2.6.1 緒言

KalVista Pharmaceuticals

目次

2.6.1 緒言 3
原薬の物理化学的特性 3
製剤の剤形 3
遺伝性血管性浮腫及びセベトラルスタットの作用機序 3
効能又は効果 4
用法及び用量 4
概要 4

図一覧

図 1: セベトラルスタット（KVD900）の化学構造 3

2.6.1 緒言

セベトラルスタット（KVD900 又は KV123900 とも呼ばれる）（以下、「本薬」という）は、成人及び 12 歳以上の小児における遺伝性血管性浮腫（HAE）発作の経口治療薬として開発された、ヒト血漿カリクレイン（PKa）に対する新規低分子阻害薬である。

本薬の化学構造を図 1 に示す。

原薬の物理化学的特性

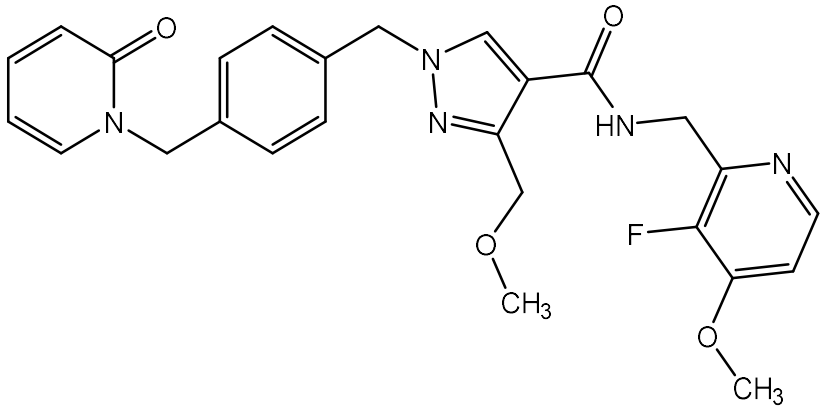


図 1: セベトラルスタット（KVD900）の化学構造

医薬品国際一般名称（INN）	Sebetralstat
日本医薬品一般的名称（JAN）	セベトラルスタット
化学名	N-[(3-フルオロ-4-メトキシピリジン-2-イル)メチル]-3-(メトキシメチル)-1-({4-[(2-オキソピリジン-1(2H)-イル)メチル]フェニル}メチル)-1H-ピラゾール-4-カルボキシアミド
開発番号	KVD900 KV123900/CML1955 PPP758 PPP758 COND
CAS 番号	1933514-13-6
分子式	$C_{26}H_{26}FN_5O_4$
分子量	491.51

製剤の剤形

セベトラルスタット 300 mg フィルムコーティング錠は、速放性の黄色で楕円形のフィルムコーティング錠である。

遺伝性血管性浮腫及びセベトラルスタットの作用機序

HAE は、患者を衰弱させ、生命を脅かす可能性がある希少疾患であり、カリクレイン-キニン系（KKS）を制御する C1 インヒビター（C1-INH）の活性が不十分であることで引き起こされる。これにより、KKS の自然活性化が生じた結果、過剰な PKa 活性、高分子キニノーゲン（HK）の切断、及びブラジキニン（BK）生成の増加がもたらされる。HAE は、血管透過性の亢進及び浮腫による再発的で通常予測不可能な組織腫脹を特徴とする。

本薬は、 血漿カリクレイン（PKa）は、遺伝性血管性浮腫（HAE）において浮腫を引き起こすブラジキニン（BK）を遊離する高分子キニノーゲン（HK）を切断するセリンプロテアーゼである。本剤は、HAE の急性発作治療薬として開発された強力かつ選択的な新規経口 PKa 阻害剤であり、経口投与後、速やかに吸収され、PKa をほぼ完全に阻害し、過剰な BK 産生を抑制することにより、HAE 発作の血管透過性の亢進を制御する。また、本剤は、PKa の阻害を介し、第 XIIa 因子及び追加の PKa を産生するカリクレイン系のフィードバック機構を阻害する。

効能又は効果

遺伝性血管性浮腫の急性発作

用法及び用量

通常、成人及び 12 歳以上の小児にはセベトラルスタットとして 1 回 300 mg を経口投与する。効果が不十分な場合又は症状が再発した場合は、2 時間以上の間隔をおいて 1 回 300 mg を追加投与することができる。ただし、24 時間あたりの投与回数は 2 回までとする。

概要

HAE の間欠オンデマンド治療を目的とする本薬の臨床開発及び承認申請を裏付けるために、関連する医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（適用される場合）に従い、*in vitro* 及び *in vivo* で包括的な一連の非臨床薬理、安全性薬理、薬物動態・薬物代謝、一般毒性、遺伝毒性、生殖発生毒性、がん原性及び光毒性試験を実施した。各非臨床試験で得られたデータをモジュール 2 の該当する項に示した。

2.6.2 薬理試験の概要文

KalVista Pharmaceuticals

目次

2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 要約 6
2.6.2.2.2 ヒト血漿カリクレイン阻害 8
2.6.2.2.3 非ヒト血漿カリクレインの阻害 16
2.6.2.3 副次的薬理試験 21
2.6.2.4 安全性薬理試験 22
2.6.2.4.1 心血管系 23
2.6.2.4.2 中枢神経系 24
2.6.2.4.3 呼吸器系 24
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 24
2.6.2.6 考察及び結論 24

表一覧

表 1 セベトラルスタットによる非ヒト血漿カリクレインに対する酵素活性阻害データ 18
表 2: セリンプロテアーゼ酵素の阻害 22
表 3: 雄 NHP における心血管系試験での単回投与時のセベトラルスタットの薬物動態 23

図一覧

図 1 血漿カリクレイン-キニン酵素経路の活性化 7
図 2: 単離ヒト PKa 親和性アッセイにおけるセベトラルスタット（KV123900）の Ki の測定 . 9
図 3: PKa の酵素活性測定法による未希釈ヒト活性化血漿中でのセベトラルスタット（KV123900）の IC_{50} の測定（119_KV123900_PH_2019 試験） 10
図 4: HAE 患者及び（非 HAE）健康被験者の血漿中におけるセベトラルスタットの IC50 の測定（ns－非有意）（192_KV123900_PH_2021 試験） 11
図 5: 予め活性化した未希釈ヒト血漿中の PKa 酵素活性に対するセベトラルスタット（KVD900）による阻害、PKa の酵素活性アッセイ（146_KV123900_PH_2020 試験） 12
図 6: セベトラルスタット（KVD900）の HK／cHK 抗体に対する用量反応関係（ProteinSimple WES™ システムで得た曲線下面積データの画像）（178_KVD900_PH_2020 試験） . 13
図 7: 異なる濃度のセベトラルスタット（KVD900）が HK 切断に及ぼす影響（178_KVD900_PH_2020 試験） 13
図 8: 異なる濃度のセベトラルスタットが cHK 量に及ぼす影響（178_KVD900_PH_2020 試験） 14
図 9: DXS で活性化した健康被験者血漿中における KKS タンパク質に対するセベトラルスタット（KVD900）の経口投与が及ぼす影響（115_KV123900_PH_2019 試験及び 123_KV123900_PH_2019 試験、Duckworth 2022 で発表） 15
図 10: DXS で活性化した HAE 患者の血漿中における全長 HK の量に対するセベトラルスタット（KVD900）の用量反応関係（091_KV123900_PH_2018 試験） 16
図 11: NHP 活性化希釈血漿中のセベトラルスタット（KV123900）の IC50 の測定、NHP に経口投与した後の PKa の酵素活性アッセイ 20
図 12: ラットにおけるカラゲニン誘発足浮腫に対する経口 KVD900（KV123900）投与の影響 21

略語一覧

略語	英語	日本語
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the concentration versus time curve	濃度–時間曲線下面積
B1R	bradykinin B1 receptor	ブラジキニン B1 受容体
B2R	bradykinin B2 receptor	ブラジキニン B2 受容体
BK	bradykinin	ブラジキニン
C1-INH	complement 1 esterase inhibitor	C1 インヒビター
cHK	cleaved high molecular weight kininogen	切断型高分子キニノーゲン
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
CPE	carrageenan-induced paw edema	カラゲニン誘発足浮腫
DXS	dextran sulfate	デキストラン硫酸
EA	ellagic acid	エラグ酸
FXII	Factor XII	第 XII 因子
FXIIa	Factor XIIa	第 XIIa 因子
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
HAE	hereditary angioedema	遺伝性血管性浮腫
hERG	human ether-à-go-go-related gene	ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子
HK	high molecular weight kininogen	高分子キニノーゲン
IC_{50}	half-maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
Ki	inhibitory constant	阻害定数
KKS	kallikrein-kinin system	カリクレイン-キニン系
K_m	Michaelis–Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
k_{off}	dissociation constant	解離定数
k_{on}	association constant	結合定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
NHP	non-human primate	非ヒト霊長類
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
PKa	plasma kallikrein	血漿カリクレイン

略語	英語	日本語
T_{max}	time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TPGS	D-α-tocopherol polyethylene glycol 1,000 succinate	D-α-トコフェロールポリエチレングリコール 1000 コハク酸エステル

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

セベトラルスタット（KVD900 又は KV123900 とも呼ばれる）（以下、「本薬」という）は、成人及び 12 歳以上の青少年における遺伝性血管性浮腫（HAE）発作の経口治療薬として開発された、ヒト血漿カリクレイン（PKa）に対する新規低分子阻害薬である。

本薬はセリンプロテアーゼ酵素であるヒト PKa の強力で競合的な可逆的阻害薬である。

HAE は、カリクレイン-キニン経路を制御する C1 インヒビター（C1-INH）の活性が不十分であることで引き起こされる、稀な遺伝性疾患である。PKa の活性が増加すると、高分子キニノーゲン（HK）の切断が過剰になり、ブラジキニン（BK）が生成される。BK は血管透過性を亢進させ、HAE 発作の特徴である組織の腫脹と浮腫が生じる。

本薬は、経口投与後、速やかに吸収され、PKa をほぼ完全に阻害し、過剰な BK 産生を抑制することにより、HAE 発作の血管透過性の亢進を制御する。

正常な *in vivo* 生理的条件下では、PKa の前駆体である不活性な酵素前駆体、すなわち血漿プレカリクレインは主に基質 HK と結合して複合体を形成している。HAE 発作中など、カリクレイン - キニン系（KKS）が活性化されているときは、プレカリクレインは活性化第 XIIa 因子（FXIIa）によって切断され、活性プロテアーゼ酵素である PKa が形成され、次に PKa が HK を切断して BK が生成される。C1-INH の非存在下では、PKa の活性増大により HK が過剰に切断され、BK が生成される。BK は血管平滑筋を弛緩させ、血管透過性を亢進させるため、HAE 発作の特徴である組織の腫脹と血管性浮腫が生じる。また、PKa は第 XII 因子（FXII）から FXIIa への変換を促進し、KKS カスケードがさらに開始される。この経路は、FXIIa と PKa の酵素活性を不活性化する C1-INH によって制御されている。

本薬の薬効評価を、種々の *in vitro* 及び *ex vivo* アッセイ、並びに *in vivo* ラット足浮腫モデルを用いて行った。ヒトから採取した臨床試験試料について、同じ *ex vivo* アッセイを用いた探索的薬力学的評価を行っており、その詳細をモジュール 2.7 の要約に示した。

本薬は単離したヒト PKa の競合的、可逆的阻害薬であり、平均阻害定数（Ki）は 3.02 nmol/L であることが示されている。酵素反応速度定数、すなわち結合定数（k_{on}）及び解離定数（k_{off}）に基づくと、本薬はカリクレインときわめて迅速に結合し解離する即効性の阻害薬であるといえる。本薬の見掛けの k_{on} は検出限界を超え確定できなかった（>10 $\mu M^{-1}*sec^{-1}$）。本薬の平均 k_{off} は 0.145±0.019 sec^{-1} であった。

単離したヒト PKa を用いたアッセイに加えて、一連の *in vitro* アッセイを活性化血漿中で行った。これらのアッセイでは、血漿に活性化剤（デキストラン硫酸［DXS］又はエラグ酸［EA］など）を添加して KKS 活性化を促進し、PKa を生成させた（van der Graaf 1982）。血漿活性化の前又は後のいずれの場合に添加しても、本薬は試料中の PKa の活性を阻害することが示された。

健康被験者及び HAE 患者から採取した血漿中で本薬は PKa の酵素活性を阻害することが示されており、平均 50%阻害濃度（IC_{50}）はそれぞれ 54.0 nmol/L、47.5 nmol/L であった。

PKa による内因性基質 HK の切断を本薬が阻害できることも、イムノアッセイ（ProteinSimple WES™）を用いて証明されている。また、このアッセイは、活性化ヒト血漿試料中の切断型 HK（cHK）、プレカリクレイン、FXII、及び FXIIa の定量にも使用されている。本薬は、健康被験者及び HAE 患者の活性化血漿中で、PKa による内因性基質 HK の切断を用量依存的に阻害するこ

とが示されている。HK の切断を阻害すると、BK の生成が阻止される。First in Human 第 1 相試験（KVD900-101 試験）において、経口投与した本薬の薬力学的作用の特徴付けが、健康被験者の活性化血漿試料中で行われ、本薬が HK の切断、cHK の生成、プレカリクレインの切断、FXII の切断及び FXIIa の生成を阻害することで BK の生成を防ぎ、よって PKa がさらに生成されるのを抑制することが示された。

本薬は PKa の酵素活性を阻害することが、複数の非臨床動物種でも明らかにされている。PKa として、組換え酵素（マウス及びウサギ試験）又は活性化後に調製･希釈された血漿（ラット、イヌ、ブタ、非ヒト霊長類［NHP］試験）が使用された。蛍光発生ペプチド基質を用いて測定された IC_{50} 値は、NHP で 5.07 nmol/L、マウスで 13.9 nmol/L、ラットで 69.8 nmol/L、イヌ、ウサギ、ブタで >8,000 nmol/L であった。ラット及び NHP（カニクイザル）で得られた阻害データは、これらの動物種を非臨床毒性試験に使用することが適切であることを示している。

PKa の酵素活性に対する本薬の作用の試験を、ラット及び NHP に *in vivo* で投与した後に *ex vivo* で活性化血漿を用いて実施した。

HAE 発作の確立された動物モデルはないため、本薬の *in vivo* 活性の評価はラットのカラゲニン誘発足浮腫（CPE）モデルを用いて行った。本薬による用量依存性の浮腫抑制が認められ、経口用量 300 mg/kg の本薬はカラゲニン注射後 2、4、6 時間後に有意な浮腫抑制を示した。

本薬はヒト PKa の選択的阻害薬であることが *in vitro* で示されている。本試験では、10 µmol/L 以上の濃度の本薬を用い、PKa に密接に関係するプロテアーゼ酵素のパネル及び酵素、受容体及びトランスポーターの市販パネルに対する阻害を評価した。

本薬がラットの中枢神経（CNS）機能、ラットの呼吸機能及び NHP の心血管機能に影響を及ぼす可能性を調べるために、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用の *in vivo* 安全性薬理試験を実施した。特に心血管系への影響評価を支持するために、QT 延長の可能性（ヒト *ether-à-go-go* 関連遺伝子［hERG］阻害）に関する *in vitro* 試験を行い、本薬が hERG のテール電流に有意な作用を及ぼさないことを示した。本薬の単回経口投与は心拍数、血圧、心収縮力、QTc を含む心電図の諸パラメータに対し影響を及ぼさなかった。これらの試験の結果は、本薬が適応疾患の治療用量でヒトに投与された場合、生命維持機能（CNS、呼吸及び心血管）に影響を及ぼす可能性が少ないことを示唆している。

実施された試験の詳細をモジュール 2.6.3.1 に示し、得られたデータの要約を以下に示す。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 要約

本薬は PKa 阻害薬である。PKa（EC 3.4.21.34）は、自然炎症及び内因性凝固カスケードにおける作用がよく知られているセリンプロテアーゼである（Sainz 2007）。本酵素は、血漿プレカリクレインの活性化により生成される。循環中に 2,050 µg/mL（約 0.5 µmol/L）と多量に存在する 86～88 kDa のこの酵素前駆体糖タンパク質は、その 75%が HK と結合して複合体を形成し、25%が遊離している（Mandle 1976）。血漿プレカリクレインは *klkb1* 遺伝子の産物である。この遺伝子は肝臓、膵臓、腎臓に、この順序で高度に発現し、脳、心臓、脾臓、甲状腺、精巣、腸など他の器官における発現ははるかに少ない（Fink 2007）。

血漿プレカリクレインは酵素前駆体であり、生物学的作用を及ぼすためには活性酵素である PKa に変換されなければならない。FXIIa による酵素前駆体活性化により、血漿プレカリクレインが

切断され、ジスルフィド結合した重鎖と軽鎖で構成される酵素活性を有する PKa が形成される。次に PKa は FXII を切断して FXIIa に変換し、KKS に対しポジティブフィードバックと増幅をもたらす（図 1 参照）。

FXII は、負電荷表面又は巨大分子、並びにプラスミンなどの特定の酵素と相互作用すると活性化される（Naudin 2017）。FXII 及び血漿プレカリクレインの活性化が生じるのは、炎症部位及び出血などの組織傷害部位、活性化血小板上、及びミスフォールドタンパク質上である（Gao 2007、Muller 2009、Maas 2008）。

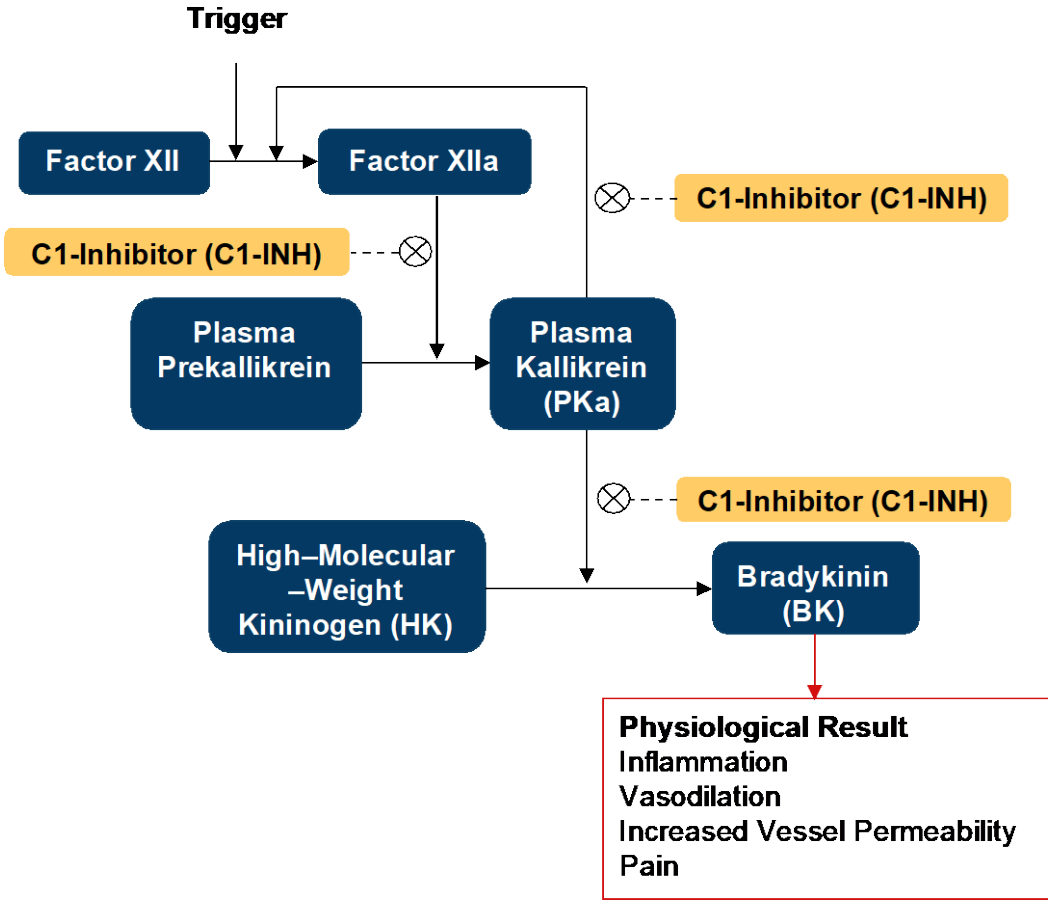


図 1　　血漿カリクレイン-キニン酵素経路の活性化

酵素前駆体型の FXII が自己活性化により FXIIa に変換されると、タンパク質分解カスケードが開始され、その結果、プレカリクレインが活性化され PKa となる。続いて、PKa が HK を切断して BK を遊離させる（それに加えて、ポジティブフィードバックによりさらに FXII が活性化される）。その後、BK がブラジキニン B2 受容体（B2R）に結合して活性化することで細胞内シグナリングカスケードが開始され、その結果、罹患組織に腫脹及び疼痛をもたらす。C1-INH は血漿中の PKa 及び FXIIa の阻害因子であり、PKa による HK 切断及び BK 生成を抑制する。

PKa はその基質である HK を切断して cHK とノナペプチド BK を遊離させる。ノナペプチド BK は血漿中の半減期が 143 秒ときわめて短い血管作動性ホルモンである（Blais 1997）。BK とその切断型である des-Arg^9 BK はそれぞれ、恒常的に発現しているブラジキニン B2 受容体（B2R）及び炎症状態において上方制御されるブラジキニン B1 受容体（B1R）とに選択的に結合する。これらの受容体が活性化されると、血管内皮細胞及び血管の機能が調節され、血管透過性や血管拡張などが起こる。

C1-INH は血漿中の PKa 及び他のプロテアーゼの内因的阻害因子である。C1-INH はセルピンファミリープロテアーゼ抑制因子のメンバーである。C1-INH は肝臓で合成され、0.25 g/L の濃度で血漿中を循環する（Gregorek 1991）。C1-INH は PKa の活性部位に結合し、HK の切断及び BK の生成を抑制する。PKa 及び BK 遊離が血管透過性の亢進において果たす役割が、C1-INH ノックアウトマウス試験で確認されている（Han 2002）。すなわち、同ノックアウトマウスでは、野生型同腹仔と比較して血管透過性が増大することが報告されている。

HAE は常染色体優性の稀な難病であり、およそ 65,000 人に 1 人の割合で発症する。HAE の原因として最も多く、十分に特徴付けされているのは、SERPING1 遺伝子の変異である。この変異により C1-INH の発現が減少するか（HAE 1 型）、機能が低下する（HAE 2 型）。

機能性 C1-INH の量が減少した HAE 患者は、PKa の酵素活性を有効に阻害できない。HAE の発作中は活性化した PKa が十分に抑制されないため、HK の切断及び BK の生成が増加して、血管透過性の亢進及び浮腫といった症状が生じる。血管性浮腫における C1-INH、PKa 及び BK の役割に関する臨床的エビデンスは、B2R 拮抗薬イカチバント（フィラジル®）、C1-INH 補充療法（ベリナート®）など、急性 HAE 発作に対するオンデマンド治療に用いられる既存の既承認療法によって立証されている。日本では 2 種類の PKa 阻害薬、すなわちラナデルマブ（タクザイロ®）及びベロトラルスタット（オラデオ®）が使用できるが、HAE の予防的治療のみが適応とされている（タクザイロの日本の添付文書、オラデオの日本の添付文書）。HAE 発作の治療を適応とした PKa 阻害薬は、現時点で日本では承認されていない。

2.6.2.2.2 ヒト血漿カリクレイン阻害

本薬によるヒト PKa 活性阻害の試験を既報の方法に基づき、さまざまな PKa 調製物を用いて、*in vitro* 及び *ex vivo* で行った。単離されたヒト PKa 酵素に対する阻害の評価と、活性化ヒト血漿（健康被験者及び HAE 患者から採取した血漿を含む）中での阻害の評価を行い、基質として蛍光発生基質及び内因性基質 HK を用いた。

これらの試験の要約を以下に示す。

単離血漿カリクレインの活性

本薬の PKa に対する親和性（Ki）、k_{on} 及び k_{off} を、ヒト血漿から精製された市販の PKa 調製物及び蛍光発生基質 H-DPro-Phe-Arg-AFC を用いて測定した。

Ki アッセイを、8 段階濃度の基質及び 10 段階濃度の本薬を用いて行った（045_KV123900_PH_2016_Human Ki 試験）。全ての阻害薬濃度について、蛍光放出の速度を基質濃度に対してプロットした結果を図 2 に示す。

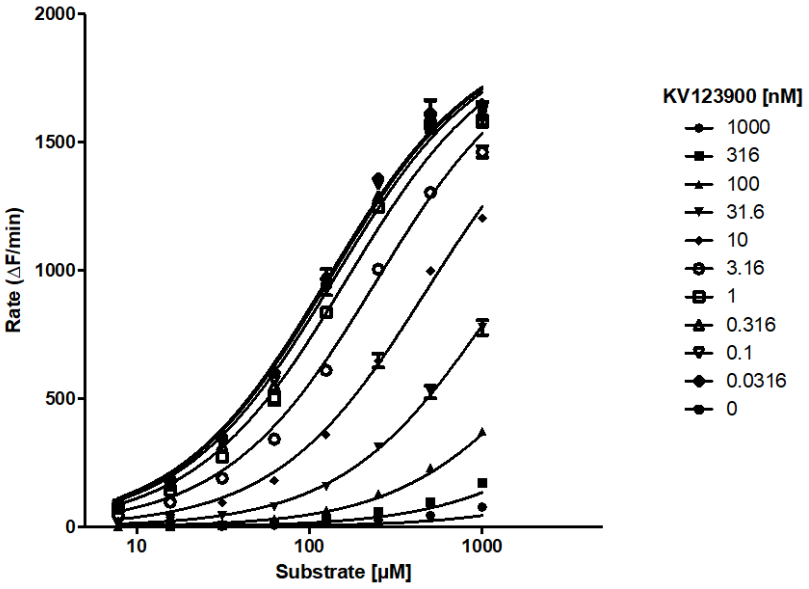


図 2:　単離ヒト PKa 親和性アッセイにおけるセベトラルスタット（KV123900）の Ki の測定

基質と阻害剤の関係を示す代表的なグラフ。データは 2 点の平均値 ± 標準偏差（SD）で示す。

本薬の平均 Ki は 3.02 ± 0.33 nmol/L（平均 ± SD、n=3）であり、これは本薬がヒト PKa の強力な阻害薬であることを示している。図 2 のデータは、本薬が可逆的な競合的阻害薬としてヒト PKa の活性部位に結合し、PKa 基質と競合することも示している。このことは、本薬の濃度を上げても、最大速度（V_{max}）が低下することなく、活性曲線が右方向に平行シフトしていくことから明らかである。

本薬の見掛けの k_{on} の平均値は検出限界（>10 $\mu M^{-1}*sec^{-1}$、n=9）を超えたため確定できず（088_KV123900_PH_2018 試験）、本薬の平均 k_{off} は 0.145 ± 0.019 sec^{-1}（平均 ± SD、n=9）であり（089_KV123900_PH_2018 試験）、PKa の活性部位における本薬の平均半減期（$T_{1/2} = Ln(2)/k_{off}$）は 4.754 ± 0.643 秒であった。

蛍光発生基質を用いて測定したヒト血漿中の血漿カリクレインの酵素活性

単離ヒト PKa を用いた上記のアッセイに加え、蛍光発光基質を使用した既報の方法に基づく一連の *in vitro* アッセイを活性化血漿中で実施した（van der Graaf 1982、Kenniston 2014、Babu 2014）。これらのアッセイでは、活性化剤（DXS 又は EA など）を添加して血漿中の KKS 活性化を促進し、PKa を生成させた。

初めは希釈した全血漿を使用した（059_KV123900_PH_2016 試験、社内資料）。その後、酵素活性と HK 切断を測定するために、DXS を活性化剤とする全血漿（未希釈）*in vitro* アッセイを開発した。

この未希釈ヒト活性化血漿アッセイにより、本薬による酵素活性の *in vitro* 阻害を評価した。対照とするプールしたクエン酸添加ヒト血漿に本薬（8 段階濃度）を添加し、次に蛍光発生基質（H-DPro-Phe-Arg-AFC）を含む溶液及び血漿カリクレイン-キニン経路の活性化剤である DXS 溶液を混合した。これにより、活性化 PKa の酵素活性（蛍光増加速度）を直ちに測定した（119_KV123900_PH_2019 試験）。

本薬の平均 IC_{50} は 54.0 ± 19.56 nmol/L（平均 ± SD、n=5 の独立した実験）であった。代表的な結果を図 3 に示す。

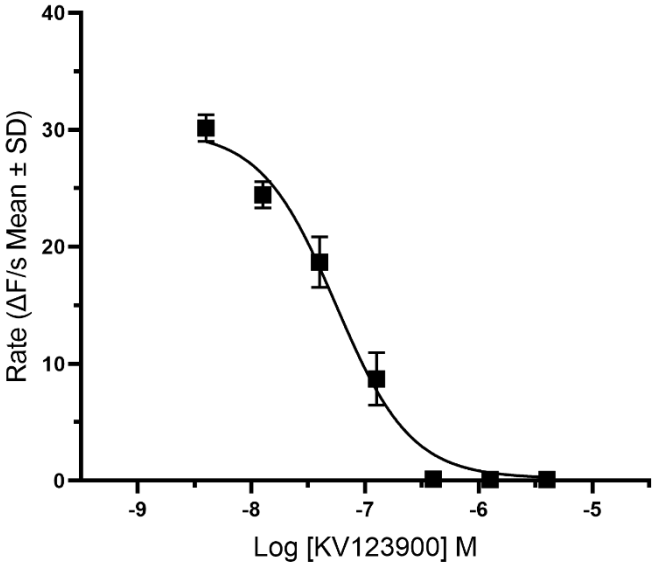


図 3:　PKa の酵素活性測定法による未希釈ヒト活性化血漿中でのセベトラルスタット（KV123900）の IC_{50} の測定（119_KV123900_PH_2019 試験）

IC50 曲線の代表的なグラフ。データは 3 点の蛍光増加速度/秒（Δ 蛍光単位、DFU/秒）の平均値 ± SD で示す。

図 3 のデータは、DXS で活性化した未希釈ヒト血漿中で、PKa の酵素活性に対して本薬が用量依存性の阻害作用を有することを示している。

HAE 患者の血漿中における PKa の *in vitro* 阻害を比較するために、HAE 患者 6 名及び健康被験者 6 名の血漿試料を使用して、本薬の血漿中 IC_{50} を測定した（192_KV123900_PH_2021 試験）。各患者／被験者の未希釈血漿に本薬を添加し（8 段階濃度）、蛍光発生基質及び DXS を含む溶液を混合した。蛍光の増加速度をモニタリングすることで、活性化 PKa の酵素活性を直ちに測定した。

HAE 患者の血漿中における本薬の IC_{50} は 47.5 ± 10.4 nmol/L（幾何平均 ± SD、n=6）で、健康被験者の血漿中における IC_{50}（54.4 ± 13.1 nmol/L［幾何平均 ± SD、n=6］）と同等であった（図 4）。

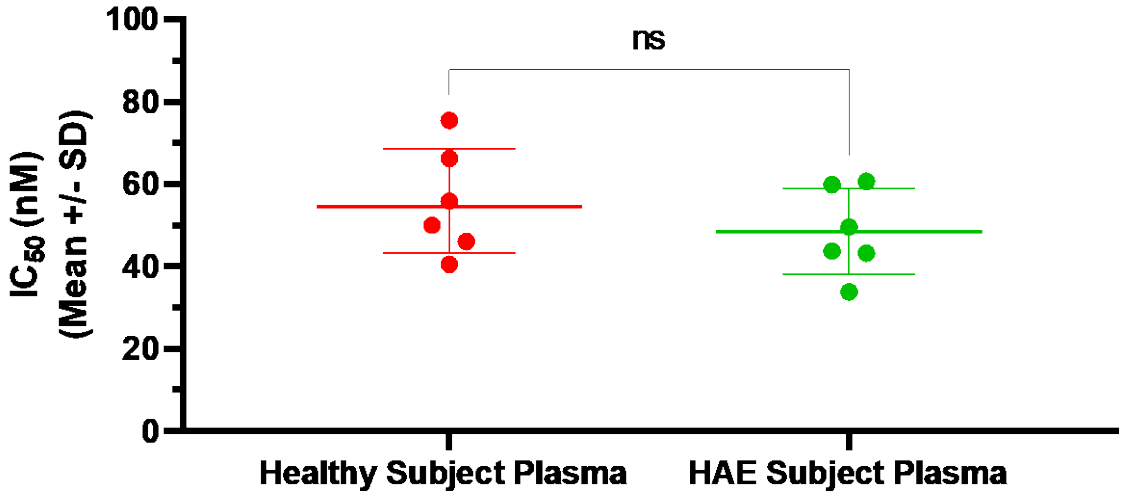


図 4:　HAE 患者及び（非 HAE）健康被験者の血漿中におけるセベトラルスタットの IC50 の測定（ns－非有意）（192_KV123900_PH_2021 試験）

予測通り、未希釈全血漿アッセイ系中では PKa 濃度が高くなるため、0.1 nmol/L の単離 PKa を用いたアッセイと比べ、本薬の IC_{50} が増加するという結果が得られた（Duckworth 2022）。

HAE 発作が認識された時点で本薬を投与するという臨床使用法を模倣するために、本薬の酵素活性阻害能の評価は血漿活性化後に行った（146_KV123900_PH_2020 試験）。

健康被験者の血漿を蛍光発生基質と DXS を含む濃縮溶液と混合した。基質が放出する蛍光の蓄積をモニタリングすることで、活性化酵素活性を直ちに測定した。DXS 添加後 3.5 分（実測値）に、本薬又は水（溶媒対照）を添加し、さらに 12.5 分間蛍光のモニタリングを行った。

本薬は最終濃度 300、1,000、3,000 nmol/L で試験した。対照物質とした C1-INH（PKa の天然の内因性阻害因子）についても単一濃度 3,000 nmol/L（1.2 IU/mL に相当）で試験を行った。結果を図 5 に示す。

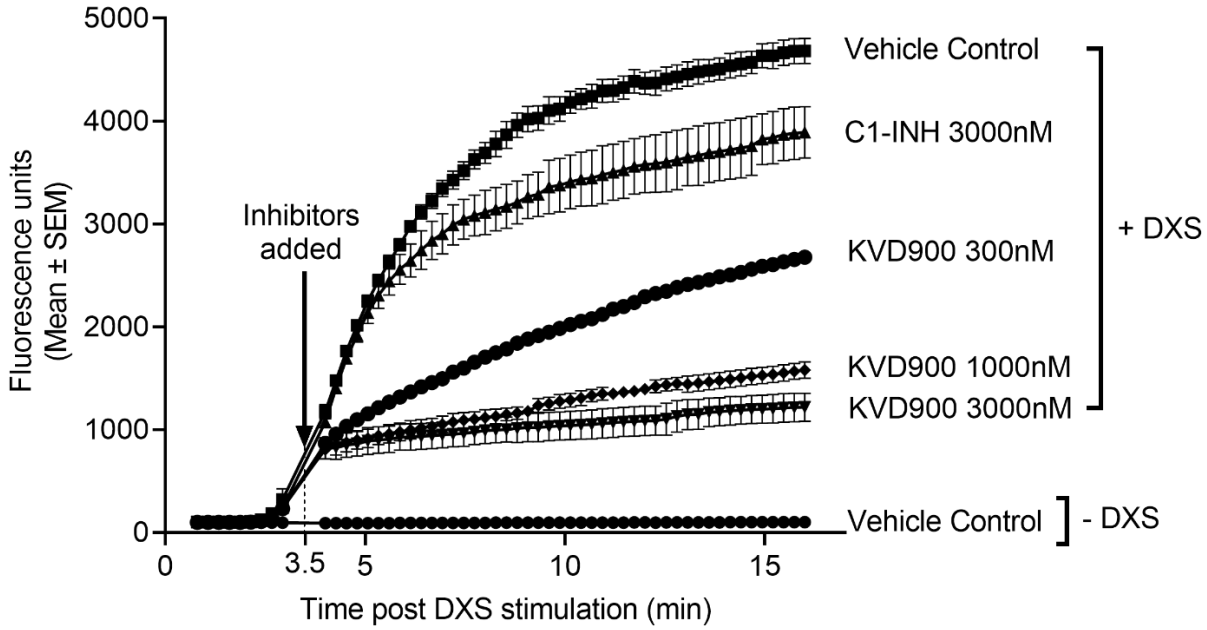


図 5:　予め活性化した未希釈ヒト血漿中の PKa 酵素活性に対するセベトラルスタット（KVD900）による阻害、PKa の酵素活性アッセイ（146_KV123900_PH_2020 試験）

データは経時的総蛍光量（蛍光単位）として示す。3 回の実験の平均値 ± SEM

図 5 のデータは、血漿活性化後に本薬を添加することで、迅速で用量依存性の PKa 活性阻害が引き起こされることを示している。300、1,000 及び 3,000 nmol/L の本薬を添加することで、蛍光発生速度がそれぞれ 73.4%、88.9%、93.0%低下した。本薬による阻害の開始は、PKa の内因性阻害因子である C1-INH による阻害の開始よりも迅速であった。

内因性基質の切断により測定したヒト血漿中のカリクレイン活性

上記の試験では、活性化した血漿調製物を用いて PKa の酵素活性のモニタリングを行うために、小分子量の蛍光発生ペプチド基質を使用した。血漿アッセイは、PKa による KKS の構成成分の切断を本薬が阻害する能力を評価するためにも使用した。このアッセイでは、内因性の全長 HK、FXII、FXIIa、PKa、血漿プレカリクレイン及び切断産物である cHK の量をモニタリングするイムノアッセイを使用した。BK は血漿中の半減期が 30 秒ときわめて短いため、BK 測定の代替指標として cHK が測定されることが多いとの報告がある（Marceau 2020）。

ProteinSimple WES™システムを用いて HK 及び cHK を測定するキャピラリーベースのイムノアッセイを開発するにあたって、従来のウエスタンブロットイムノアッセイ法を使用した（082_KVMULTI_PH_2017 試験及び 084_KV123900_PH_2017 試験、社内資料）。

健康被験者の血漿に DXS 溶液を添加して活性化し、酵素活性アッセイを繰り返し実施した（119_KV123900_PH_2019 試験を参照）。DXS 活性化時間は健康被験者血漿で 17 分、HAE 患者血漿で 10 分間と設定することで、75%を超える HK が切断されるが、これは健康被験者と HAE 患者の内因性阻害因子（C1-INH）量に違いがあることを考慮したものである。所定の活性化時間の後、Laemmli バッファーを添加して反応を停止し、ProteinSimple WES™イムノアッセイを使用して HK 及び／又は cHK の量を測定した。

DXS で活性化した健康被験者のプール血漿中における内因性 HK の切断阻害における本薬（50～1,000 nmol/L）の用量反応関係を、血漿活性化 17 分後に測定した。（178_KVD900_PH_2020 試験）。試料のイムノアッセイには、HK と cHK の両方を検出する抗体を使用した。密度曲線下面積データの画像を図 6 に示す。%HK 及び%cHK のデータは、それぞれ図 7 及び図 8 に示す。

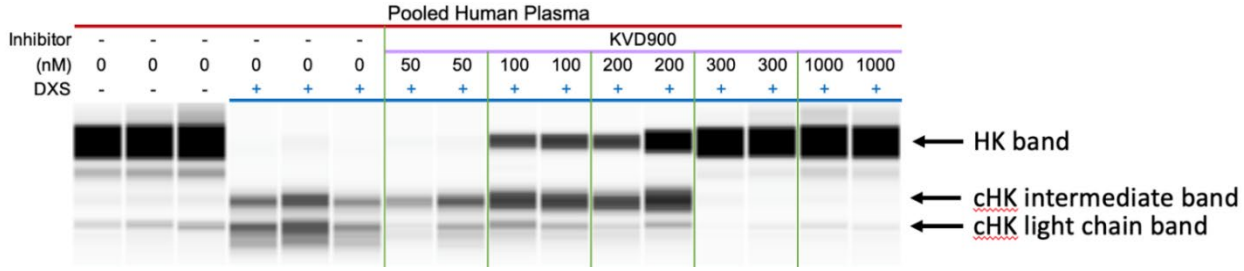


図 6:　セベトラルスタット（KVD900）の HK／cHK 抗体に対する用量反応関係（ProteinSimple WES™ システムで得た曲線下面積データの画像）（178_KVD900_PH_2020 試験）

一回の実験結果を示す。

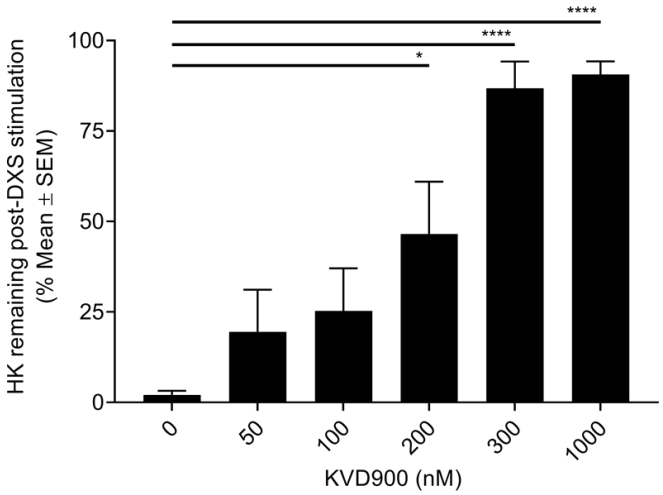


図 7:　異なる濃度のセベトラルスタット（KVD900）が HK 切断に及ぼす影響（178_KVD900_PH_2020 試験）

5 回の実験で得た HK 残存率の平均値と SEM。Dunnett の多重比較検定を用いた通常の一元配置分散分析により有意性を判定した。* P≤0.05、** P≤0.01、*** P≤0.001、**** P≤0.0001

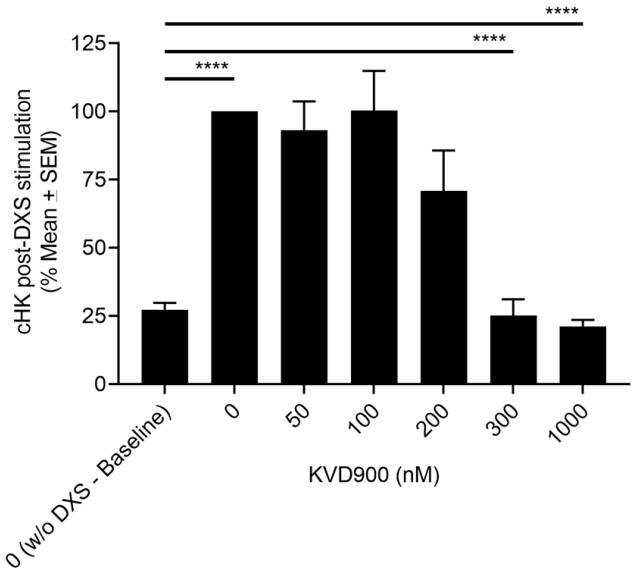


図 8:　異なる濃度のセベトラルスタットが cHK 量に及ぼす影響（178_KVD900_PH_2020 試験）

5 回の実験で得た cHK 生成率の平均値及び SEM。Dunnett の多重比較検定を用いた通常の一元配置分散分析により有意性を判定した。* P≤0.05、** P≤0.01、*** P≤0.001、**** P≤0.0001

イムノアッセイの結果、本薬は活性化血漿中で用量依存的に PKa による HK 切断を保護し、200 nmol/L 以上の濃度において対照試料と比較して有意に HK 切断を阻害することが示された（図 7）。同様に、300 nmol/L 以上の濃度において、HK 切断産物である cHK の有意な減少が認められた（図 8）。

第 1 相試験（KVD900-101 試験）において、本薬 600 mg を単回経口投与した後に健康被験者の血漿を採取し、DXS で活性化した各被験者の血漿中において内因性 HK、プレカリクレイン、FXII の切断及び FXIIa 及び cHK の生成に対する阻害能について評価を行った（115_KV123900_PH_2019 試験及び 123_KV123900_PH_2019 試験）。

本薬 600 mg を投与する前及び投与した後に採取した健康被験者の未希釈血漿試料を、前述の方法により DXS を用いて氷上で 17 分間活性化した。血漿中のタンパク質濃度を測定するために、既知量の精製した HK、血漿プレカリクレイン、FXII 及び FXIIa を、それぞれ HK 欠損、血漿プレカリクレイン欠損及び FXII 欠損血漿に添加して標準曲線を生成した。PK、HK 及び cHK、FXII 及び FXIIa については、それぞれに対する一次抗体を使用して免疫検出を行った。

化学発光曲線下面積データの画像を各 KKS 構成成分の分析グラフとともに示す。%HK、%cHK、%PK、%FXII 及び%FXIIa のデータを、それぞれ図 9 A、B、C、D、E に示す。

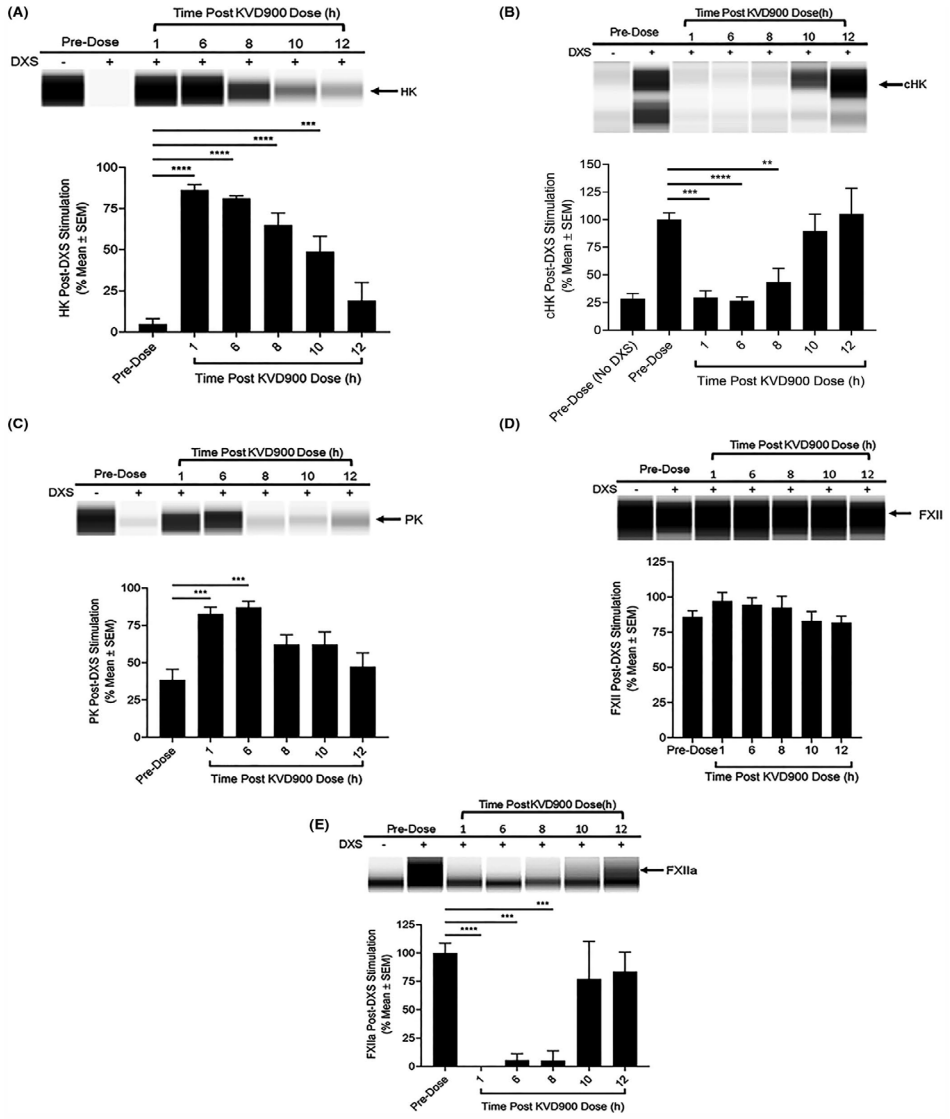


図 9:　DXS で活性化した健康被験者血漿中における KKS タンパク質に対するセベトラルスタット（KVD900）の経口投与が及ぼす影響（115_KV123900_PH_2019 試験及び 123_KV123900_PH_2019 試験、Duckworth 2022 で発表）

KKS タンパク質値の評価は、本薬 600 mg を単回経口投与した 6 名の健康な成人男性から採取した未希釈血漿を DXS（6.25 µg/mL）で活性化（氷上で 17 分間）したものを用いて、キャピラリーベースのイムノアッセイで実施した。キャピラリー電気泳動の代表的な画像を表示した。対応する棒グラフは、(A) HK、(B) cHK、(C) PK、(D) FXII、GK(E) FXIIa の平均パーセント値 ± SEM を示す。cHK：切断型 HK、DXS：デキストラン硫酸、HK：高分子キニノーゲン、PK：血漿プレカリクレイン、SEM：平均値の標準誤差。（p 値：****<0.0001, ***<0.001, **<0.01)

これらの結果は、本薬が血漿プレカリクレインから PKa への変換を防ぎ、また FXIIa の生成を防ぐことを示している。この阻害効果は、KKS における FXII のポジティブフィードバック活性化において PKa が果たす役割が抑制されること（図 1 参照）、また、活性化血漿において HK、血漿プレカリクレイン及び FXII が切断から保護されることと一致している。これらの結果を総合すると、KKS 活性化状態における PKa 及び FXIIa の生成に対する本薬による抑制は、HAE 発作時の HK の切断、BK の生成、KKS 活性化の増幅を減少させる可能性があることが示唆される。

HAE 患者 5 名から採取した未希釈血漿を DXS で 10 分間活性化した。Laemmli バッファーを使用して反応を停止し、血漿を希釈し、全長 HK を検出する一次抗体を用いて ProteinSimple WES™ プラットフォームでイムノアッセイを行うことにより、本薬（50～300 nmol/L）の用量反応関係を評価した（091_KV123900_PH_2018 試験）。データを図 10 に示す。

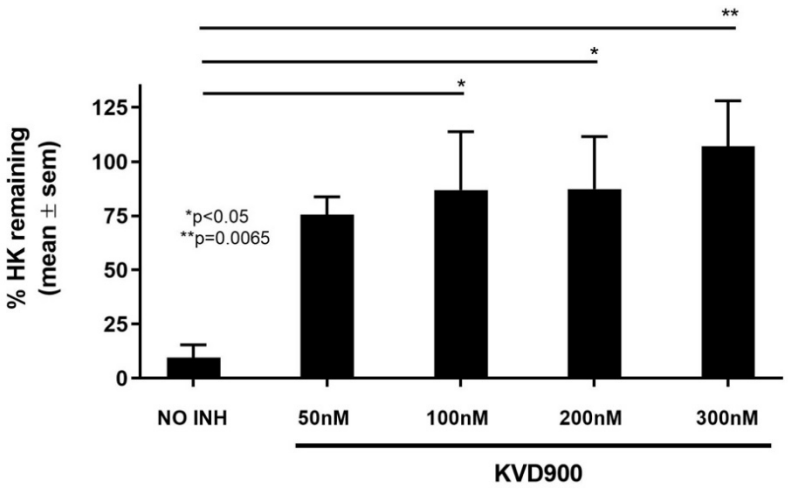


図 10: DXS で活性化した HAE 患者の血漿中における全長 HK の量に対するセベトラルスタット（KVD900）の用量反応関係（091_KV123900_PH_2018 試験）

HAE 患者の未希釈血漿にセベトラルスタット 0（INH なし）、50、100、200、300 nmol/L を添加した DXS による HK 切断アッセイにおける 10 分後の全長 HK 残存率（HK 残存率）。データは平均値 ± SEM で示す（n = HAE 患者 5 名）。個々の患者の実験平均値は、2 回の反応から得た。Dunnett の多重比較検定を用いた通常の一元配置分散分析により有意性を計算した。* P≤0.05、** P≤0.01

この試験の結果は、HAE 患者の活性化血漿中で、濃度 100 nmol/L 以上の本薬は、本薬非添加試料と比較して PKa による HK の切断を有意に阻害することを示している。

蛍光発生基質を使用した活性化血漿アッセイ及び HK 切断イムノアッセイは、第 1 相及び第 2 相臨床試験で得られた探索的薬理試験データの基礎となった（モジュール 2.7.2 を参照）。

2.6.2.2.3 非ヒト血漿カリクレインの阻害

効力を裏付ける試験と毒性試験に使用する動物種の選択のために、本薬の動物種間の交差反応性を調べることを目的とした試験を実施した。

既報の方法に基づく PKa 調製物を用いて、非臨床試験動物種における本薬の PKa 阻害を試験した。これには、組換え酵素（マウス、ウサギ）又は活性化した希釈血漿から調製した PKa（ラット、イヌ、ブタ、NHP の血漿から調製［van der Graaf 1982］）を使用し、また、最小希釈した活性化血漿（ラット、NHP の血漿から調製）における *ex vivo* での PKa 活性阻害の評価も含まれる（046_KV123900_PH_2016 試験、047_KV123900_PH_2016 試験、及び 058_KV123900_PH_2016 試験）。

マウス（UniProt ID：P26262）、ラット（UniProt ID：P14272）及びウサギ（UniProt ID：G1T127）の PKa とヒト PKa とのアミノ酸配列相同性は、それぞれ 76%、75%、81%である。イヌ（UniProt ID：A0A8C0S4B7）及びブタ（UniProt ID：F1RZNZ7）の PKa とヒト PKa（UniProt ID：P03952）

とのアミノ酸配列相同性は、約 80%である。NHP カリクレインとヒトカリクレインとの配列相同性は、種（カニクイザル［UniProt ID：A0A2K5VTJ9］など）によって異なるが、90%以上の水準である。

概して、Ki アッセイでは基質の 8 段階の漸増濃度と阻害薬の 10 段階の濃度で本薬の PKa 親和性を測定し、IC_{50} アッセイでは本薬の 10 段階の濃度及び単一の基質のミカエリス・メンテン定数（K_m）濃度で評価した。データを表 1 に示す。

表 1　　セベトラルスタットによる非ヒト血漿カリクレインに対する酵素活性阻害データ

	Mouse	Rat	Rabbit	Dog	Pig	NHP
PKa preparation	Commercially available recombinant mouse PKa enzyme	Isolated PKa from diluted Sprague Dawley rat plasma	Cloned recombinant rabbit PKa enzyme	Isolated PKa from diluted Beagle dog plasma	Isolated PKa from diluted Gottingen minipig plasma	Isolated PKa from diluted cynomolgus monkey plasma
Substrate	H-DPro-Phe-Arg-AFC	H-DPro-Phe-Arg-AFC	H-DPro-Phe-Arg-AFC	H-DPro-Phe-Arg-AFC	H-DPro-Phe-Arg-AFC	H-DPro-Phe-Arg-AFC
Type of assay	Ki	Ki	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}	IC_{50}
Result	K_i = 6.94 nmol/L Competitive Inhibition	K_i = 37.15 nmol/L Competitive Inhibition	IC_{50} = >40,000 nmol/L	IC_{50} = 8,670 nmol/L	IC_{50} = >40,000 nmol/L	IC_{50} = 5.07 nmol/L
Fold to Human Ki[a]	2.3	12.3	>6,623	1,435	>6,623	0.8
Source	046_KV123900_PH_2016	047_KV123900_PH_2016	058_KV123900_PH_2016			

[a]: Ki calculated value from IC_{50} using Cheng Prusoff equation (058_KV123900_PH_2016), non-human PKa IC_{50} assays were performed using the K_m concentration of substrate, thus the conversion from IC_{50} to Ki is $IC_{50} \div 2$

ラット（IC_{50} 69.8 nmol/L）及び NHP（カニクイザル）（IC_{50} 5.07 nmol/L）の薬理試験データは、これらの動物種を非臨床毒性試験に使用することが適切であることを示している。

IC_{50} 又は Ki のアッセイに加えて、活性化血漿 PKa アッセイ系で PKa の酵素活性に対する本薬の作用を試験した。その結果、ラット及び NHP（カニクイザル）において、血漿への外的添加後、及び *in vivo* 投与後に、本薬による阻害が認められた。これらの試験の要約を以下に示す。

ラット血漿中の血漿カリクレイン活性

活性化剤 EA を用いてラット血漿を活性化し、既報の方法（Kenniston 2014、Babu 2014）を用いて本薬の *in vitro* 阻害作用の測定を行った（060_KV123900_PH_2016 試験）。

本薬（12 段階濃度）をラット血漿試料に添加し、0.5% EA 活性化剤溶液により血漿カリクレイン-キニン経路を 20 分間活性化した。活性化後、血漿を 40 倍に希釈し、蛍光発生基質 H-D-Pro-Phe-Arg-AFC を添加して、放出された蛍光の蓄積をモニタリングすることにより PKa の酵素活性を測定した。

本薬の平均 IC_{50} は 68.4 ± 23.6 nmol/L（平均 ± SD、n=5 の独立した実験）であった。

このアッセイは、臨床試験で用いる可能性があることを反映して、本薬を経口投与した後のラットの血漿中での阻害を評価するためにも使用した（078_KV123900_PH_2017 試験）。最終アッセイ濃度（血漿中濃度を 1：40 に希釈）を投与前（本薬曝露前）の酵素活性に対する阻害率（%）に対してプロットすることで、濃度反応曲線を作成した。

本薬の平均 IC_{50} の計算値は 152 nmol/L であった（動物数 n=9、n=1 の実験由来の複合データ）。

NHP 血漿中の血漿カリクレイン活性

ラット血漿で使用したアッセイ法と同じ方法で NHP 血漿中のカリクレイン活性を評価した。NHP 血漿を EA で活性化し、本薬による *in vitro* 阻害を測定した（080_KV123900_PH_2017 試験）。

本薬（12 段階濃度）を NHP 血漿試料（n=3）に添加し、0.5% EA 活性化剤溶液を添加して PKa を 20 分間活性化した。活性化後、血漿を 40 倍に希釈し、蛍光発生基質 H-D-Pro-Phe-Arg-AFC を添加して、基質から放出された蛍光の蓄積をモニタリングすることで生成した PKa の活性を測定した。

本薬の平均 IC_{50} は 9.46 ± 17.5 nmol/L（平均 ± SD、n=4）であった。

ラット *ex vivo* 試験と同様に、NHP 活性化血漿アッセイを、経口投与及び静脈内投与後の NHP 血漿における本薬による PKa の阻害を研究し、臨床試験で用いる可能性のあるアッセイを開発することに使用した（081_KV123900_PH_2017 試験及び 083_KV123900_PH_2017 試験）。

本薬を静脈内投与（1 mg/kg）又は強制経口投与（1 又は 10 mg/kg）した後（081_KV123900_PH_2017 試験）、又は名目用量 10 mg 及び 100 mg のカプセルで本薬を経口投与した後（083_KV123900_PH_2017 試験）に、血漿試料を採取した。各試験群で NHP の雄 3 匹に本薬を投与し、一連の血液試料をクエン酸ナトリウム中に採取した。血漿中の本薬濃度は、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法（LC-MS/MS）で測定した。薬物動態パラメータをモジュール 2.6.4 の 070_KV123900_PK_2017 試験に要約する。

活性化剤溶液を 20 分間添加して PKa を活性化することで、*ex vivo* PKa 阻害を評価した。活性化後、血漿を希釈し（1:40）、蛍光発生基質 H-D-Pro-Phe-Arg-AFC を添加して放出された蛍光の蓄積をモ

ニタリングすることで、生成した PKa の活性を測定した。最終アッセイ濃度（血漿中濃度を 1:40 に希釈）と、投与前（本薬曝露前）の酵素活性の阻害率（%）を使用して、濃度反応曲線を生成した。

本薬の IC_{50} の計算値は、強制経口投与後及び静脈内投与後には 1.75 nmol/L（動物数 n=3、n=1 の実験由来の複合データ）（081_KV123900_PH_2017 試験）、カプセル充填粉末として投与した場合には 3.2 nmol/L（動物数 n=3、n=1 の実験由来の複合データ）（083_KV123900_PH_2017 試験）であった。第 1 相試験におけるヒトへの投与を反映した、カプセル充填粉末を経口投与した試験のデータを図 11 に示す。

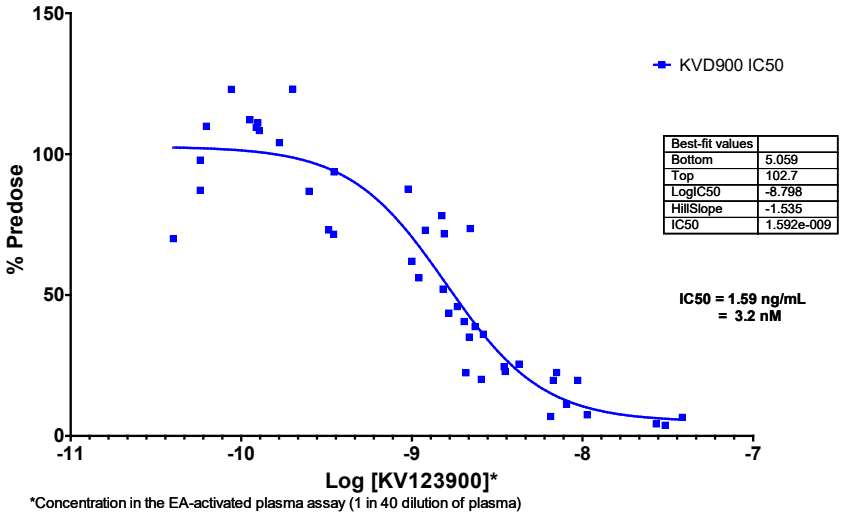


図 11: NHP 活性化希釈血漿中のセベトラルスタット（KV123900）の IC50 の測定、NHP に経口投与した後の PKa の酵素活性アッセイ

IC50 曲線のグラフ。データは濃度・反応複合曲線として示す。試験 083_KV123900_PH_2017 –カプセルに充填した本薬を、名目用量 10 mg 及び 100 mg で NHP の雄 3 匹に強制経口投与した。

図 11 のデータは、名目用量 10 mg 及び 100 mg のカプセルを *in vivo* 投与後に採取した血漿を活性化した場合、経口投与した本薬が血漿中の PKa 活性を阻害することを示している。本薬の IC_{50} データは、既に実施された静脈内投与及び強制経口投与試験と一致する。

これらの NHP におけるデータは、ラットで得られた同様のデータとともに、経口投与後に *ex vivo* で活性化された場合に本薬が PKa 活性に対する阻害能を有することを実証しており、ヒトの臨床アッセイの開発の際に有用となった。

ラットのカラゲニン誘発足浮腫の抑制（CPE-KPL-2 試験、モジュール 2.6.3.1）

これまで十分に報告されている CPE ラットモデルを使用し、Otterness 1988 により報告された方法に基づいて、本薬の潜在的な抗炎症活性を評価した。CPE は HAE の疾患モデルではないが、キニンのほか、炎症誘発性サイトカイン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプタミン、プロスタグランジンなどのいくつかのメディエーターが関与する一般的な炎症のモデルとして汎用されており（Morris 2003）、また PKa 阻害薬である抗体 DX-2930（ラナデルマブ）の *in vivo* 効力試験にも使用された（Kenniston 2014）。

手順の概要は以下の通りである。雄ラット（8 匹/群）の体重を測定し、次にベースラインにおける右後肢の容量を排水量から測定したのち、ラットを 5 群に分けた。時間ゼロ（T=0）において、覚醒ラットに 4 mL/kg のインドメタシンを皮下注射、又は、溶媒、30、100、若しくは 300 mg/kg の本

薬を 10 mL/kg の用量で強制経口投与した。1 時間後、ラットの右後肢の足底下領域に 1%カラゲニン 0.1 mL を皮下注射し、カラゲニン注射の 2、4、6 時間後に、右後肢容量を記録した。

右後肢へのカラゲニン投与の 1 時間前に本薬を経口投与した場合、カラゲニン誘発足浮腫が用量依存的に抑制された。300 mg/kg 投与では、全ての測定時点（カラゲニン注射の 2、4、6 時間後）においてカラゲニン誘発反応が有意に抑制され（Student t 検定、$p<0.05$）、6 時間後の有効性は陽性対照のインドメタシンと同等（いずれも 39%の抑制）であった（図 12）。

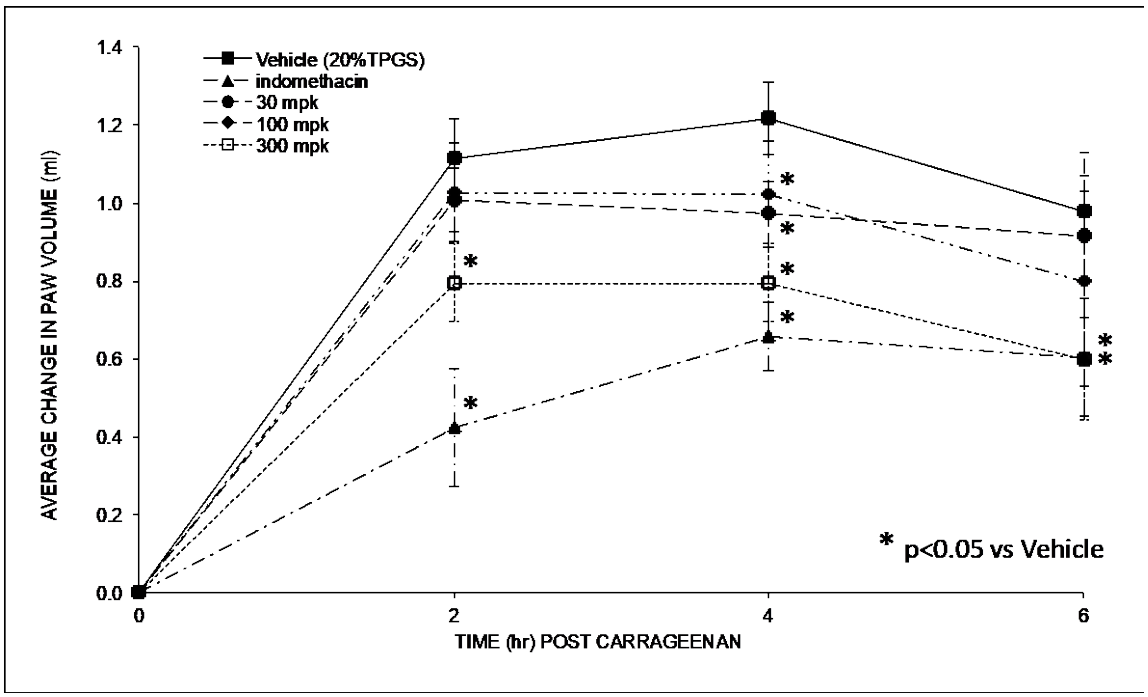


図 12:　ラットにおけるカラゲニン誘発足浮腫に対する経口 KVD900（KV123900）投与の影響

本薬用量の単位（mg/kg）は mpk として示した。データは平均値 ± SD（n=8）として示し、統計学的有意性（p 値）は Student t 検定を用いて溶媒対照群との比較で計算した。

2.6.2.3　副次的薬理試験

PKa 以外の標的との相互作用の可能性については、PKa と密接に関係する 14 種類のセリンプロテアーゼパネル及び広範な受容体、酵素、トランスポーター、イオンチャネルを結合標的とした市販パネルを使用して、*in vitro* で評価した。

各試験の結果を以下に要約する。

ヒトセリンプロテアーゼ酵素である組織カリクレイン 1、プラスミン、トロンビン、トリプシン、FXIIa、第 XIa 因子（FXIa）、第 Xa 因子（FXa）及び第 VIIa 因子（FVIIa）の酵素活性を、適切な蛍光発生及び発色基質を用いて測定した。プロテアーゼ活性は、基質が放出した蛍光の蓄積を 5 分間モニタリングして測定した（057_KV123900_PH_2016 試験）。1 分あたりの蛍光増加率を、対照（本薬なし）の活性に対する割合（%）として示した。各基質の切断の K_m を測定した。化合物阻害薬 IC_{50} アッセイを基質の K_m 濃度で実施し、阻害を受けない対照酵素活性（100%）の 50%の阻害をもたらす阻害薬の濃度（IC_{50}）を用いて活性を算出した。

トロンビン、FXa、FVIIa、βセクレターゼ 1、カテプシン D、カテプシン G、レニン、組織プラスミノーゲン活性化因子、トリプターゼを含むプロテアーゼ酵素パネルについても、市販のパネルを用い、10 µmol/L の単一濃度で測定した（AB31416 試験）。

ヒト PKa IC_{50} の算出値である 6.04 nmol/L と比較した選択性の結果を表 2 に示す。

表 2:　セリンプロテアーゼ酵素の阻害

Enzyme	Mean IC_{50} (nmol/L)	Fold to Human IC_{50}
Plasma Kallikrein (PKa)	6.04[a]	-
Tissue kallikrein 1	>40,000	>6,623
Factor XIIa	>40,000	>6,623
Factor XIa	>40,000	>6,623
Factor Xa	>10,000	>1,656
Factor VIIa	>10,000	>1,656
Trypsin	>40,000	>6,623
Plasmin	>40,000	>6,623
Thrombin	>40,000	>6,623
Beta secretase 1	>10,000	>1,656
Cathepsin D	>10,000	>1,656
Cathepsin G	>10,000	>1,656
Renin	>10,000	>1,656
Tissue plasminogen activator	>10,000	>1,656
Tryptase	>10,000	>1,656

[a]: Human PKa IC_{50} calculated from Ki using Cheng-Prussoff equation (6.04 nmol/L (2 × Ki))

ヒトにおける血漿プレカリクレイン欠乏症は、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）の延長を伴うが、プロトロンビン時間及びトロンビン時間は正常である（Girolami 2010 及び 2018）。多くの *in vitro* ヒト単離凝固カスケード酵素アッセイで本薬の評価が行われており、IC_{50} は FVIIa 及び FXa については 10 µmol/L 超、FXIIa、FXIa 及びトロンビンについては 40 µmol/L 超であった（表 2）。本薬に関連する凝固パラメータへの影響の可能性を、本薬の毒性試験でモニタリングした。詳細については、モジュール 2.6.6 を参照のこと。

本薬（10 µmol/L）のより広範な、一般的な選択性を調べる試験を、計 124 種の受容体、酵素、トランスポーター及びイオンチャネルを結合標的とした市販パネルを使用して行った（AB31416 試験）。

50%を超える阻害を有意とみなした場合、本薬はこれらの標的のいずれに対しても有意に結合を阻害しなかった。10 µmol/L で 50%の阻害という値は、1,656 倍を超える選択性に相当する。

2.6.2.4　安全性薬理試験

一連の安全性薬理試験を、ICH S7A のガイドライン（安全性薬理試験ガイドライン）及び ICH S7B のガイドライン（ヒト用医薬品の心室再分極遅延［QT 間隔延長］の潜在的可能性に関する非臨床的評価）に従って実施した。全てのピボタル試験は GLP 適用で実施した。これらの試験で得られたデータの要約を以下及びモジュール 2.6.3.4 に示す。

2.6.2.4.1 心血管系

予備試験では、本薬が QT を延長する可能性について評価した。この評価は、安定的にヒト hERG K^+チャネルを導入したチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞を使用した GLP 非適用の *in vitro* ホールセルパッチクランプ電気生理学的試験で行った（A1498 試験）。

名目濃度 1.1、3.3、11、33 µmol/L で試験した結果、最も高い本薬濃度（33 µmol/L）における hERG のテール電流振幅の阻害は 35%未満であった。

ピボタルな *in vitro* hERG 試験では、本薬による QT 延長の可能性を、ヒト胚性腎細胞（HEK293）に安定的に発現している hERG K^+チャネルを用い、ホールセルパッチクランプ法により評価した。名目濃度 3 及び 30 µmol/L の本薬を、生理的温度に近い温度（36°C ± 1°C）において試験した。試験した最高濃度（30 µmol/L）において、本薬による hERG テール電流振幅の阻害は 10%未満であり、このパッチクランプ試験では hERG テール電流に対する有意な作用は認められなかった（A1711 試験）。2 件の hERG 試験の間で、結果は一致していた。

ピボタルな *in vivo* 試験では、予めテレメトリー記録装置を装着した雄の NHP（アジア系統のカニクイザル）に覚醒下で本薬を強制経口投与した後、心血管機能に対する影響を評価した（8362593 試験）。この系統における血漿曝露量が、反復投与毒性試験に使用されたモーリシャス系統のサルと同等であることを確認するために、補足的な薬物動態評価も行った。

外科的にテレメトリー装置を埋設した無処置雄カニクイザル 4 匹に対し、ラテン方格法に従って本薬を投与した。各動物に対し、溶媒（20% D-α-トコフェノールポリエチレングリコール 1000 コハク酸エステル［トコフェノールポリエチレングリコールコハク酸エステル＜TPGS＞の水溶液］）、又は 30、100、300 mg/kg の本薬を単回投与し、各投与の間に 4 日以上の休薬期間を設けた。左心室機能（左心室の圧及び収縮力）、心房収縮期圧及び拡張気圧、心電図（定量的パラメータ及び波形形態）を投与後 20 時間以上連続的にモニタリングし、これに基づいて評価を行った。データを投与前の記録と比較した。

この試験の心血管パートを実施する前に、薬物動態プロファイルを評価するために同じ動物に対して 30、100、300 mg/kg の本薬を単回投与した。各投与の間に 3 日間の休薬期間を設けた。各投与の当日に、投与前及び投与の 2、4、8、24 時間後に血液試料を採取し、各動物の血漿を調製した。バリデートされた分析法を使用して血漿中の本薬濃度を分析し、その結果については WinNonlin で薬物動態パラメータを求める際に使用した。薬物動態パラメータを表 3 に要約する。

表 3: 雄 NHP における心血管系試験での単回投与時のセベトラルスタットの薬物動態

Species	Dose (mg/kg)	Sex	Mean C_{max} (ng/mL)	Mean AUC_{0-24} (h•ng/mL)	T_{max} range (h)
NHP	30	Male	795	2,970	2-2
	100	Male	3,290	21,800	2-4
	300	Male	5,920	30,700	2-4

Source: Study 8362593

本薬は中程度の速さで吸収され、最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は投与後 2 時間から 4 時間であった。30～100 mg/kg 投与では、平均最高血漿中濃度（C_{max}）は用量に比例して増加したが、平均曲線下面積（AUC_{0-24}）は用量比を上回って増加した。平均 C_{max} 及び AUC_{0-24} は 100 mg/kg よりも 300 mg/kg で高かったが、高用量群では曝露量に顕著な動物間変動が認められた。投与前の血漿試料では、定量可能な量の本薬は検出されなかった。この試験では、アジア系統のカニクイザルでの薬

物動態パラメータは、一般毒性試験で使用されたマーシャル系統のカニクイザルにおいて試験 1 日に測定された値と概ね同等であった（モジュール 2.6.7.2 参照）。

本薬は、30、100、300 mg/kg の用量で経口投与したとき、心拍数、血圧、心電図パラメータ、QTc 延長、他の波形形態を含む心血管機能に影響を及ぼさなかった。無毒性量（NOAEL）は 300 mg/kg と判定され、同試験の薬物動態フェーズでの C_{max} は 5,920 ng/mL であった。

2.6.2.4.2 中枢神経系

中枢神経と末梢神経の主な機能をカバーする一連の行動及び生理的パラメータに対する本薬の影響について、ラットへの単回強制経口投与により評価した（8348817 試験）。

雄の Crl:WI(Han) ラット（6 匹/群）に対し、溶媒（20% TPGS 水溶液）、又は 100、350、1,000 mg/kg の用量で本薬を投与した。

本薬は 1,000 mg/kg 投与によっても、対照群と比較して、行動パラメータ、生理的パラメータ及び体温の変化を誘発しなかった。さらに、主試験では試験 7 日まで、いずれの動物にも一般状態への影響や死亡は認められなかった。

2.6.2.4.3 呼吸器系

本薬の呼吸パラメータへの影響を、GLP 適用試験において、無拘束ラットへの単回強制経口投与後に、全身気圧プレチスモグラフィーを用いて評価した（8348816 試験）。

雄の Crl:WI(Han) ラット（6 匹/群）に対し、溶媒（20% TPGS 水溶液）、又は本薬 100、350、1,000 mg/kg を単回経口投与した。本薬は 1,000 mg/kg 投与によっても、対照群と比較して、呼吸パラメータに影響を及ぼさなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用に関する試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

本薬は PKa 阻害作用を有する薬剤である。HAE 発作の治療を適応とした PKa 阻害薬は、現時点で日本では承認されていない。

本薬は、単離ヒト PKa の強力で、競合的な可逆的阻害薬であることが示されており、平均 Ki は 3.02 nmol/L である。本薬の酵素反応定数 k_{on} 及び k_{off} は、本薬が PKa の酵素活性部位に急速に結合して阻害する迅速結合阻害薬であることを示している（平均 k_{on} は>10 $\mu M^{-1}*sec^{-1}$）。

ヒト血漿を活性化し、一連の *in vitro* アッセイを実施した。アッセイでは、未治療の HAE 発作時の推定 PKa 濃度である 20～100 nmol/L を超える濃度（287 nmol/L：Duckworth 2022）の PKa を生成した（Schapira 1983、Cugno 1988、Kaufman 1991、Sexton 2017）。

健康被験者及び HAE 患者の血漿中の酵素活性に対する本薬による阻害を、蛍光発生ペプチド基質法を用いて比較した。健康被験者血漿中での本薬の平均 IC_{50} は 54.0 nmol/L であり、HAE 患者血漿中での平均 IC_{50} 47.5 nmol/L と同等であった。

この活性化全血漿アッセイ系では生成された PKa が高濃度であったことから、はるかに低濃度の 0.1 nmol/L の PKa 濃度で実施した単離酵素アッセイで得られた IC_{50} 値 6 nmol/L と比較して、本薬 IC_{50} の上昇を想定する際に有用な情報となった（Duckworth 2022）。

HAE 発作が認識された時点で本薬を投与するという臨床使用法を模倣するために、未希釈ヒト血漿の活性化後に本薬を添加したところ、迅速で用量依存的な酵素活性阻害が引き起こされた。本薬は 300 nmol/L 以上の濃度では、PKa の内因性阻害因子である C1-INH の治療濃度 3,000 nmol/L（1.2 IU）よりも速く阻害が開始され、これは本薬の k_{on} が 2 桁速いという所見と一致した（上記参照）。

本薬の PKa による KKS 構成成分の切断を阻害する能力を、内因性の全長 HK、FXII、FXIIa、PKa、血漿プレカリクレイン及び切断産物 cHK の量をモニタリングするイムノアッセイを使用して評価した。なお、BK は血漿中の半減期が 30 秒ときわめて短いため、BK の有用な代替指標である cHK を測定した（Marceau 2020）。

本薬は、健康被験者及び HAE 患者の活性化血漿中の PKa の酵素活性を阻害し、内因性基質 HK を PKa が媒介する切断を用量依存的に保護することにより、cHK を減少させた。HAE 患者の活性化血漿中では、本薬は 100 nmol/L 以上の濃度で PKa が媒介する HK の切断を有意に阻害した。

この同じアッセイで行われた FXII の切断、血漿プレカリクレインの切断、FXIIa の生成の定量的測定から、本薬は PKa 阻害を介して KKS の活性化を防ぎ、KKS 活性化後の抑制を用量依存的に行うことが明らかになった。これにより、フィードバック活性化機序が抑制され、それにより PKa 生成はさらに減少することが示された。

これらの結果を総合すると、本薬による PKa 阻害は、HK 切断の保護と、それに伴う cHK（HAE における浮腫誘発のメディエーターである BK の代替指標）の減少において重要な役割を果たすことが示唆される。さらに、本薬は FXIIa の量を減少させて KKS 活性化の増幅を抑えることで、フィードバック活性化機序を抑制すると考えられる。

臨床試験の一部で採取された血漿試料を用いた探索的薬理試験にも、同じ活性化血漿アッセイを使用した（モジュール 2.7.2 参照）。

本薬は、複数の非臨床動物種から単離された PKa を阻害することも確認されている。ラット（IC_{50} 69.8 nmol/L）及び NHP（IC_{50} 5.07 nmol/L）の薬理データは、これらの動物種を非臨床毒性試験に使用することが適切であることを示している。KVD900 はマウス PKa を nmol/L 単位で、イヌ PKa も µmol/L 単位で阻害するが、ウサギ及びブタの PKa 活性は最大 40,000 nmol/L の濃度でも阻害しなかった。

HAE 発作を再現する確立された動物モデルはないため、本薬の *in vivo* 活性はラット CPE モデルで評価した。このモデルは、キニンのほか、炎症誘発性サイトカイン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプタミン、プロスタグランジンなどのいくつかのメディエーターが関与する、一般的な炎症及び浮腫のモデルとして汎用されており（Morris 2003）、PKa 阻害薬である抗体ラナデルマブ（DX-2930）の *in vivo* 有効性を説明するためにも使用された（Kenniston 2014）。本モデルにおいて、足へのカラゲニン注射の前に本薬を経口投与することで、CPE が用量依存的に抑制された。300 mg/kg 投与により、全ての測定時点（カラゲニン注射後 2、4、6 時間）においてカラゲニン誘発反応が有意に抑制され（Student t 検定で $p<0.05$）、6 時間後の有効性は陽性対照であるインドメタシンと同等であった。

本薬のオフターゲット効果の可能性について、PKa と関連性のあるセリンプロテアーゼを含む広範囲の受容体及び酵素を対象として評価した。本薬は、PKa と密接に関連するプロテアーゼ酵素（凝

固因子 VIIa、Xa、XIa、XIIa プラスミン、トリプシン、組織カリクレイン 1、トロンビン）と比較して、ヒト PKa に対する選択性を有した（ヒト PKa に対する選択性は全ての比較において 1,500 倍を超えた）。また、選択性については、市販の安全性スクリーンを用いて広範囲の結合標的（酵素、受容体、イオンチャネル、トランスポーター）についても評価した。本薬は試験した全ての標的について 50%未満の阻害を示した。PKa に対する IC_{50} が 6 nmol/L であることを踏まえると、本薬は PKa に対して 1,656 倍以上の選択性を示した。

本薬の生命維持に重要な器官への潜在的な影響を調べるために、GLP 適用の *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験プログラムを実施した。心血管系の評価においては、本薬は *in vitro* で hERG テール電流に対して有意な影響を及ぼさず、NHP の *in vivo* テレメトリー記録試験では本薬の単回経口投与は血圧、心拍数、収縮力、QTc 延長に対し影響を及ぼさなかった。*In vivo* におけるラットの CNS 及び呼吸器系に対しても本薬に関連する影響は認められなかった。

以上より、本薬について実施した薬理試験及び安全性薬理試験の結果は、予定されている効能・効果での本薬の使用が有用かつ安全であることを裏付けている。

2.6.3 薬理試験の概要表

KalVista Pharmaceuticals

目次

2.6.3 薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
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 8

2.6.3 薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Description	Test System/ Strain	Compound Administered	Method of Administration	GLP Compliance	Test Facility	Study Number	Location in eCTD (Module)
Primary pharmacodynamics							
Affinity (Ki) for the human plasma kallikrein enzyme	Human, plasma-purified enzyme	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	045_KV123900_PH_2016	4.2.1.1
Kinetics (association/ dissociation constants) at the human plasma kallikrein enzyme	Human, plasma-purified enzyme	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	088_KV123900_PH_2018 089_KV123900_PH_2018	4.2.1.1 4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in a diluted human activated-plasma assay	Human, EA activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	059_KV123900_PH_2016	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in a diluted or undiluted human activated-plasma assay	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	119_KV123900_PH_2019	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in undiluted activated plasma from patients with HAE and healthy control subjects	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	192_KVD900_PH_2021	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in an undiluted human activated-plasma assay – sebetralstat added after plasma activation	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	146_KV123900_PH_2020	4.2.1.1
Inhibition of endogenous HK cleavage in undiluted human activated-plasma assay	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	082_KVMULTI_PH_2017	4.2.1.1

Description	Test System/ Strain	Compound Administered	Method of Administration	GLP Compliance	Test Facility	Study Number	Location in eCTD (Module)
Inhibition of endogenous HK cleavage in undiluted human activated-plasma assay	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	084_KV123900_PH_2017	4.2.1.1
HK cleavage protection in undiluted activated plasma from healthy subjects	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	178_KVD900_PH_2020	4.2.1.1
Inhibition of FXII, PK, HK cleavage and, FXIIa and cHK generation, in undiluted activated plasma from healthy subjects	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	Oral (API-PIC)	No	KalVista Pharmaceuticals	115_KV123900_PH_2018 123_KV123900_PH_2019	5.3.3.1 4.2.1.1
HK cleavage protection in undiluted activated plasma from patients with HAE compared with healthy control plasma	Human, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	091_KV123900_PH_2018	4.2.1.1
Affinity (Ki) for the mouse plasma kallikrein enzyme	Mouse, recombinant enzyme	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	046_KV123900_PH_2016	4.2.1.1
Affinity (Ki) for the rat plasma kallikrein enzyme	Rat, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	047_KV123900_PH_2016	4.2.1.1
Inhibition of recombinant enzyme activity or enzyme activity in nonclinical species diluted activated plasma	Rabbit/mouse, recombinant enzyme. Rat/dog/pig/NHP, DXS activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	058_KV123900_PH_2016	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in a diluted rat activated-plasma assay	Rat, Sprague Dawley, EA activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	060_KV123900_PH_2016	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in a diluted rat activated-plasma assay	Rat, Sprague Dawley, EA activated plasma	Sebetralstat	Oral gavage	No	KalVista Pharmaceuticals	078_KV123900_PH_2017	4.2.1.1

Description	Test System/ Strain	Compound Administered	Method of Administration	GLP Compliance	Test Facility	Study Number	Location in eCTD (Module)
Inhibition of enzyme activity in a diluted NHP activated-plasma assay	NHP, cynomolgus monkey, EA activated plasma	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	080_KV123900_PH_2017	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in a diluted NHP activated-plasma assay	NHP, cynomolgus monkey, EA activated plasma	Sebetralstat	IV or oral gavage	No	KalVista Pharmaceuticals	081_KV123900_PH_2017	4.2.1.1
Inhibition of enzyme activity in a diluted NHP activated-plasma assay	NHP, cynomolgus monkey, EA activated plasma	Sebetralstat	Oral (API-PIC)	No	KalVista Pharmaceuticals	083_KV123900_PH_2017	4.2.1.1
Inhibition of carrageenan-induced paw oedema in rat	Rat, Sprague Dawley	Sebetralstat	Oral gavage	No	[redacted]	CPE-KPL-2	4.2.1.1
Secondary pharmacodynamics							
Off-target serine protease inhibition screening	Human	Sebetralstat	*In vitro*	No	KalVista Pharmaceuticals	057_KV123900_PH_2016	4.2.1.2
Off-target receptor, enzyme, and transporter interaction screening at a single 10 µM concentration	Rat, rabbit, guinea pig, pig, bovine, human	Sebetralstat	*In vitro*	No	[redacted]	AB31416	4.2.1.2
Safety pharmacology pharmacodynamics							
Effect on hERG tail current recorded from stably transfected Chinese hamster ovary cells	Human recombinant hERG channel	Sebetralstat	*In vitro*	No	[redacted]	A1498	4.2.1.3
Effect on hERG tail current recorded from stably transfected HEK293 cells	Human recombinant hERG channel	Sebetralstat	*In vitro*	Yes	[redacted]	A1711	4.2.1.3
Effects on cardiovascular system in the conscious telemetered NHP	NHP, cynomolgus monkey	Sebetralstat in 20% TPGS	Oral gavage	Yes	[redacted]	8362593	4.2.1.3

Description	Test System/ Strain	Compound Administered	Method of Administration	GLP Compliance	Test Facility	Study Number	Location in eCTD (Module)
Effects on general activity, behavior and body temperature (CNS/Irwin study) in the rat	Rat, Han Wistar	Sebetralstat in 20% TPGS	Oral gavage	Yes	[redacted]	8348817	4.2.1.3
Effects on respiratory parameters in the rat	Rat, Han Wistar	Sebetralstat in 20% TPGS	Oral gavage	Yes	[redacted]	8348816	4.2.1.3

API-PIC: active pharmaceutical ingredient powder-in-capsule; cHK: cleaved high molecular weight kininogen; HK: high molecular weight kininogen; DXS: dextran sulphate; EA: ellagic acid; FXII: factor XII; HAE: hereditary angioedema; PK: plasma prekallikrein

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

モジュール 2.6.2 参照。

2.6.3.3 副次的薬理試験

モジュール 2.6.2 参照。

2.6.3.4 安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Compound Administered	Method of Administration	Dose	Sex and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number	Location in eCTD (Module)
Cardiovascular system									
KVD900 effects on hERG tail current recorded from stably transfected Chinese hamster ovary cells	Human recombinant hERG channel	KVD900 in DMSO	*In vitro*	1.1, 3.3, 11 and 33 µmol/L	NA	最高濃度（33 µmol/L）の KVD900 による hERG テール電流遮断は 35%未満であった。したがって、IC_{50} は >33 µmol/L である。	No	A1498	4.2.1.3
KVD900 effect on hERG tail current recorded from stably transfected HEK293 cells	Human recombinant hERG channel	KVD900 in DMSO	*In vitro*	3.0 and 30 µmol/L	NA	最高濃度（30 µmol/L）の KVD900 による hERG テール電流遮断は 30%未満であった。したがって、IC_{50} は >30 µmol/L である。	Yes	A1711	4.2.1.3
KVD900 effects on cardiovascular system in the conscious telemetered NHP	NHP, cynomolgus monkey	KVD900 in 20% TPGS	Oral gavage	30, 100 or 300 mg/kg	Male 4/group	KVD900 は心電図を含む心血管機能に対し作用を及ぼさなかった。	Yes	8362593	4.2.1.3
Central nervous system									
KVD900 effects on general activity, behavior and body temperature (CNS/Irwin study) in the rat	Rat, Han Wistar	KVD900 in 20% TPGS	Oral gavage	100, 350 or 1,000 mg/kg	Male 6/group	対照と比較した場合、KVD900 は行動的変化、生理的変化、又は体温の変化を誘発しなかった。	Yes	8348817	4.2.1.3
Respiratory system									
KVD900 effects on respiratory parameters in the rat	Rat, Han Wistar	KVD900 in 20% TPGS	Oral gavage	100, 350 or 1,000 mg/kg	Male 6/group	対照と比較した場合、KVD900 は呼吸パラメータに対し生物学的に重要な作用を引き起こさなかった。	Yes	8348816	4.2.1.3

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用

モジュール 2.6.2 参照。