

S7B : *In vitro*試験に関するベストプラクティスの 考慮事項及び催不整脈モデルの原則について

吉永 貴志

日本製薬工業協会

JPMA Topic Leader

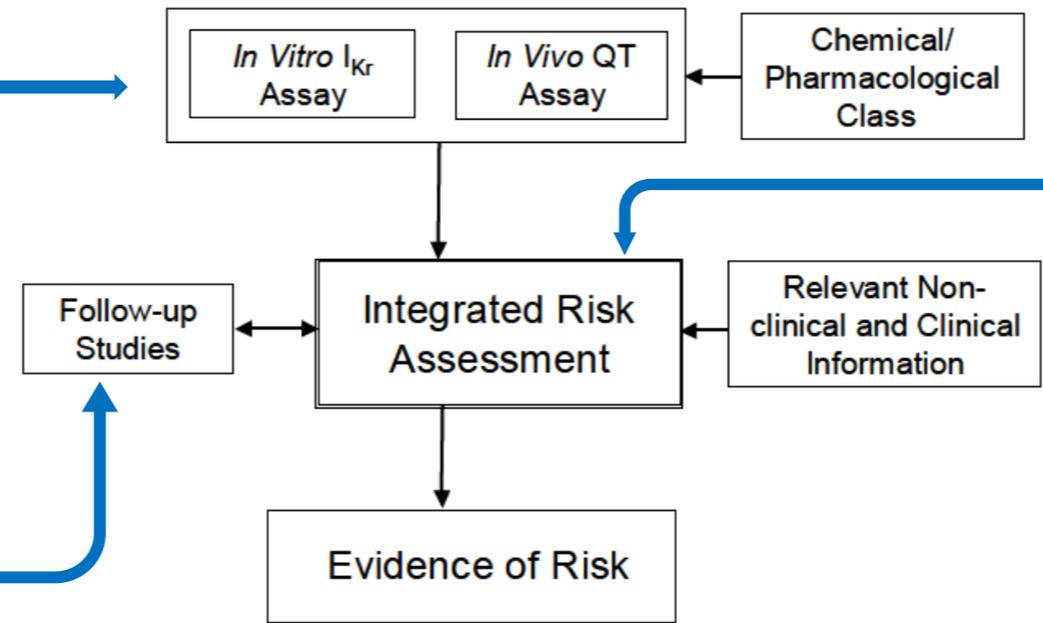


現S7BガイドラインとQ&As

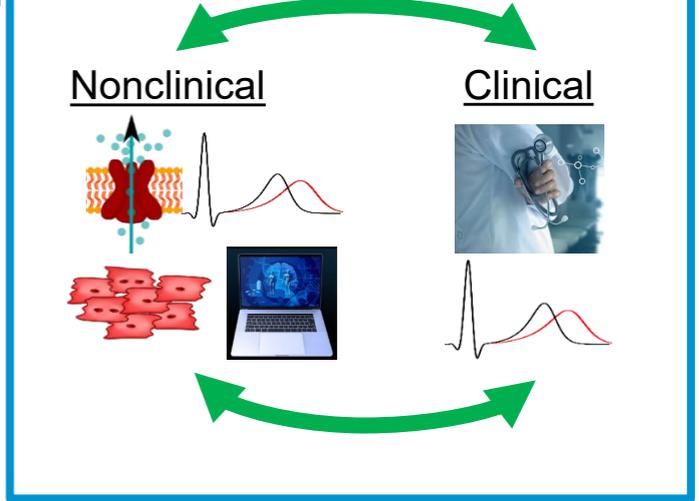
ベストプラクティスの考慮事項
イオンチャネルアッセイ (Q&A 2.1)
in vivo QTアッセイ (Q&As 3.1-3.5)



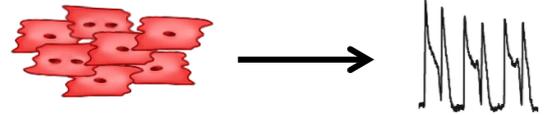
S7Bガイドライン Non-clinical Testing Strategy



統合的リスク評価 (Q&As 1.1-1.2)



ベストプラクティスの考慮事項
ヒト心筋細胞アッセイ (Q&As 2.2-2.5)



Nav1.5, Cav1.2 催不整脈モデルの原則
(Q&A 2.1) (Q&As 4.1-4.2)



- ベストプラクティスは、医薬品のスクリーニングに影響を与えることを意図したものではない
- 考慮事項の一部は、E14 Q&A5.1及び6.1に基づき、臨床におけるQT延長リスク評価に非臨床データを用いる場合のみに適用される



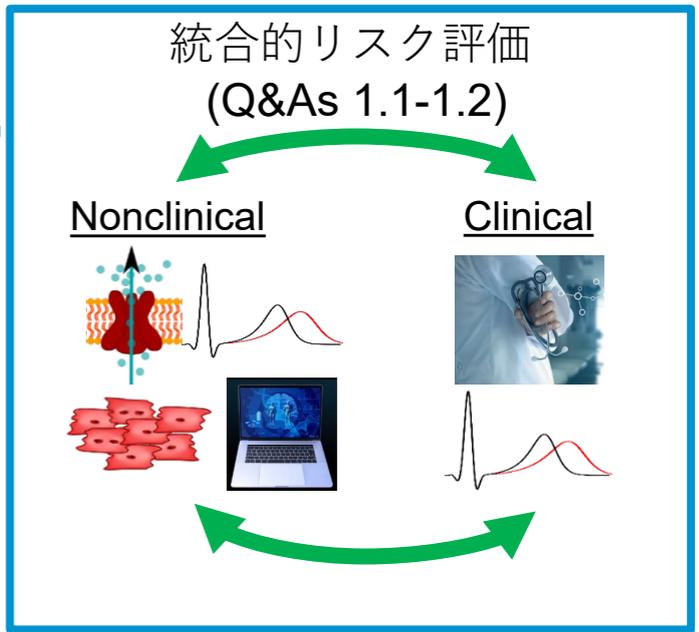
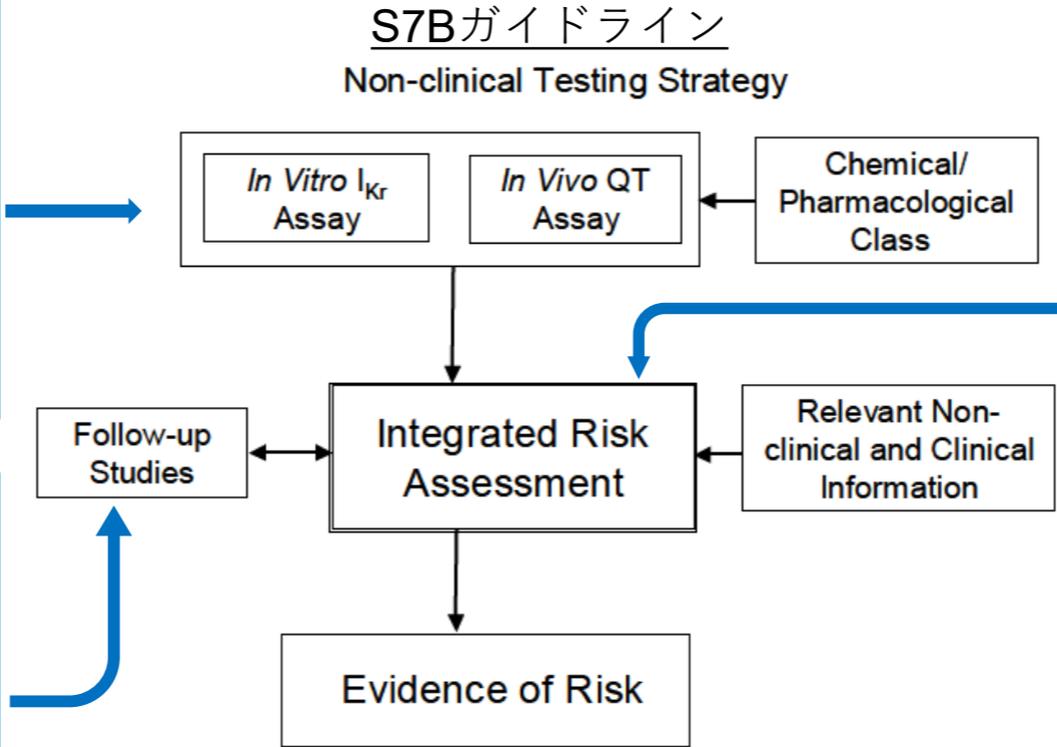
現S7BガイドラインとQ&As

ベストプラクティスの考慮事項
イオンチャネルアッセイ (Q&A 2.1)
in vivo QTアッセイ (Q&As 3.1-3.5)

ベストプラクティスの考慮事項
ヒト心筋細胞アッセイ (Q&As 2.2-2.5)

Nav1.5, Cav1.2 催不整脈モデルの原則 (Q&A 2.1) (Q&As 4.1-4.2)

バリデートされたモデルによるリスク予測



- ベストプラクティスは、医薬品のスクリーニングに影響を与えることを意図したものではない
- 考慮事項の一部は、E14 Q&A5.1及び6.1に基づき、臨床におけるQT延長リスク評価に非臨床データを用いる場合のみに適用される

報告内容

S7B： *In vitro*試験に関するベストプラクティスの考慮事項について

- Q2.1 パッチクランプ法のベストプラクティスにおける考慮すべき点
- Q2.2 ヒト心筋細胞再分極試験における評価項目
- Q2.3 ヒト心筋細胞再分極測定法の試験系に関する留意点
- Q2.4 ヒト心筋細胞再分極試験計画の立案及び実施する場合の重要な留意事項
- Q2.5 ヒト心筋細胞再分極測定法の感度

S7B： 催不整脈モデルの原則について

- Q4.1 催不整脈リスク予測モデルを使用可能性について評価するための一般原則
- Q4.2 規制当局への提出資料としてモデルのように使用及びその際の制限

報告内容

S7B： *In vitro*試験に関するベストプラクティスの考慮事項について

- Q2.1 パッチクランプ法のベストプラクティスにおける考慮すべき点
- Q2.2 ヒト心筋細胞再分極試験における評価項目
- Q2.3 ヒト心筋細胞再分極測定法の試験系に関する留意点
- Q2.4 ヒト心筋細胞再分極試験計画の立案及び実施する場合の重要な留意事項
- Q2.5 ヒト心筋細胞再分極測定法の感度

S7B： 催不整脈モデルの原則について

- Q4.1 催不整脈リスク予測モデルを使用可能性について評価するための一般原則
- Q4.2 規制当局への提出資料としてモデルのように使用及びその際の制限

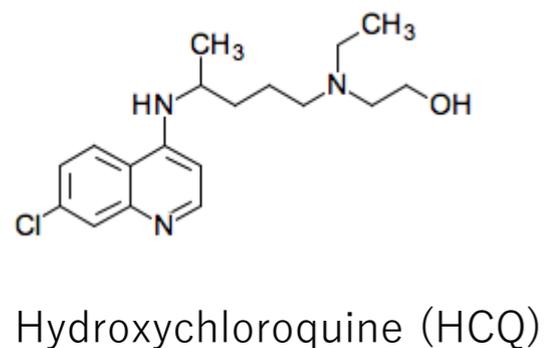
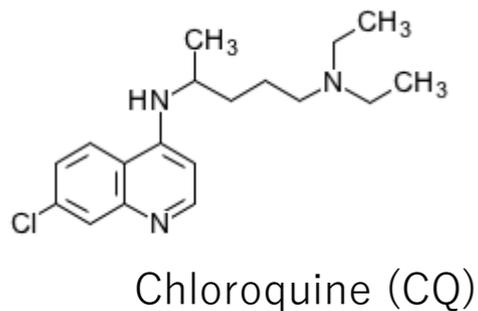
*In vitro*試験に関するベストプラクティス

Q2.1：パッチクランプ法により、過剰発現細胞株を用いた心臓のイオンチャンネル電流に影響する薬剤の作用の強さを評価する場合、「ベストプラクティス」としてどのような点を考慮する必要がありますか

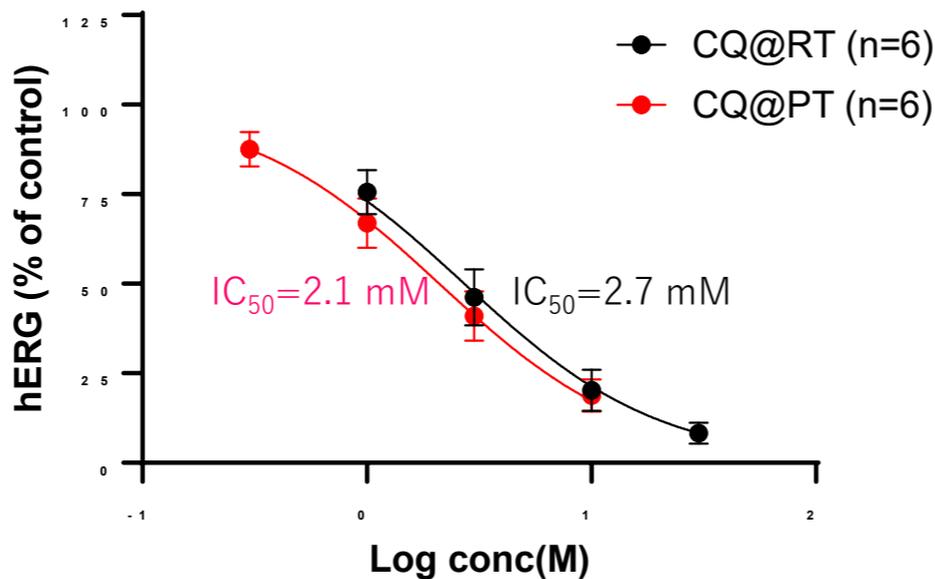
1. 測定温度
2. 電位プロトコール
3. 記録の質
4. 主要評価項目
5. データの要約
6. 濃度の検証
7. 陽性対照及び陰性対照

1. 測定温度

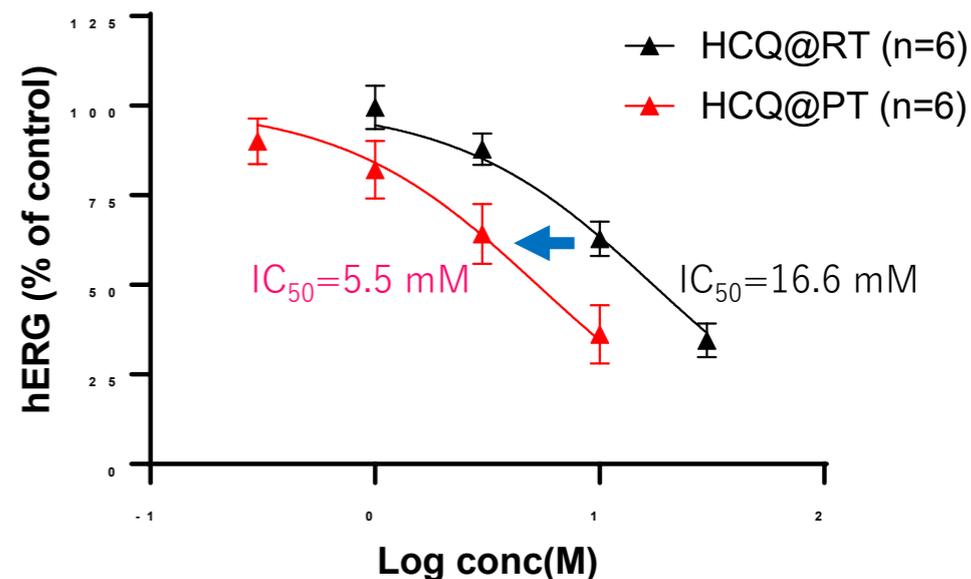
- 生理的温度に近い温度 (35–37 °C) で実施
- 一部の薬剤は温度感受性を示すものがあり、この温度依存的な作用を予測する方法はないため



hERG inhibition at RT vs. PT

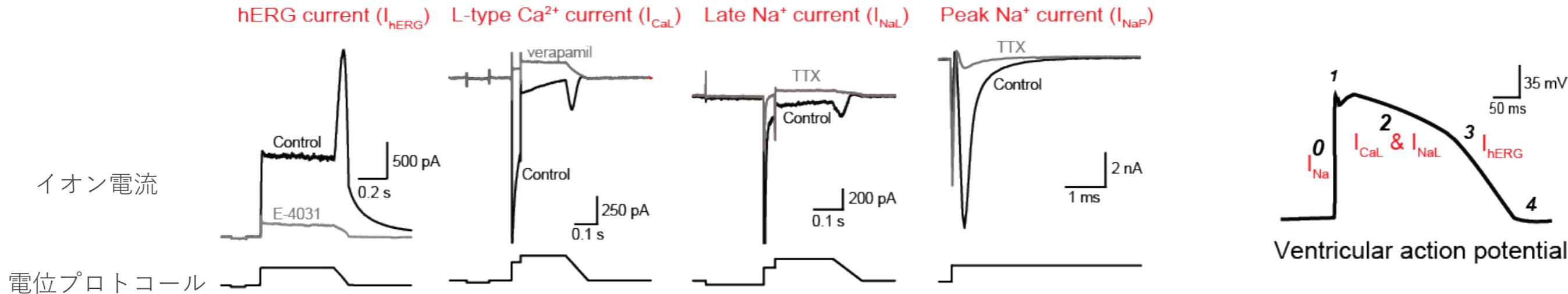


hERG inhibition at RT vs. PT



2. 電位プロトコール

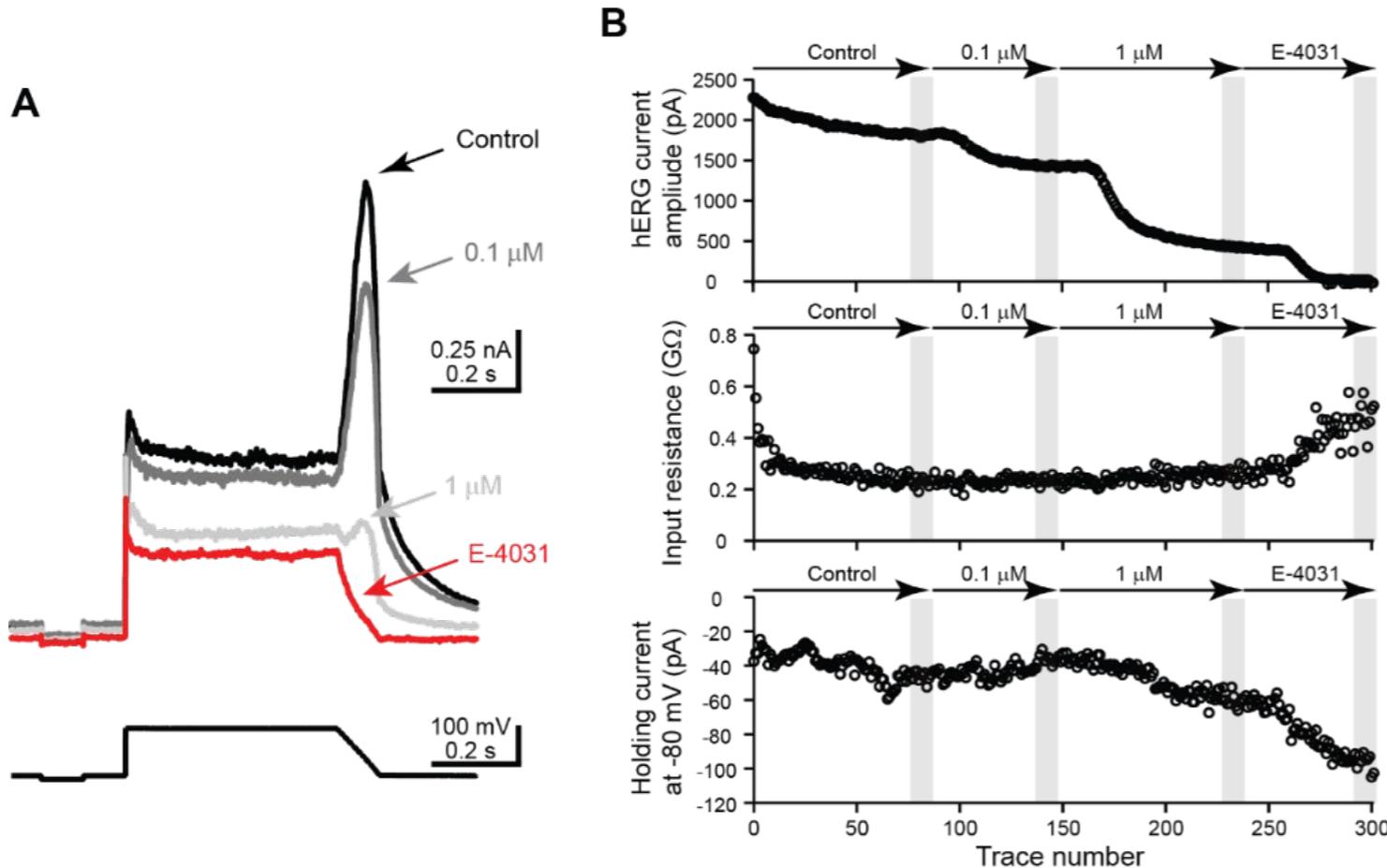
- 心室活動電位の適切な要素が反映されたもので、生理的に関連する心拍数において被験薬の作用を見逃す可能性を最小限度に留めるのに十分な頻度で繰り返し実施
- hERGは0.2~1Hz、Cav1.2及びNav1.5は0.2Hzの刺激頻度が推奨



(トレーニングマテリアル No.39)

3. 記録の質

- 薬物の作用が定常状態になるまで経時的推移をモニタリング
- シール抵抗が十分に高いことが必要

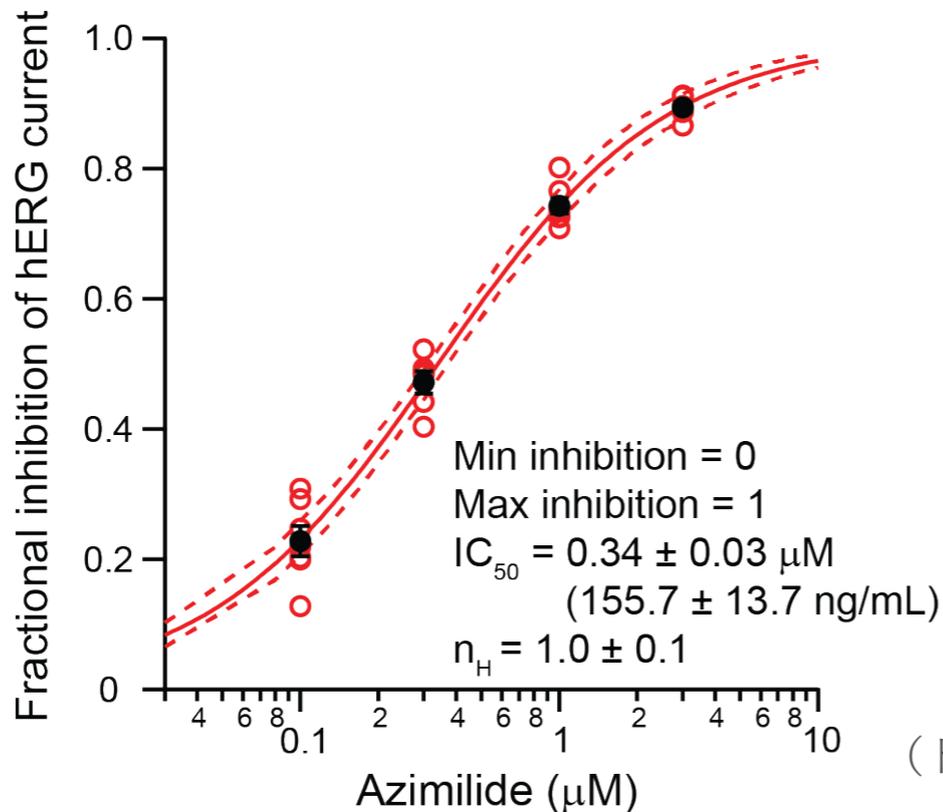


- 化合物の作用が安定している
- 抵抗値が十分に大きい
- リーク電流が小さい

(トレーニングマテリアル No.40)

4. 主要評価項目

- 個々のデータポイントと平均 \pm SEMを使用し、濃度阻害グラフを作成
- 個々のデータをHill方程式で近似
- IC_{50} 値 (μM 及び $\mu g/mL$ の両単位) とHill係数を提示



- 50%電流阻害を達成できなかった場合には、評価した最高濃度の妥当性ととも、同濃度と治療におけるフリー体濃度及びトータル濃度との関係を示す
- 必要に応じて検査対象の電流を分別する場合には、高濃度の選択的阻害薬の投与後にバックグラウンド電流を差し引く
- 選択的阻害薬によって検査対象の電流が阻害されなかった場合には、リーク電流を算出し、電流トレスから差し引く

(トレーニングマテリアル No.42)



5. データの要約

- IC₅₀値とHill係数とともに細胞ごとの被験物質の各濃度における阻害データを提示

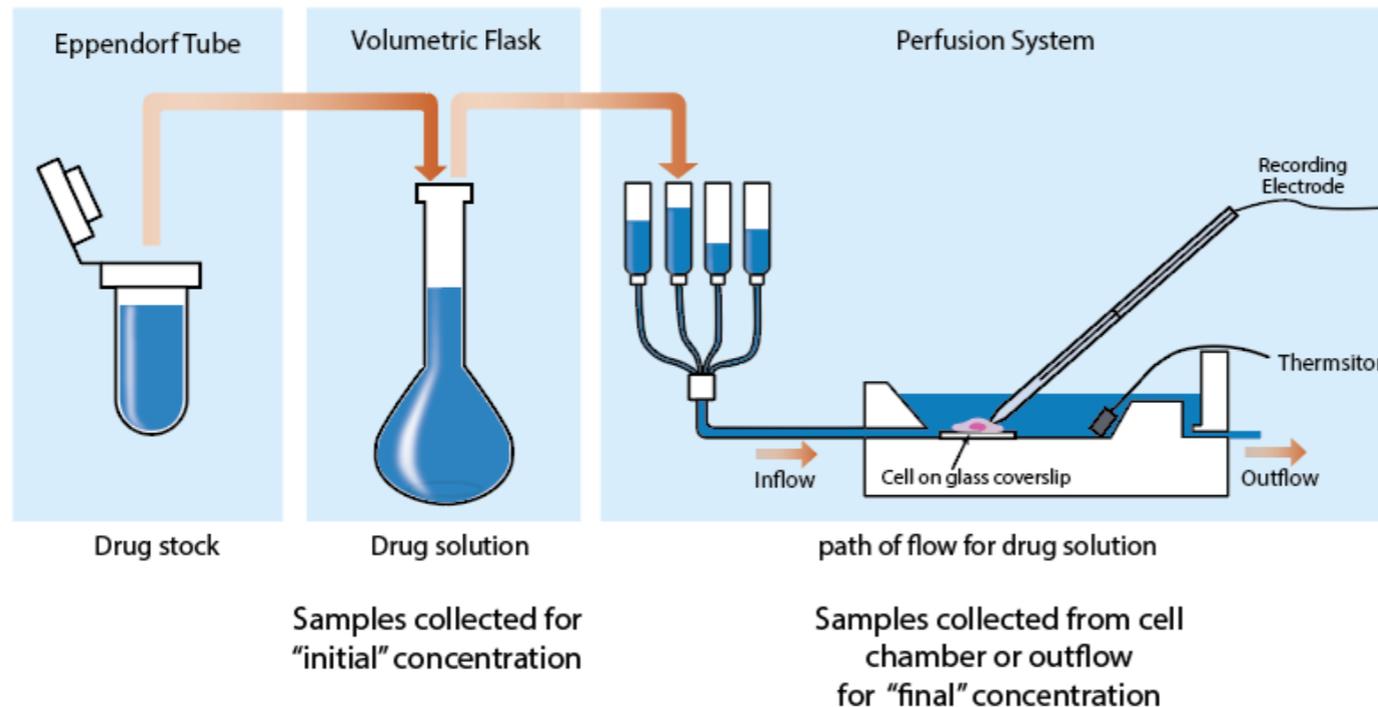
Nominal [Azimilide] (μM)	Fractional inhibition													n	Mean	SD	sem
	Cell 1	Cell 2	Cell 3	Cell 4	Cell 5	Cell 6	Cell 7	Cell 8	Cell 9	Cell 10	Cell 11	Cell 12	Cell 13				
0.1	0.25	0.13	0.20	0.20				0.31	0.29	0.22				7	0.23	0.06	0.02
0.3					0.49	0.48	0.44				0.52	0.49	0.40	6	0.47	0.04	0.02
1	0.73	0.71	0.73	0.73				0.80	0.74	0.77				7	0.74	0.03	0.01
3					0.89	0.90	0.89				0.91	0.91	0.87	6	0.89	0.02	0.01

(トレーニングマテリアル No.47)

- 記録の質を担保するため、試験報告書には、被験物質添加後の各細胞の電流値、インプットレジスタンス、保持電流並びに薬剤の平衡の経時推移プロットを記載
- ベースライン条件における電流のランアップ又はランダウン等の時間依存的な変化を補正した場合には、用いた補正法を説明することが必要

6. 濃度の検証

- 細胞チャンバーから採取した溶液をバリデートされた分析法を用いて測定
- 濃度については理論値及び測定値の両方を提示
- 測定値を使用して薬物濃度－反応関係を考慮し、 IC_{50} 値及びHill係数を算出



7. 陽性対照及び陰性対照

- 陽性対照薬の試験は基準薬データとの一貫性及び再現性を示すために、十分な回数
の試験及び20～80%のブロックを達成する2つ以上の濃度を用いて行う
- 陽性対照のデータが予測値の範囲外となった場合には、当該試験成績の正確な結論
は得られないため、E14ガイドラインQ&A5.1及び6.1に記載した目的の裏付けとし
て用いることは推奨されない
- 陽性対照薬については、統合的リスク評価で用いる安全域の閾値算出のために、臨
床において10msecのQT延長作用を示す血中濃度及びタンパク結合率の情報が必要

Table 1-B. Parent Training Materials Examples for ICH E14 Q&A 5.1

Table 1-B. In vitro hERG Assay Evaluation		
Analyte: Parent; Protocol 001		
Best Practice Element	Deviation / Issue	Impact of Deviation / Issue
Temperature (35 -- 37°C)	None	
Voltage Protocol ¹	None	
Recording Quality ²	None	
IC ₅₀ Calculation ³	None	
Concentration Verification ⁴	None	
Positive Control ⁵	None	
Negative Control ⁶	None	
Good Laboratory Practice	None	

Deviation/Issueが全てNoneであることは、ベストプラクティスの要件を満たしていることを意味している

Table 1-B. Metabolite Training Materials Examples for ICH E14 Q&A 5.1

Analyte: Metabolite 1; Protocol 001		
Best Practice Element	Deviation / Issue	Impact of Deviation / Issue
Temperature (35 -- 37°C)	None	
Voltage Protocol ¹	None	
Recording Quality ²	None	
IC ₅₀ Calculation ³	<ul style="list-style-type: none"> Concentrations higher than 1000 µM could not be studied due to solubility issues. Highest concentration was associated with less than 50% block. 	<ul style="list-style-type: none"> Not possible to estimate IC₅₀ due to limited inhibition at highest concentration (5%). Not expected to impact interpretation due to high multiple over high clinical concentration (3369x) and minimal block observed (5%).
Concentration Verification ⁴	Concentration verification was not performed.	<ul style="list-style-type: none"> If there is significant drug loss, IC₅₀ could be over-estimated. At 99% drug loss, the highest concentration 1000 µM would correspond to 34x high clinical instead of 3369x. Since no block was observed at this concentration (5%) it is not expected that the lack of concentration verification could result in a false negative.
Positive Control ⁵	None	
Negative Control ⁶	None	
Good Laboratory Practice	None	

Table 1-C. Training Materials Examples for ICH E14 Q&A 5.1

Table 1-C. In vitro Assay Results						
		高い臨床曝露量	Investigational Drug	化合物の安全域は低い方を採用		
	In Vitro Assay ¹	High Clinical C _{max,ss} (ng/mL) ²	Protein Binding, % ³	Mol Wt (g/mole)	hERG IC ₅₀ (μM) / (μg/mL) ⁴	Safety Margin ⁵
Parent	Protocol-001	291 (265, 319)	1	300	100 μM / 30 μg/mL	104 (95, 114)
Positive control: moxifloxacin					85 μM	
Metabolite	Protocol-001	97 (89, 106)	2	350	5% block at 1000 μM / 350 μg/mL	>3682 (3369, 4013)
Positive control: ondansetron					1.6 μM	
hERG Safety Margin Threshold Defined by Reference Drugs ¹²						
Reference Drugs ⁶	In Vitro Assay	Critical Concentration (ng/mL) ⁷	Protein Binding, %	Mol Wt (g/mole)	IC ₅₀ Distribution (μM) ⁸	Safety Margin ⁹
Moxifloxacin	Protocol-001	1866 (1591, 2188)	40 (37, 43)	401	62 (38, 104); N = 10	23x (13, 39)
Ondansetron		249 (152, 412)	73 (71, 76)	293	1.4 (0.8, 2.6); N = 4	10x (4, 27)
Dofetilide		0.37 (0.24, 0.55)	64 (62, 66)	442	0.01 (<0.01, 0.02); N = 4	44x (16, 117)
					Pooled Safety Margin for Reference Drugs ¹⁰	22x (1, 51)
					Threshold ¹¹	>51x

- ベストプラクティスで実施した試験結果のみ統合的リスク評価に用いることが可能
- 必要な場合には代謝物も評価
- 化合物の安全域と陽性対照薬の安全域の閾値を比較

ER解析でQTcが10msec延長する濃度

Q2.1 まとめ

- ヒト初回投与 (FIH) 試験をサポートする非臨床試験データを取得するために、S7Bガイドラインに従うべきである
- S7B Q&A 2.1 は、コアとなる *in vitro* hERG assay を含むパッチクランプ試験に関するベストプラクティスの推奨事項を示している
 - データの再現性を高め、臨床所見の適切な解釈を可能にする
 - E14 Q&A 5.1及び6.1において使用するための強固なhERG安全域を提供する
- 統合的リスク評価を想定する場合には、臨床開発段階での試験の重複を防ぐためにも、FIH試験前の試験としてベストプラクティスの適用が奨励される

ヒト心筋細胞再分極測定の本ベストプラクティス

Q2.2： *In vitro*ヒト心筋細胞再分極フォローアップ試験において、有益な情報が得られる評価項目について説明してください

Q2.3： *In vitro*ヒト心筋細胞再分極測定法の試験系に関して、どのような点に留意する必要がありますか

Q2.4： *In vitro*心筋細胞再分極試験計画を立案し、実施する場合において重要な留意事項を説明してください

Q2.5： *In vitro*心筋細胞再分極測定法の感度をどのように規定しますか

Q2.2：ベストプラクティスの考慮事項

- ヒトiPS細胞由来心筋細胞及び急性単離したヒト成人由来の心室筋細胞を用いて測定された細胞内電位又はフィールド電位の波形にみられる薬剤性の変化は、複数のイオン電流、イオン交換機構及びイオン担体に対する複合的な作用として示される
- 心室性不整脈のマーカーとして認められている細胞再分極の変化として再分極遅延及び異常などを測定対象とする必要がある
- 薬剤が心筋細胞カルシウムハンドリングに及ぼす影響は、電気生理学的活性に影響を及ぼす可能性がある

Q2.3：試験系に関する留意点

生物学的標本：

- 使用した細胞の由来及びヒトドナーの背景
- hiPSC-CMを含む様々な標本の作製に使用した方法
- ヒト初代心筋細胞標本の場合、組織の由来並びに採取、分離及び濃縮の手順
- 許容可能な標本の形態的及び機能的選択基準、並びに電気生理学的特性を明確に規定

技術プラットフォーム：

- 使用した技術（膜電位の記録、フィールド電位、ビジュアル若しくはインピーダンスに基づく動性アプローチ、又はカルシウム感受性色素を用いた細胞外記録法）
- 波形のマーキング及び解釈に使用した解析パッケージを説明し、併せて代表的な記録
- 試験に使用したプレート又はチャンバー

Q2.4：計画の立案及び実行時の留意事項

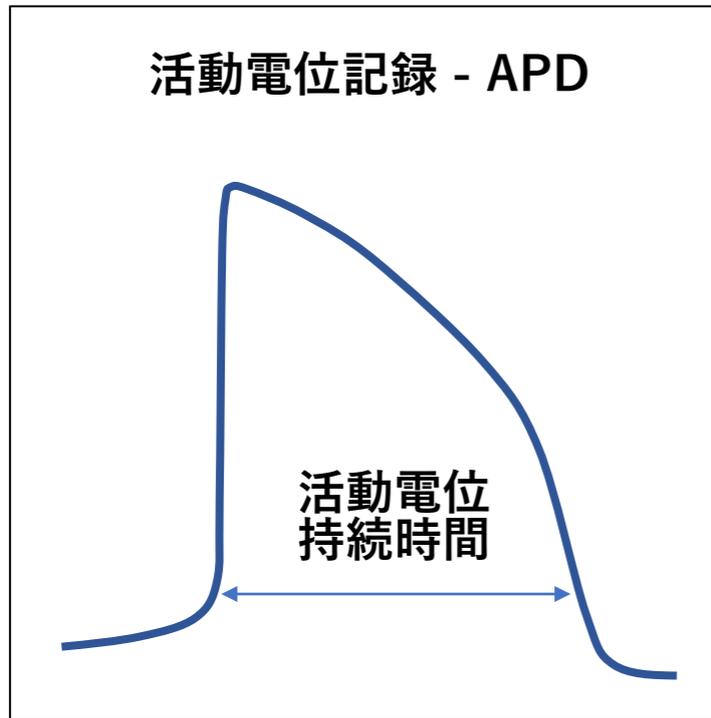
- 薬剤の非存在下及び存在下における自発的拍動数を、被験物質で誘発される拍動数変化の程度とともに明示しなければならない、補正した場合には補正式を示す
- ペーシングされた標本については、ペーシングプロトコール（パターン及び持続時間）を記載する
- 試験成績の質を確保するため、試験報告書には主要評価項目の経時推移プロット並びに標本及びシグナル記録の安定性の推測に使用可能なその他のパラメータを記載する
- 濃度依存的な再分極に対する作用は、被験物質で処理した標本と媒体で処理した標本との間で、媒体のデータで補正した及び／又はベースラインの差分比較を行う
- 被験物質曝露の特性を明らかにすることが重要である
 - 濃度は、総被験物質濃度及び遊離被験物質濃度（使用した培養液中における血漿タンパク質結合特性が判明している場合）として示すべき

Q2.5：測定法の感度

- 心筋イオンチャネルを薬理的に阻害することが明らかな陽性対照を用いて検証し、「目的に適合する」ことを確認すべき
- 一般によく知られている特定のイオン電流を阻害する薬剤を用いて薬物濃度－反応曲線を作成することで可能であり、マルチチャネル阻害薬に対する統合的な電気生理学的反応を明確にできる
 - hERG：特定の阻害薬（E-4031又はドフェチリド等）
 - ICa：特定のICaL遮断薬（ニフェジピン又はニソルジピン等）
 - INaL：INaL遮断薬（メキシレチン又はリドカイン等）

ヒト心筋細胞再分極試験のベストプラクティス

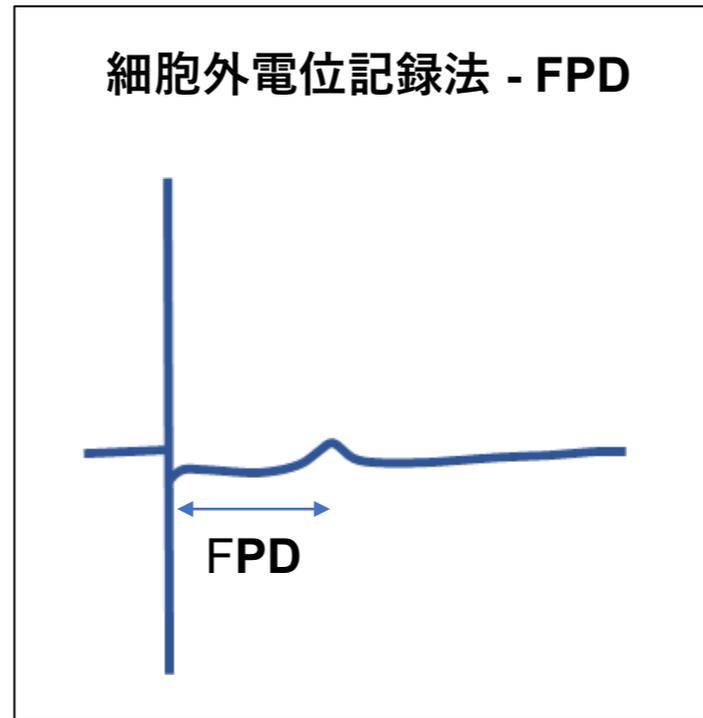
- 電気生理学的アプローチ



Action Potential Duration (APD)

膜電位

細胞内記録または膜電位感受性色素



Field Potential Duration (FPD)

多点電極アレイ

Multi-electrode array (MEA) 法

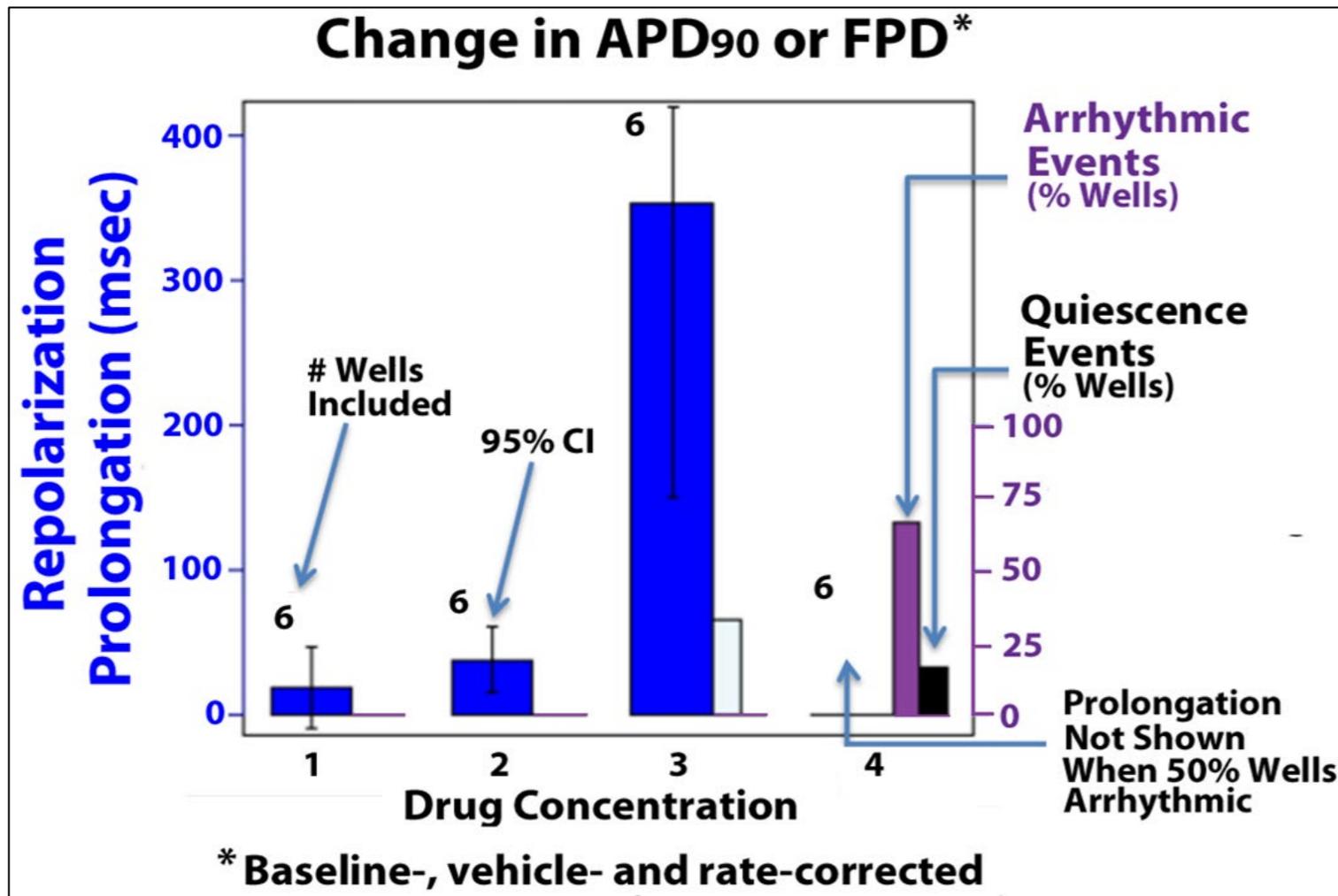
- 電気活動の記録は細胞の再分極を反映している
- カルシウムトランジェントと収縮性の測定は、電気的効果の下流での再分極変化の代理証拠を提供する可能性がある

ヒト心筋細胞再分極試験のベストプラクティス

- 実験方法の特徴

実験方法	主要測定項目	詳細
微小電極/パッチ電極 または 膜電位感受性色素	活動電位持続時間 (APD)	主要評価項目 a) APD ₉₀ (90%再分極時間) b) 再分極障害の出現 (早期脱分極/EAD) 副次評価項目 再分極時間 (APD _{30, 50, 70}) の時間推移、
多点電極アレイ (MEA)	細胞外電位時間 (FPD)	典型的なFPD (脱分極時のピークから再分極のピーク) 単一電極または複数電極からの記録 早期脱分極様の異常波形の出現

ヒト心筋細胞再分極試験のベストプラクティス



- 縦軸左：濃度の増加に伴う遅延再分極効果
- 縦軸右：濃度の増加に伴う再分極効果の変化
- データはtableとグラフで提供されることが望ましい

Q2.2-2.5 まとめ

- *In vitro*ヒト心筋細胞アッセイを統合的リスク評価に用いるためには、推奨される条件を満たしたベストプラクティスに基づいて実施する必要がある
- *In vitro*ヒト心筋細胞アッセイは、非臨床試験でダブルネガティブでない場合のフォローアップ試験として、マルチイオンチャネル阻害などの作用機序の解釈に有用である

報告内容

S7B：In vitro試験に関するベストプラクティスの考慮事項について

- Q2.1 パッチクランプ法のベストプラクティスにおける考慮すべき点
- Q2.2 ヒト心筋細胞再分極試験における評価項目
- Q2.3 ヒト心筋細胞再分極測定法の試験系に関する留意点
- Q2.4 ヒト心筋細胞再分極試験計画の立案及び実施する場合の重要な留意事項
- Q2.5 ヒト心筋細胞再分極測定法の感度

S7B：催不整脈モデルの原則について

- Q4.1 催不整脈リスク予測モデルを使用可能性について評価するための一般原則
- Q4.2 規制当局への提出資料としてモデルのように使用及びその際の制限

催不整脈モデルの原則

- Q 4.1：S7Bガイドライン（3.1.4項）には、（不整脈モデルを用いて）QT間隔を延長する医薬品の催不整脈のリスクを直接的に評価しようとすることは当然の試みであり、そのためのモデルを開発し、ヒトでのリスク予測における有用性を検証することを強く勧めるという記載があります。統合的リスク評価の進め方の一環として催不整脈リスク予測モデルが使用可能か評価するにあたっての一般原則を説明してください
- Q4.2：治験依頼者は、規制当局への提出資料としてモデルをどのように使用できますか。また、使用に際してはどのような制限がありますか

催不整脈モデルの定義

- 催不整脈モデル
 - 催不整脈の可能性を予測できる *in silico*、*in vitro*、*ex vivo*、*in vivo*モデル
 - モデルを統合リスク評価の一部として使用できるかどうかを評価するために、6つの原則に従う必要がある
- モデルの入力情報と出力情報
 - 入力情報: モデル予測のための非臨床データ
 - *In silico* – イオンチャネルデータ
 - *In vitro* – イオンチャネルデータ、薬物誘発性再分極変化/不整脈
 - *Ex vivo/in vivo* – 薬物誘発性心電図パラメータの変化/不整脈
 - 出力情報: 催不整脈指標 (qNET、TdPスコアなど)

一般原則の一貫性と完全性

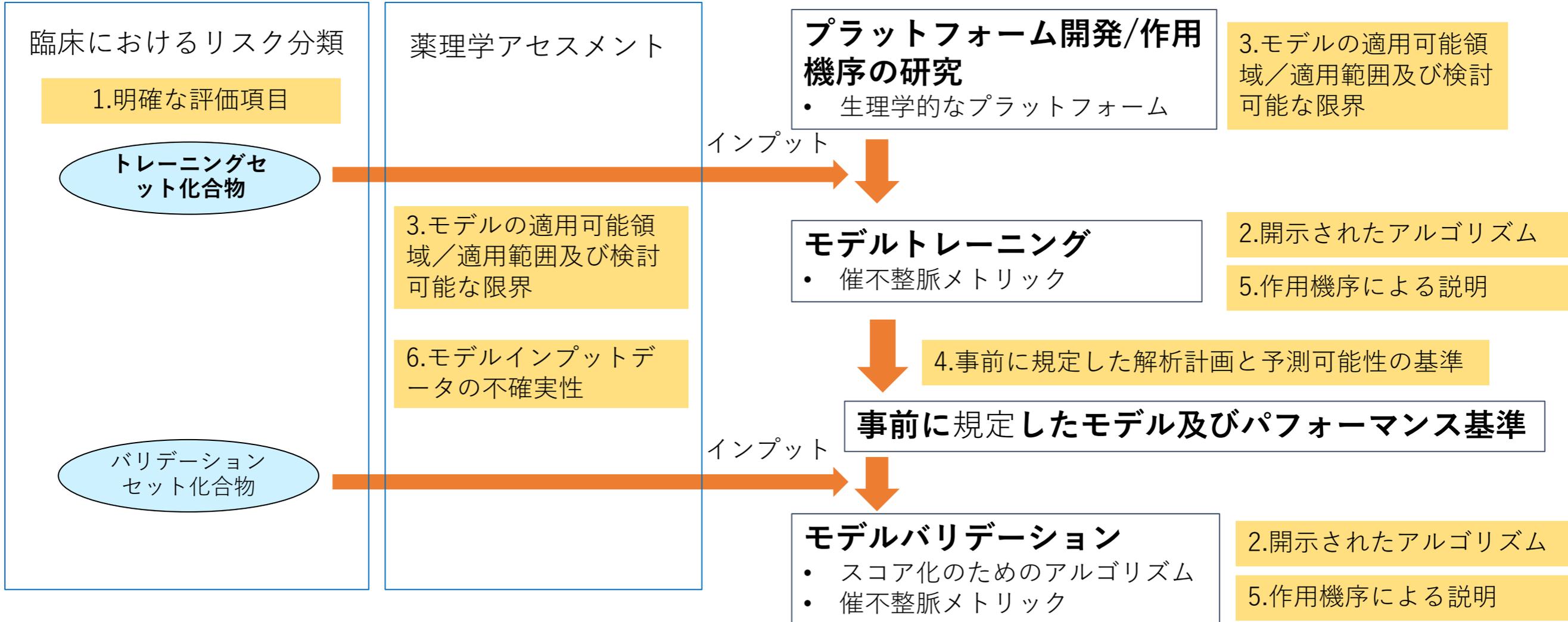
- 2007年に、経済協力開発機構 (OECD) によって、規制目的の (定量的) 構造活性相関 (QSAR) モデルの検証のための一連の原則が確立された (ICH M7 (R1) に採用)
- この原則は、規制目的の統合リスク評価の一部として使用される催不整脈予測モデルにも適用する必要がある (ICH S7B Q&A)

	OECD guideline for QSAR Model (2007)	White Paper (Li <i>et al.</i> , 2019)	ICH S7B Q&A
Principle 1	defined endpoint	defined end point	defined endpoint
Principle 2	defined domain of applicability	defined domain of applicability	defined scope and limitations of model
Principle 3	appropriate measures of goodness-of-fit, robustness and predictivity	stringent strategy and predefined criteria	prespecified analysis plan and criteria
Principle 4	unambiguous algorithm	unambiguous algorithm	fully disclosed algorithm
Principle 5	mechanistic interpretation, if possible	mechanistic interpretation	uncertainty in the model input
Principle 6		uncertainty quantification	mechanistic interpretation

催不整脈モデルの6原則

1. 評価項目が明確であり、モデル使用の状況と一致する
2. 十分に開示されたアルゴリズムによって試験の測定値（モデルのインプット）を催不整脈リスク（モデルのアウトプット）に変換する
3. モデルの適用可能領域／適用範囲及び検討可能な限界が明確である
4. 解析計画及びモデルの予測可能性を評価する基準が事前に規定されている
5. 非臨床試験の測定値と不整脈の発現機序との関連性について作用機序の観点から説明する
6. 試験の測定値の不確実性を把握し、モデルの予測に反映する

催不整脈モデルの作成



催不整脈モデルの実行

- 不整脈誘発リスク予測モデルを開発した後、プロセスに従い、モデル開発がこれらの6原則に適合しているかどうかを評価
- モデルの作製者は、モデルの適格性評価に関する具体的な手順について規制当局に相談
- 適格性評価済みのモデルは、適格性評価を行った試験施設に限定することなく利用可能
 - 適格性が評価済みであるモデルを別の試験施設で使用する場合には、モデル作成時に使用した基準となる化合物のサブセットを用いて、独自にモデルの校正及びバリデーションを実施する必要がある (参照: Hanら J Pharmacol Toxicol Methods 2020)

規制当局への提出に関する考慮事項

- モデルが開発された使用の環境下でのみモデルを使用する
- 新しいデータと過去のラボ固有の検証データとの一貫性を評価するために、つまりアッセイ及びモデルの再現性を実証するために、一連のコントロール化合物を評価する必要がある
- モデルが規制当局への提出物に含まれる場合、裏付けとなる文書を提供する必要がある

Q4.1-4.2 まとめ

- 催不整脈モデルは、Q&A に示された一般原則を考慮した上での適格性が求められる
- 催不整脈モデルは、開発者だけでなくラボ固有のバリデーションデータを持つ他のラボも使用でき、その結果を規制当局への提出資料に含むことができる
- 催不整脈モデルは、非臨床試験においてダブルネガティブでない場合のフォローアップ試験として、マルチイオンチャンネル阻害などの作用機序の解釈に有用である

ご清聴
ありがとうございました