

3. 非臨床に関する資料

1) 薬理試験成績の概要

(1) 提出された資料の概略

① 効力を裏付ける薬理試験

血液凝固第Ⅷ因子(FⅧ)遺伝子エキソン 16 ノックアウト重症血友病 A モデル(以下、血友病 A モデルマウス)を用いて、本剤とリコネイトの止血効果を比較した。雌雄各 5 匹/群に、本剤又はリコネイト(それぞれ対照群は溶媒のみ)を 150IU/kg 単回静脈内投与し、投与 30 分後に尾部を切断し、4 分毎、経時的に出血量を測定した(トータル 20 分間)。また、採血開始後 12~20 分までの累積出血量から、直線回帰により出血速度を個体毎に推定したところ、出血速度の平方根変換値が正規分布及び等分散を示したため、分散分析により群間比較を行った。本剤群及びリコネイト群の 20 分間の累積出血量は、それぞれ $194 \pm 207 \mu\text{L}$ (平均値 $\pm$ SD、以下同様)及び $202 \pm 133 \mu\text{L}$ と同程度であり、各々の対照群の累積出血量(それぞれ $390 \pm 219 \mu\text{L}$ 及び $363 \pm 189 \mu\text{L}$)と比較して低かった。また、出血速度の平方根変換値は、本剤群 $2.14 \pm 1.95 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$ 、リコネイト群 $2.64 \pm 1.18 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$ とほぼ同程度であり、対照群(それぞれ $4.61 \pm 1.13 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$ 及び $4.62 \pm 1.28 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$)と比べて、有意に低値であった(本剤 $p=0.0003$ 、リコネイト $p=0.0028$; 分散分析)。

本剤の緩衝剤である L-ヒスチジンの代わりに HEPES を用いた開発初期の製剤である本剤^{HEPES}とリコネイトを血友病 A モデルマウスに投与(150IU/kg)し、止血効果及び FⅧ活性を比較した。止血効果の測定方法及び項目は、前述の本剤とリコネイト比較試験と同一であり、FⅧ活性は、投与 30 分後に心臓穿刺により採血を行い、血漿中の FⅧ活性を chromogenic 法により測定し、国際単位換算で示した。止血効果(雌雄各 5 匹/群)について、本剤^{HEPES}群及びリコネイト群の 20 分間の累積出血量は、それぞれ $205 \pm 180 \mu\text{L}$ 及び $160 \pm 163 \mu\text{L}$ と同程度であり、各々の対照群の累積出血量(それぞれ $499 \pm 242 \mu\text{L}$ 及び $569 \pm 223 \mu\text{L}$)と比較して低出血であった。また、出血速度の平方根変換値は、本剤^{HEPES}群 $2.35 \pm 1.76 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$ 、リコネイト群 $2.02 \pm 1.94 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$ とほぼ同程度であり、対照群(それぞれ $5.35 \pm 1.36 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$ 及び $5.18 \pm 0.75 (\mu\text{L}/\text{min})^{1/2}$)と比べて、有意(ともに $p<0.0001$)に低値であった。

さらに、FⅧ活性(雌雄各 3 匹/群、ただし本剤^{HEPES}の雌は 2 匹)について、本剤^{HEPES}投与の雄($n=3$)では $67 \pm 54.3 \text{ IU/dL}$ 、雌($n=2$)では $156.5 (83.0 \text{ と } 230.0) \text{ IU/dL}$ 、リコネイト投与の雄($n=3$)では $31.7 \pm 1.2 \text{ IU/dL}$ 、雌($n=3$)では $28.7 \pm 13.4 \text{ IU/dL}$ であった。一方、対照群はいずれも 0.0 IU/dL であったことから、本剤^{HEPES}及びリコネイトの投与により、ばらつきは見られるものの FⅧ活性は上昇することが確認された。

また、FVIII活性にばらつきが見られたことから、検体数が少数であったことが原因である可能性を考慮し、エキソン 17 ノックアウト重症血友病 A モデルマウスを用いて、検体数を本剤(雄 9 匹、雌 10 匹)及びリコネイト(雄 10 匹、雌 10 匹)に増やして投与(150IU/kg)し、血漿中 FVIII 活性を測定した。FVIII 活性の測定方法は、前述の本剤^{HEPES}とリコネイト比較試験と同一である。その結果、本剤投与群では雄 1.99 ± 0.39 IU/mL、雌 1.44 ± 0.34 IU/mL、両性 1.70 ± 0.45 IU/mL となり、リコネイト投与群では雄 1.94 ± 0.38 IU/mL、雌 1.35 ± 0.55 IU/mL、両性 1.64 ± 0.55 IU/mL となり、本剤とリコネイトにおける血漿中 FVIII 活性に有意差は認められなかった。

本剤とリコネイトとの物理的・化学的性質、免疫化学的性質及び生物学的性質の類似性が認められたことから、リコネイトを血友病 A イヌに投与した際の部分活性化プロトロンビン時間 (APTT)、プロトロンビン時間 (PT)、表皮出血時間、FVIII 活性について、リコネイト承認時の資料が参考として提出された。FVIII 欠損モデルでは、内因系凝固カスケードへの影響が大きいことから、APTT の延長が見られるが、リコネイト投与により、APTT 短縮及び表皮出血時間の短縮並びに FVIII 活性の上昇が認められ、血友病 A イヌにおいてもリコネイトは止血効果及び FVIII 活性を有することが示された。

② 副次的薬理試験

本剤での一般薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験は行われていない。リコネイトとの物理的・化学的性質、免疫化学的性質及び生物学的性質の類似性が認められたことから、リコネイト承認時の試験成績が参考資料として提出された。

リコネイトは、一般症状 (Wistar ラット、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、自発運動量 (ICR マウス、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、電撃痙攣 (ICR マウス、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、疼痛 (ICR マウス、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、体温 (Wistar ラット、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、摘出回腸 (Hartley モルモット、0.011、0.11、1.1 IU/mL、*in vitro*)、呼吸/循環器系 (ビーグル犬、100、250、500 IU/kg、静脈内投与)、消化管炭末輸送能 (ICR マウス、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、水/電解質代謝 (Wistar ラット、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、PT (Wistar ラット、100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与)、カルシウム再加時間 (Wistar ラット、0.011、0.11、1.1 IU/mL、*in vitro*)、赤血球溶血 (Wistar ラット、0.011、0.11、1.1 IU/mL、*in vitro*) に対して影響を及ぼさなかった。一方、Wistar ラット (100、500、1,000 IU/kg、静脈内投与) における APTT の短縮 (500 IU/kg 以上) を示し、効力と関連する影響が見られた。

また、薬力学的薬物相互作用試験において、リコネイト (ICR マウス、100、500、

1,000IU/kg、静脈内)投与、5 分後のチオペンタールナトリウム(45mg/kg、腹腔内)投与による睡眠誘起、又は、ペンチレンテトラゾール(150mg/kg、投与)投与による痙攣誘発のいずれに対しても、増強作用を示さなかった。

(2) 機構における審査の概略

機構は、本剤^{HEPES}とリコネイトの効力を裏付ける試験において、血漿中FVIII活性が雌雄で差が大きく、また、本剤^{HEPES}とリコネイトでも差が大きいことから、本剤とリコネイトの物理的・化学的性質、免疫化学的性質及び生物学的性質が類似しているにもかかわらず、血漿中FVIII活性が大きくばらつき、両製剤における活性値に相違が認められる点について説明を求めた。

申請者は、以下のように回答した。

提出した資料ではFVIII活性のばらつきが大きく、両者が同等であるとはいえないものの、同試験及び血友病 A モデルマウスで本剤とリコネイトを比較した試験において、止血効果に本剤(本剤^{HEPES})とリコネイトで大きな相違は認められず、また、正常ラット及び血友病 A 患者での薬物動態試験(ともに「3.-2) 薬物動態試験の概要」参照)においても大きな違いは認められなかった。他の試験に比べ検体数が少数であったことが原因である可能性を考慮し、新たに本剤及びリコネイトについて検体数を増やして、血漿中FVIII活性を測定した。その結果、本剤投与群では 1.70 ± 0.45 IU/mL、リコネイト投与群では 1.64 ± 0.55 IU/mL となり、本剤とリコネイトにおける血漿中FVIII活性に有意差は認められなかった。また、本剤とリコネイトの血漿中FVIII活性のラット血漿中での半減期は約 1.5~1.6 時間とヒト(10~13 時間)に比較して短く、ばらつきも大きかった。ヒト FVIIIは動物血漿中では不安定であり、個体差が大きくなることが推察され、その結果、血漿中FVIII活性がコネイト投与群で低値に偏る結果になったものと推察する。

機構は、動物血漿中におけるヒトFVIIIが不安定である理由について、説明を求めた。

申請者は、ヒト、マウス及びラット前駆体FVIIIのアミノ酸残基数が、それぞれ 2,351 残基、2,319 残基及び 2,258 残基と異なること、ヒト-マウス間の相同性が 74%、ヒト-ラット間が 51%及びラット-マウス間が 59%であることから、異種たん白質として認識されたのではないかと回答した(Genomics, 16:374-379, 1993、Thromb Haemost, 91:38-42, 2004)。

以上から、機構は、本剤とリコネイトについて実施された再試験、血友病 A モデルマウスでの止血効果、その他の薬物動態試験等から、本剤とリコネイトの血友病 A モデルマウスにおける血漿中FVIII活性については同等であるとの回答を了承し、本剤がFVIII欠損

モデルにおいて血漿中FVIII活性を上昇させ、止血機構を進行させ得るとの申請者の主張は妥当であると判断した。

機構は、一般薬理試験については、本剤の物理的・化学的性質、免疫化学的性質及び生物学的性質がリコネイトと類似していることから、リコネイトの承認審査に用いられた資料を参考資料とすることは妥当であると判断した。

本剤の安全性薬理試験については、ICH/S7A ガイドライン「安全性薬理試験ガイドラインについて」（平成13年6月21日付 医薬審発第902号 厚生労働省医薬局審査管理課長通知）の「2.9 試験が不必要な条件」の項に、「特異的受容体に対し高度に標的化を成し遂げたバイオテクノロジー応用製品に対しては、毒性もしくは薬力学的試験の一部分としての安全性薬理エンドポイントを評価することで十分な場合がしばしばある。」及び「他には例えば薬力学及び薬物動態が類似している新規塩化合物の場合のように安全性薬理試験が不要な追加的除外例がある。」と記載があることから、申請者は本剤を安全性薬理試験の検討を要しないバイオ医薬品と判断し、当該試験を実施しなかったとしている。機構は、一般症状、自発運動量、呼吸/循環器系等、安全性薬理コアバッテリーに相当する試験について、リコネイトの成績を参考資料として提出しなかった理由について説明を求めた。

申請者は、本剤の安全性薬理試験は実施していないものの、リコネイトの安全性薬理コアバッテリーに該当する試験は、一般薬理試験ガイドライン（平成3年1月29日付 薬審第4号 厚生省薬務局新医薬品課長通知）に従って行われており、本剤は安全性薬理の検討を要しないバイオ医薬品であるとの記載を改め、安全性薬理コアバッテリーに該当すると考えられる部分を、「CTD 2.6.2.3 副次的薬理試験」の項に「(1) リコネイトの一般薬理試験」の試験結果の一部として記載すると回答し、機構はこれを了承した。

2) 薬物動態試験の概要

(1) 提出された資料の概略

① 非臨床薬物動態試験

本剤を用いた薬物動態試験は実施されていないが、本剤と開発初期の製剤である本剤^{HPPES}との違いは緩衝剤が異なるのみで、薬理学的及び毒性学的差異がないとの理由から、薬物動態の検討には、本剤^{HPPES}及びリコネイトを用いた試験成績が提出された。また、本剤の有効成分がルリオクトコグ アルファ（遺伝子組換え）であることから、リコネイトの承認申請時に提出した¹²⁵I-標識ルリオクトコグ アルファ（遺伝子組換え）（以下、標識体）を用いた吸収、分布、代謝、排泄に関する資料が参考資料として提出された。

なお、標識体を用いた各試験では雄性 Wistar ラット(4 匹/各時点)に 100IU/kg が静脈内に単回又は 14 日間反復投与された。

i) 吸収

雄性 SD 系ラットに本剤^{HEPES} (15 匹) 又はリコネイト (17 匹) を 400IU/kg 静脈内投与し、投与後 5、15、30、90、180、300 及び 420 分の時点で採血を行い、血漿中 FVIII 活性を測定して薬物動態パラメータ (AUC、 $t_{1/2}$ 、MRT、CL) を求めた。投与後の血漿中 FVIII 活性は、本剤^{HEPES} とリコネイトともに、投与後 5 分の時点で最高値を示し、30 分までに 2/3 倍に低下し、その後漸減して行った。本剤^{HEPES} の薬物動態パラメータは、AUC $6,748.45 \pm 1,653.99 \text{mIU} \cdot \text{hr/mL}$ (平均値 $\pm$ SD、以下同様)、 $t_{1/2}$ $1.55 \pm 0.47 \text{hr}$ 、MRT $2.44 \pm 1.20 \text{hr}$ 、CL $63.22 \pm 18.99 \text{mL/hr/kg}$ 、リコネイトでは AUC $5,900.11 \pm 1,503.31 \text{mIU} \cdot \text{hr/mL}$ 、 $t_{1/2}$ $1.54 \pm 0.33 \text{hr}$ 、MRT $1.85 \pm 1.08 \text{hr}$ 、CL $71.86 \pm 17.69 \text{mL/hr/kg}$ であった。両剤間で FVIII 活性の経時的推移パターンは類似し AUC は同程度であり、 $t_{1/2}$ 、MRT 及び CL には両剤間で有意差は認められなかった。

また、標識体を単回又は 14 日間反復静脈内投与し、それぞれ投与後 1~72 時間までの薬物動態パラメータ ($t_{1/2}$ 及び AUC) を求めた。単回投与後 1~24 時間の測定値に基づき算出した血液中 $t_{1/2}$ は $9.2 \pm 0.8 \text{hr}$ であり、投与後 24~72 時間では $35.9 \pm 4.2 \text{hr}$ であった。また、投与後 0~72 時間の血液中 AUC は $4,779 \pm 555 \text{F} \cdot \text{hr}$ であった (F: 放射能濃度 = 試料中放射能 (dpm/mL) / 投与放射能 (dpm/g 体重) $\times 100$)。血漿中の AUC は $6,538 \pm 758 \text{F} \cdot \text{hr}$ であり、血液中と比較し、やや高値であったが、 $t_{1/2}$ は投与後 1~24 時間までは $10.0 \pm 0.9 \text{hr}$ 、投与後 24~72 時間は $37.4 \pm 3.9 \text{hr}$ であり、血液中の値に類似していた。14 日間反復投与後の薬物動態パラメータは、投与後 1~24 時間までの血液中 $t_{1/2}$ は $9.3 \pm 0.6 \text{hr}$ 、投与後 24~72 時間は $27.9 \pm 1.8 \text{hr}$ であった。反復投与後 1~24 時間までの $t_{1/2}$ は単回投与時のそれと同程度であった。投与後 0~72 時間までの血液中 AUC は $6,562 \pm 385 \text{F} \cdot \text{hr}$ であり、単回投与時の値と比較しやや高値であった。

ii) 分布

雄性 Wistar 系ラットに標識体を単回静脈内投与したとき、投与後 5 分に最大放射能濃度を示し、主に血液に富む臓器 (肝臓、肺、副腎、骨髄、脾臓及び腎臓) で高値となり、投与後 2 時間では胃及び脾臓で上昇したものの、先の臓器については濃度の低下が見られた。また、投与後 8 時間では胃で高値であることを除き、他の臓器では低下が見られ、24 時間後ではすべての臓器で、さらに放射能濃度の低下が認められた。14 日間反復静脈内投与したときは、脾臓で単回投与時に比べて高値を示したものの、他

の臓器については、やや高い程度であり、顕著な蓄積傾向は認められなかった。

なお、甲状腺では標識体のヨウ素 (^{125}I) の特性を反映し、放射能濃度がいずれの時点でも高値であった。

iii) 代謝

雄性 Wistar 系ラット (4 匹/各試験条件) に標識体を単回静脈内投与し、血漿 (投与後 5 分、2 時間、8 時間)、尿 (投与後 0~4 時間)、肝臓及び腎臓 (投与後 5 分) を採取し、放射性成分を薄層クロマトグラフィー及び SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した結果、血漿 (2 時間、8 時間) では、一部の放射能が染色ゲルのアルブミン画分と対応した。また、肝臓では放射能が分子量約 15,000 以下、約 35,000~45,000 及び約 70,000 の画分に、腎臓では約 70,000 の画分に分布した。一方、尿では分子量 15,000 以下の低分子量画分にのみ分布したことから、標識体は肝臓で代謝・分解され、これが血漿中でアルブミンに捕捉され体内循環し、逐次尿中に排泄されることが示唆された。

iv) 排泄

雄性 Wistar 系ラット (4 匹/各試験条件) に標識体を単回及び 14 日間反復静脈内投与後 72 時間以内に、それぞれ約 83% 及び約 90% が尿中に、約 7% 及び約 5% が糞中に排泄され、反復投与による変化は見られなかった。なお、胆汁中には単回静脈内投与 48 時間以内に約 23% が排泄されたが、糞中排泄率が低かったことから、大部分の放射能は消化管から全身循環へ再吸収されることが示唆された。

② 臨床における薬物動態

10 歳以上の治療歴のある中等又は重症 (血漿中 FVIII 活性が 2% 以下) の血友病 A 患者 (以下、PTPs : Previously Treated Patients) を対象とし、本剤の薬物動態並びに安全性及び有効性を検証する試験が実施された。Part I では、本剤及びリコネイトをランダム化 2×2 クロスオーバー法でそれぞれ $50 \pm 5\text{IU/kg}$ 単回静脈内投与し、生物学的同等性の検討がなされた。Part II では、Part I を完了した症例を対象として、出血時には $10 \sim 50\text{IU/kg}$ 、出血が予想される場合には $25 \sim 40\text{IU/kg}$ の用量で 6 か月 (24~28 週) 投与した。Part II 終了時に本剤 $50 \pm 5\text{IU/kg}$ を単回静脈内投与して薬物動態パラメータを求め、単回投与と長期反復投与における補正回収率 (補正回収率 = $(C_{\text{max}} - \text{投与前血漿中第VIII因子活性}) / \text{投与量}$) の比較がなされた (臨床効果については、4. 臨床の項参照)。

Part I における本剤及びリコネイト投与時の AUC_{0-48} (平均値 $\pm$ SD) はそれぞれ $1,408 \pm$