASEB J. 2007;21(12):3288-96.
21) de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. J Biol Chem. 2007;282(28):20053-7.
22) Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol. 2005;5(5):375-86.
23) Samarajiwa SA, Forster S, Auchettl K, Hertzog PJ. INTERFEROME: the database of interferon regulated genes. Nucleic Acids Res. 2009;37(Database issue):D852-7.
24) Katayama T, Nakanishi K, Nishihara H, Kamiyama N, Nakagawa T, Kamiyama T, et al. Type I interferon prolongs cell cycle progression via p21WAF1/CIP1 induction in human colon cancer cells. Int J Oncol. 2007;31(3):613-20.
25) Eguchi H, Nagano H, Yamamoto H, Miyamoto A, Kondo M, Dono K, et al. Augmentation of antitumor activity of 5-fluorouracil by interferon alpha is associated with up-regulation of p27Kip1 in human hepatocellular carcinoma cells. Clin Cancer Res. 2000;6(7):2881-90.
26) Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2016;16(3):131-44.
27) Biron CA, Sonnenfeld G, Welsh RM. Interferon induces natural killer cell blastogenesis in vivo. J Leukoc Biol. 1984;35(1):31-7.
28) Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol. 1999;17:189-220.
29) Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. Nat Rev Immunol. 2015;15(7):405-14.
30) Sandrelli A, De Fabritiis P, Di Nucci GD, Simone F, Di Matteo G, Mandelli F. In vitro antitumor effect of LAK cells and alpha interferon in combination on tumor cell lines. J Biol Regul Homeost Agents. 1992;6(3):93-8.
31) Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016;127(3):325-32.
32) Chen E, Mullally A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2014;2014(1):268-76.

33) Lu M, Zhang W, Li Y, Berenzon D, Wang X, Wang J, et al. Interferon-alpha targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway. Exp Hematol. 2010;38(6):472-80.
34) Aranaz P, Hurtado C, Erquiaga I, Miguéliz I, Ormazábal C, Cristobal I, et al. CBL mutations in myeloproliferative neoplasms are also found in the gene's proline-rich domain and in patients with the V617FJAK2. Haematologica. 2012;97(8):1234-41.
35) Rao TN, Hansen N, Stetka J, Luque Paz D, Kalmer M, Hilfiker J, et al. JAK2-V617F and interferon-α induce megakaryocyte-biased stem cells characterized by decreased long-term functionality. Blood. 2021;137(16):2139-51.
36) Gisslinger H, Klade C, Georgiev P, Krochmalczyk D, Gercheva-Kyuchukova L, Egyed M, et al. Ropeginterferon alfa-2b versus standard therapy for polycythaemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. Lancet Haematol. 2020;7(3):e196-e208.
37) Edahiro Y, Ohishi K, Gotoh A, Takenaka K, Shibayama H, Shimizu T, et al. Efficacy and safety of ropeginterferon alfa-2b in Japanese patients with polycythemia vera: an open-label, single-arm, phase 2 study. Int J Hematol. 2022;116(2):215-27.
38) Pardanani A, Lasho TL, Finke C, et al. Prevalence and clinicopathologic correlates of JAK2 exon 12 mutations in JAK2V617F-negative polycythemia vera. Leukemia. 2007; 21(9):1960-1963.
39) Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. Leukemia. 2008; 22(7):1299-1307.

Ropeginterferon alfa-2b
ベスレミ皮下注 250 μg シリンジ
ベスレミ皮下注 500 μg シリンジ

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3 薬理試験概要表

ファーマエッセンシアジャパン株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293（ヒト胎児由来腎細胞 293）
hERG	Human Ether-à-go-go Related Gene（ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子）
QTcf	Fridericia 法で補正した QT 間隔

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 5
2.6.3.3 副次的薬理試験 6
2.6.3.4 安全性薬理試験 7
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 8

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Overview		Test Article: P1101			
Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Module
Primary Pharmacodynamics					
PK and PD study	Cynomolgus monkey	Subcutaneous, Intravenous	[redacted]	44104-08-242	4.2.2.2.1
Secondary Pharmacodynamics	No secondary pharmacodynamic studies were performed				
Safety Pharmacology					
hERG Assay	*In vitro* / HEK293 cells	-	[redacted]	7975-106	4.2.1.3.1
Cardiovascular Function	Cynomolgus monkey	Intravenous	[redacted]	2872-001	4.2.1.3.2
Central Nervous System Function	Sprague Dawley rat	Subcutaneous	[redacted]	2872-002	4.2.1.3.3
Respiratory Function	Sprague Dawley rat	Intravenous	[redacted]	2872-004	4.2.1.3.4
Pharmacodynamic Drug Interactions	No pharmacodynamic drug interaction studies were performed.				

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

The results are presented in detail in Chapter 2.6.2.2.1 of Section 2.6.2.

2.6.3.3 副次的薬理試験

No secondary pharmacodynamic studies were performed.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ System Evaluation	Species/Strain	Method of Admin.	Doses[a]	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study number	Module
Cardiovascular Function	HEK293 cells	*In vitro*	0, 0.3, 2.5 µM	4	10.8% and 49.9% inhibition of hERG channel current at 0.3 and 2.5, respectively.	Yes	7975-106	4.2.1.3.1
Cardiovascular Function	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 60, 600 µg/kg	4 M	No death, no test item related clinical signs and no effects on body weight observed. Increase of body temperature (mean: 38.5°C) during 180-840 minutes post dose in 3/4 animals at 600 and in 1/4 at each 0 and 60. Increase of heart rates with corresponding QT shortening in the same animals showing increase of body temperature at 600. Reduction of QTcf in 2/4 at 600. Elevation of mean arterial pressure in 1/4 at 600.	Yes	2872-001	4.2.1.3.2
Central Nervous System Function	Sprague Dawley rat	Subcutaneous	0, 0.2, 2, 20 mg/kg	6 M	No behavioral, physiological or body temperature changes observed at all dose levels.	Yes	2872-002	4.2.1.3.3
Respiratory Function	Sprague Dawley rat	Intravenous	0, 0.1, 1, 10 mg/kg	6 M	No statistically significant changes in respiratory parameters (tidal volume, minute volume and rate of respiration) during a 6-hour period at all dose levels.	Yes	2872-004	4.2.1.3.4

a: Single dose unless specified otherwise.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

No pharmacodynamic drug interaction studies were performed.