

① 工程由来不純物の規格値について

機構は、リコネイト原薬に比べて本薬の工程由来不純物に関する規格が緩いことから、本剤とリコネイトの臨床試験、製造販売後の成績から有害事象の発現率等を比較し、規格値との関連性を考察するとともに、規格値がリコネイトのそれと異なる試験項目については、安全性を十分担保し得るよう規格値を見直す必要がないか、申請者に検討を求めた。

申請者は、当初、国内外の臨床試験成績及び製造販売後の安全性情報において、本剤とリコネイトの安全性プロファイルに大きな違いがなかったことから、本剤の不純物に関する規格を見直す必要はないと回答していた(国内外の臨床試験成績及び製造販売後安全性情報については、「4.-2)-(4)-② 本剤とリコネイトとの有害事象発現頻度の相違について」を参照)。しかしながら、本剤の品質が既承認のリコネイトと同等又は同質であることを前提として、非臨床及び臨床のデータパッケージが構成されていることから、再度、不純物含量の規格を見直すことの必要性を確認したところ、本薬の現在までの製造実績及びリコネイトとの規格の同一性を考慮し、不純物含量の規格値を変更すると回答した(CHO 細胞由来たん白質含量: ■ μ g/1,000 単位以下、vWF 含量: ■ μ g/1,000 単位以下、CHO 細胞由来 DNA 含量: ■pg/1,000 単位以下、マウス IgG 含量: ■ng/1,000 単位以下)。

機構は、臨床試験における本剤の副作用発現率はリコネイトと比較し大きな違いがなく、両製剤における規格値の相違及び添加剤の違いに起因するものではないと考えられたこと、工程由来不純物の残留量について最近の製造実績とリコネイトの規格値を踏まえて適切に見直されたことから、これを了承した。

機構は、MCB を新たに樹立しており、遺伝子発現構成体に選択マーカーとして組み込まれているジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子及びアデノシンデアミナーゼ (ADA) 遺伝子の発現がリコネイトの MCB と異なる可能性があることから、今回、これらの発現産物が精製工程において恒常的に除去されていることを評価しているか、申請者に尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。

DHFR 及び ADA の量を評価するため、培養上清及び原薬に対してイムノブロット法により試験を実施した。

DHFR については、培養上清中では ■pg/単位以上であったが、原薬 ■ロットでは約 ■pg/単位未満であり、製剤 ■ロットではバンドが検出されなかった。また、実生産スケール原薬 ■ロット中 ■ロットで約 ■pg/単位未満であり、■ロットでは検出感

度(約 $\blacksquare$ pg/単位)未満であった。250 単位製剤 $\blacksquare$ ロット、500 単位製剤 $\blacksquare$ ロット及び1,000 単位製剤 $\blacksquare$ ロットでは、いずれも DHFR のバンドは検出されなかった。これらを踏まえ、DHFR は精製工程において恒常的に除去されていることが担保されていると判断した。

ADA については、実生産スケールの培養上清 $\blacksquare$ ロット、原薬 $\blacksquare$ ロット、製剤 $\blacksquare$ ロットのいずれにおいてもバンドは検出されなかった。このことから、培養上清、原薬及び製剤において恒常的に検出感度(約 $\blacksquare$ pg/単位)未満であることが担保されていると判断した。

機構は、これを了承した。

② B ドメインの多様性について

機構は、確認試験(SDS-PAGE)において、長さの異なる B ドメインを有するペプチドが認められたことから、有効性に対する影響も踏まえ、類縁物質として取り扱う必要がないか尋ねた。

申請者は、B ドメインの長さの異なる 3 種類のペプチド(2 種類の B ドメイントランケート H 鎖、1 種類の B ドメイン欠損 H 鎖)が認められるが、生体内ではいずれもトロンビンによって切断され FVIIIa を構成する H 鎖由来 A1-a1-A2-a2 ドメインとなることから、有効性(FVIII の活性)に影響を及ぼさず、類縁物質としての取り扱いをする必要はないと回答した。

機構は、特性解析の SDS-PAGE とサイズ排除液体クロマトグラフィーにおいて、本薬とリコネイト原薬でバンドの泳動度と濃さ、溶出パターンに差異が認められることについて、糖鎖等修飾の違いによる可能性を指摘した。

申請者は、以下のように答えた。

バンドの濃さと溶出パターンの差異については、いずれも B ドメイントランケート体、B ドメイン欠損 H 鎖及び延長 L 鎖の構成比率が異なることが原因であると考える。B ドメイントランケート体、B ドメイン欠損 H 鎖及び延長 L 鎖は、いずれも体内においてトロンビンで切断された後、最終的に FVIIIa を構成する因子になることから、その分解プロファイルに差異がない。また、ペプチドマップにおける各ドメインのプロファイルはリコネイトと一致しており、比活性においても大きな差は認めていない。

泳動度の差異については、糖組成分析の結果から、本薬はリコネイト原薬に比べ、トリ又はテトラシアル化オリゴ糖量の比率が少ない傾向がある。また、総シアル酸量が同等であることから、両原薬の各シアル化オリゴ糖のシアル酸分布、即ち糖鎖修飾に差異がある可能性は否定できない。

しかしながら、力価(比活性)、非臨床及び臨床試験においてもリコネイトとの間に大きな差異は認められないことから、シアル酸分布の違いやBドメインの長さの異なるペプチドの構成比率に違いがあっても、临床上の有効性や安全性に影響を及ぼすことはないと考ええる。

機構は、これらを了承した。

③目的物質由来不純物の規格設定の必要性について

機構は、凝集体量については規格に設定されているが、その他の目的物質由来不純物にどのような種類があり、それらはどのような試験によって検出するかを尋ねた。

申請者は、i)切断体、ii)脱アミド体、iii)酸化体、iv)3次元構造的な分子変化体の4種類を挙げて説明した。

i) 切断体については分子量が異なることから、SDS-PAGE及びサイズ排除液体クロマトグラフィーで検出される。SDS-PAGEは製剤の規格に設定されている。加速試験で1,000単位製剤1ロットの1測定点においてL鎖バンドの下部にバンドを認められたが、力価の低下も経時的な傾向も認められていない。

ii) 脱アミド体については、脱アミド及び転移反応から生じるS-アデノシルホモシステイン量を逆相クロマトグラフィーにより測定することで生成量が確認される。苛酷試験(50℃±2℃、6か月)において評価したが、増加傾向は認められなかった。本薬の精製工程から製剤の凍結乾燥工程に至るまでpHを中性付近に保っており、酸・アルカリ条件に起因する脱アミド体が生成する可能性は低いと推察する。

iii) 酸化体については、酸化したペプチドの質量変化から、ペプチドマップ、ペプチドマップ/MS、逆相クロマトグラフィー及び等電点電気泳動で検出できる可能性がある。本剤の処方に抗酸化剤であるグルタチオンが添加されており、包装形態は気密容器であり、苛酷試験(50℃±2℃及び40℃±2℃/75%RH±5%RH、それぞれ6か月)で総グルタチオン量及び還元型グルタチオン量に経時的な変化は認められなかったことから、酸化体が生じている可能性は低いと推察する。

iv) 3次元構造的な分子変化体については、苛酷試験条件(50℃±2℃)で6か月保存した本薬に対して、各ドメイン選択的なモノクローナル抗体の結合率及びvWFの結合率を調べたところ、保存開始前と比べて大きな変化は認められず、生成の可能性は低いことが推察される。

機構はこれらの分子については、リコネイトにおいても規格設定はなされておらず、安定性試験での検討結果も踏まえ、現時点では規格設定する必要性が低いと判断した。

④ ペプチドマップについて

本薬及びリコネイト原薬で設定されているペプチドマップは、原薬をトロンビンで処理し、生成する ■ フラグメント(B ドメイン、■ kDa (活性型 L 鎖)、■ kDa (■ ドメイン) 及び ■ kDa (■ ドメイン)) のピークを確認するものであった。①日局参考情報ペプチドマップ法には「ペプチドマップはたん白質を識別するのにじゅうぶんな種類のペプチド断片を得るべきである。」とされていること、②本薬の特性解析試験においては、トロンビン処理試料で生成した各ピークを取得し、これをトリプシンで消化した試料を用いたペプチドマップが実施されており、この試験方法の方がより多くのペプチド断片が確認できることから、機構は、トロンビン処理試料のトリプシン消化ペプチドマップを規格及び試験方法に採用することが適切ではないかと尋ねた。

申請者は、以下のように回答した。

トロンビン処理試料のトリプシン消化ペプチドマップは分析対象としたフラグメントに対しては詳細な情報が得られるが、43kDa、50kDa 及び 73kDa 以外の採取されなかったペプチド断片については情報を得ることが出来ない。トロンビン処理試料のトリプシン消化ペプチドマップは、特性解析のために確立した方法であって操作が複雑であるため、規格試験としては採用しなかった。トロンビン処理ペプチドマップは、リコネイトと同一の方法であり、切断様式が生体内における FVIII 活性化への変化と同一で、主要ドメインを確認できることから試験方法としては適切であると判断している。

機構は、トロンビン処理後にピークを分取しないでトリプシン処理を行うペプチドマップについては、主要ドメインのみの確認で詳細な情報が得られるとはいえないものの、①本分子が 300kDa 以上の高分子であるため生成するペプチドの数が多くなり、十分な分離が困難と考えられること、②B ドメインは糖鎖構造にばらつきがあり、不均一であるために再現性を得ることが困難になると考えられること、③リコネイトにおいてはこれまでトロンビン処理ペプチドマップでその品質を確保してきたことを考え合わせて、本薬の確認試験としてはトロンビン処理試料のペプチドマップで問題ないと判断した。

⑤ 部分アミノ酸配列の規格設定について

機構は、本薬において、N 末端部分アミノ酸配列を規格として設定しないとされていることから、N 末端及び C 末端に多様性が存在するのか、存在するならば、それが有効性や安全性に影響を及ぼすのかどうかについても説明を求めた。

申請者は、本薬 3 ロットにおいて、トロンビン及びトリプシン消化処理した試料を調製し、ESI-MS (エレクトロスプレーイオン化質量分析計) 及び UV 検出器を用いて HPLC 法で分析を行い、酵素消化により断片化したペプチドのプロファイルを Isoplot 法により

評価した結果、どのフラグメントにおいても Isoplot 図の相同性は高かったことから、N 末端及び C 末端の多様性が存在する可能性は低く、有効性及び安全性に及ぼす影響は少ないと回答した。

機構は、これを了承した。

⑥ チロシン硫酸化の規格設定について

機構は、チロシンの硫酸化部位は、分子内に 6 か所あり、vWF 結合及びトロンビン活性化に関連する重要な翻訳後修飾であることが説明されていることから、規格設定する必要はないか、申請者の見解を求めた。

申請者は、本薬のチロシン硫酸化と vWF との結合能は力価に強く影響すると考えられるが、原薬及び製剤の規格で設定されている力価試験は、vWF 及び生体内で凝固反応に必要な因子が含有された試験系で測定を実施しており、硫酸化チロシンと vWF との結合能が内包されているため、さらなる規格設定は必要ないと回答した。

機構は、これを了承した。

(2) アドベイト製剤の規格について

製剤の規格及び試験方法については、①確認試験である SDS-PAGE は、トロンビン未処理試料のみで実施するとされていたが、リコネイトでの確認試験を踏まえてトロンビン処理試料と未処理試料の両方で実施するとしたこと、②再調製時間が実測値を踏まえて見直されたことに加えて、日局製剤総則注射剤や平成 13 年 5 月 1 日付 医薬審発第 571 号「生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について」に基づき、リコネイトの規格から試験項目の追加や規格値の見直しが行われており、特段の問題はないと判断した。

(3) 安定性について

機構は、原薬及び製剤の安定性試験において、ロット間での試験成績に大きなばらつきが認められていることについて説明を求めた。

申請者は、以下のように説明した。

原薬の長期保存試験結果におけるばらつきを評価するため、比活性及び力価試験の結果からロット間の相対標準偏差を求めた。比活性の各サンプリング時点でのロット間の相対標準偏差は 1.8~9.2%であり、ばらつきが認められた。また、力価試験の各サンプリング時点でのロット間の相対標準偏差は 22.9~41.3%であり、分析法バリデーション