オルプロリクス® 静注用 250
オルプロリクス® 静注用 500
オルプロリクス® 静注用 1000
オルプロリクス® 静注用 2000
オルプロリクス® 静注用 3000

第 2 部（モジュール 2）：CTD の概要（サマリー）

2.6.2　薬理試験の概要文

バイオジェン・アイデック・ジャパン株式会社

目次

1.　まとめ 6
1.1　効力を裏付ける試験 6
1.1.1　*In vitro* 試験 6
1.1.2　*In vivo* 試験 7
2.　効力を裏付ける試験 9
2.1　*In vitro* 試験 9
2.1.1　凝固活性化（テンナーゼ複合体形成を利用した FXa 生成試験） 9
2.1.2　FcRn に対する結合親和性 12
2.2　*In vivo* 試験 12
2.2.1　血友病 B マウスを用いた凝固活性試験 13
2.2.2　血友病 B イヌを用いた凝固活性試験 15
2.2.3　血友病 B マウス出血モデルでの rFIXFc の効果 16
2.3　製剤間の凝固活性比較 22
2.3.1　凍結液剤及び凍結乾燥剤の凝固活性比較（aPTT） 22
2.3.2　[redacted] L 及び [redacted] L 製剤の凝固活性比較（aPTT 及び ROTEM） 23
3.　副次的薬理試験 23
4.　安全性薬理試験 23
5.　薬力学的薬物相互作用試験 24
6.　考察及び結論 24
7.　引用文献 25

表一覧

表 1　rFIXFc の *in vivo* 薬力学試験の概要 7

図一覧

図 1　発色法を用いた FXa 生成試験の概要 10
図 2　血友病 B マウスにおける rFIXFc 及び BeneFIX 単回静脈内投与後の凝固活性（aPTT） 14
図 3　血友病 B マウスにおける rFIXFc 及び BeneFIX 反復静脈内投与後の凝固活性（aPTT） 14
図 4　血友病 B イヌにおける rFIXFc の凝固活性（aPTT） 15
図 5　血友病 B イヌにおける凝固活性（WBCT） 16
図 6　血友病 B マウス尾切断出血モデルでの失血量 17
図 7　血友病 B マウス尾切断出血モデルにおける rFIXFc 及び BeneFIX の 用量－失血量（中央値）直線 18
図 8　血友病 B マウス尾切断出血モデルにおける rFIXFc 及び BeneFIX の 用量－出血防止率直線 18
図 9　rFIXFc による血友病 B マウス TVT モデルの生存率及び再出血予防率 （TVT 72 時間前投与） 20
図 10　BeneFIX による血友病 B マウス TVT モデルの生存率及び再出血予防率 （TVT 24 時間前投与） 20
図 11　rFIXFc（72 時間前投与）及び BeneFIX（24 時間前投与）による血友病 B マウス TVT モデルの生存率比較 21
図 12　FIX 製剤による出血予防効果と TVT 時血漿濃度との相関関係 22

略号一覧

略号	日本語	英語
aPTT	活性化部分トロンボプラスチン時間	Activated partial thromboplastin time
AT	アンチトロンビン	Antithrombin
C_{max}	最高血漿中濃度	Maximum plasma concentration
EC_{50}	50%効果濃度	50% Effective concentration
ED_{50}	50%有効用量	50% Effective dose
FcRn	neonatal Fc 受容体	Neonatal Fc receptor
FIX	血液凝固第 IX 因子	Factor IX
FIXa	活性化血液凝固第 IX 因子	Activated Factor IX
FVIIa	活性化血液凝固第 VII 因子	Activated Factor VII
FVIII	血液凝固第 VIII 因子	Factor VIII
FVIIIa	活性化血液凝固第 VIII 因子	Activated Factor VIII
FX	血液凝固第 X 因子	Factor X
FXa	活性化血液凝固第 X 因子	Activated Factor X
FXIa	活性化血液凝固第 XI 因子	Activated Factor XI
Gla	γ-カルボキシグルタミン酸	Gamma carboxyglutamic acid
IgG_1	免疫グロブリン G_1	Immunoglobulin gamma subclass 1
IU	国際単位	International unit
K_d	解離定数	Dissociation constant
K_m	ミカエリス・メンテン定数	Michaelis constant
rFIX	遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子	Recombinant coagulation Factor IX
rFIXa	活性化遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子（活性化 BeneFIX）	Activated recombinant coagulation Factor IX (Activated BeneFIX)
rFIXFc	遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子 Fc 融合タンパク質	Recombinant coagulation Factor IX Fc fusion protein
rFIXa-Fc	活性化遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子 Fc 融合タンパク質	Activated recombinant coagulation Factor IX Fc fusion protein
PK	薬物動態	Pharmacokinetics
ROTEM	全血凝固線溶分析装置	Rotation thromboelastometry
$t_{1/2}$	消失半減期	Elimination half-life
TF	組織因子	Tissue factor
TVT	尾静脈切断	Tail vein transection
V_{max}	最大反応速度	Maximum reaction velocities
WBCT	全血凝固時間	Whole blood clotting time

1.　まとめ

血液凝固第 IX 因子（FIX）は、凝固カスケードで中心的役割を担うセリンプロテアーゼである。FIX は通常、不活性の前駆体として血中に存在するが、刺激に反応すると、活性化血液凝固第 XI 因子（FXIa）又は活性化第 VII 因子（FVIIa）／脂質化された組織因子（TF）複合体（FVIIa/TF）により、それぞれ内因性又は外因性経路を介して、活性化血液凝固第 IX 因子（FIXa）に変換される。FIXa は、活性化血液凝固第 VIII 因子（FVIIIa）、カルシウム及びリン脂質表面の存在下に血液凝固第 X 因子（FX）から活性化第 X 因子（FXa）への変換を触媒する。FXa は、最終的にトロンビンの生成を促し、結果的にフィブリン塊の形成を促進する。

rFIXFc（遺伝子組換え血液凝固第IX因子Fc融合タンパク質、開発コード番号BIIB029）は免疫グロブリンG_1（IgG_1）のFc領域に 1 分子のFIXを遺伝子組換え技術で結合させた新規のFc融合タンパク質であり［1］、IgGのFc領域はneonatal Fc受容体（FcRn）に結合してIgGを細胞内異化作用から保護し、循環血液中での消失半減期（$t_{1/2}$）を延長する［2］。薬物動態（PK）解析の結果、rFIXFcの$t_{1/2}$ は全ての供試動物種でBeneFIX® ［ベネフィクス® ：ノナコグアルファ（遺伝子組換え）、遺伝子組換え血液凝固第IX因子］よりも長かった。以上の結果から、rFIXFcは既存のFIX補充療法よりも持続的な出血予防効果を示し、投与回数を減らすことができると期待される。

非臨床薬理試験では、長時間作用型凝固促進剤としての rFIXFc の効果を裏付ける試験を中心に実施した。

1.1　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験では、rFIXFc の臨床使用目的を考慮し、急性出血の補充療法又は定期補充療法を適用とした長時間作用型血液凝固促進剤としての rFIXFc の作用を評価した。

1.1.1　*In vitro*試験

凝固一段法による活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）アッセイで測定したrFIXFcの比活性は、モル基準でBeneFIXの約半分であった［3］。

rFIXFc の特性を詳細に検討したところ、BeneFIX との比活性差は γ-カルボキシル化やプロペプチド切断などの重要な翻訳後修飾の欠如によるものではないことが示唆された［3］。

そこで、rFIXFc と BeneFIX の凝固活性を比較する *in vitro* 試験を追加実施し、rFIXFc の機能的性質を調べるとともに、構造の違いが FIX 成分の機能に影響を及ぼすか否かを検討した。rFIXFc と BeneFIX の比較はテンナーゼ複合体形成を利用した FXa 生成試験で実施した（試験番号 R-FIX-024）。活性化した rFIXFc（rFIXa-Fc）は、アンチトロンビン（AT）III との相互作用、テンナーゼ複合体形成能、FVIIIa との相互作用の点で活性化 BeneFIX（rFIXa）と同様の性質を示した。rFIXFc と BeneFIX との間に比活性差をもたらす機序的原因は不明であるが、投与は BeneFIX と同様に体重 1 kg 当りの活性（IU）を基準として投与されるため、患者への投与に影響はない

と考えられる。

ヒト FcRn 及び毒性試験で用いた動物種（ラット及びサル）の FcRn に対する rFIXFc の結合親和性を表面プラズモン共鳴法により検討した（試験番号 R-FIX-042）。ラットの可溶性 FcRn に対する rFIXFc の 50%効果濃度（EC_{50}）はヒト及びサルの可溶性 FcRn よりも低く、この傾向は各動物種の FcRn に対するヒト IgG の結合親和性と同様であった。毒性試験に用いた動物種（ラット及びサル）の FcRn 受容体はどちらも十分な親和性で rFIXFc と結合することが示唆された。

1.1.2　*In vivo*試験

血友病 B の補充療法の評価として、FIX 欠損血友病 B マウス（試験番号 R-FIX-017）及び血友病 B イヌ（試験番号 R-FIX-014）を用いた血漿の凝固活性試験を実施した。また、血友病 B マウス出血モデルを用いて rFIXFc の止血効果（試験番号 R-FIX-031-R1）及び出血予防効果（試験番号 R-FIX-032-R1）を実施した。

さらに、異なる製剤間での凝固活性比較試験として、rFIXFc の凍結液剤（[redacted] L 原薬から製造）及び凍結乾燥剤（[redacted] L 原薬から製造）（試験番号 R-FIX-027）並びに凍結乾燥剤の [redacted] L 製剤（[redacted] L 原薬から製造）と [redacted] L 製剤（[redacted] L 原薬から製造）（試験番号 N-FIX-010-R1）を比較するための血友病 B マウスを用いた単回静脈内投与試験を実施した。

In vivo 薬力学試験の概要を表 1 に示す。

表 1　rFIXFcの*in vivo*薬力学試験の概要

試験番号及び試験表題	動物種	投与量及び投与経路	結果
R-FIX-017 Efficacy of FIXFc Monomer and BeneFIX in FIX-Deficient Mice 血友病 B マウスにおける rFIXFc 及び BeneFIX の凝固活性	血友病 B マウス	単回投与及び反復投与（第 0、4 及び 8 日） 5 mg/kg（219 IU/kg） 静脈内投与	血友病 B マウスにおいて rFIXFc は BeneFIX よりも持続した凝固活性（aPTT）を示した。
R-FIX-014 Characterization of FIXFc for a Hemophilic Dog Study, and the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of FIXFc in Hemophilic Dogs 血友病 B イヌにおける rFIXFc の凝固活性及び PK	血友病 B イヌ	単回投与 2.86 及び 2.90 mg/kg（135 及び 137 IU/kg） 静脈内投与	血友病 B イヌにおいて rFIXFc 投与 144 時間後まで凝固活性（WBCT 及び aPTT）は正常レベルを維持した。

表 1　rFIXFcの*in vivo*薬力学試験の概要（続き）

試験番号及び試験表題	動物種	投与量及び投与経路	結果
R-FIX-031-R1 Acute Efficacy of rFIXFc in the Tail Clip Bleeding Model of Hemophilia B Mice 血友病 B マウスを用いた尾切断出血モデルに対する rFIXFc の止血効果	血友病 B マウス	単回投与 40、80、120、240、360 及び 720 IU/kg 静脈内投与	尾切断出血モデルにおいて rFIXFc は BeneFIX と同程度の効果を示した。
R-FIX-032-R1 Recombinant FIX Fc Fusion Protein: Prophylactic Efficacy in Hemophilia B Mouse Tail Vein Transection Model 血友病 B マウスを用いた尾静脈切断（TVT）モデルに対する rFIXFc の出血予防効果	血友病 B マウス	単回投与 4、13、40 及び 120 IU/kg 静脈内投与	TVT 72 時間前に投与した rFIXFc は 24 時間前に投与した BeneFIX と同様に再出血を抑制し、生存率を増加したことから、rFIXFc の出血予防効果は BeneFIX よりも持続することが示唆された。
R-FIX-027 Comparability of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of FIXFc Phase 1 DP and Phase 3 DP after a single IV dose in FIX-deficient Mice rFIXFc の凍結液剤（第 1 相製剤）と凍結乾燥剤（第 3 相製剤）単回投与後の薬力学及び PK 比較	血友病 B マウス	単回投与 200 IU/kg 静脈内投与	血友病 B マウスにおいて凍結液剤及び凍結乾燥剤はどちらも同程度の持続した凝固活性（aPTT）を示した。
N-FIX-010-R1 Efficacy Comparison of rFIXFc [redacted] L Lyophilized Drug Product and [redacted] L Lyophilized Drug Product by Whole Blood Rotational Thromboelastometry in FIX-deficient Mice 血友病B マウスにおける [redacted] L 及び [redacted] L 製剤の全血凝固線溶分析による薬力学的比較	血友病 B マウス	単回投与 rFIXFc [redacted] L 及び [redacted] L 製剤 50 IU/kg 静脈内投与	血友病B マウスにおいて [redacted] L 及び [redacted] L 製剤は BeneFIX と同程度の凝固活性（ROTEM®）を示したが、両剤の持続時間はBeneFIX よりも長かった。

WBCT =全血凝固時間（whole blood clotting time）
aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time）
ROTEM= 全血凝固線溶分析装置（rotation thromboelastometry）
TVT = 尾静脈切断（Tail Vein Transection）

rFIXFc の *in vivo* 薬力学試験の結果は、改善された PK 特性（$t_{1/2}$ 延長）と相関していた。$t_{1/2}$ が延長した rFIXFc は BeneFIX と比較して、血友病 B 補充療法としてより高い薬力学的効果を示した。試験結果の要約を以下に示す。

- 血友病 B マウス及び血友病 B イヌの血漿を用いた試験で、rFIXFc は BeneFIX と比較してより持続的な凝固活性を示した（2.2.1 及び 2.2.2 項）。
- 血友病 B マウス（aPTT 及び ROTEM、2.2.1 及び 2.3.2 項）及び血友病 B イヌ（aPTT 及び WBCT、2.2.2 項）での rFIXFc の凝固活性は、BeneFIX と同程度であった。

- 血友病 B マウス出血モデルに対して rFIXFc と BeneFIX は同程度の止血作用を示した（2.2.3.1 項）。
- rFIXFc の血友病 B マウス出血モデルにおける出血予防効果は BeneFIX と比較してより持続的であった（2.2.3.2 項）。
- 血友病 B マウスを用いた試験で、rFIXFc の凍結液剤及び凍結乾燥剤の凝固活性（aPTT）（2.3.1 項）並びに[redacted] L 製剤及び[redacted] L 製剤の凝固活性（ROTEM）（2.3.2 項）は同程度であった。これらの薬力学試験結果から、GLP 毒性試験及び臨床試験で用いられた異なる製造工程による rFIXFc の類似性が示された。

2.　効力を裏付ける試験

マウス、ラット、イヌ及びサルを用いた非臨床 PK 試験で rFIXFc の $t_{1/2}$ の延長が確認されたことから、rFIXFc を長時間作用型 FIX として評価するための非臨床薬力学的試験を計画した。

2.1　*In vitro*試験

rFIXFc は Fc 二量体を有し、その分子量（98 kDa）は BeneFIX（47 kDa）の約 2 倍であるため、比活性はモル基準で比較した。凝固一段法による aPTT 測定の結果、rFIXFc の比活性は約 60 IU/mg（5.9 IU/nmol）であり、BeneFIX の比活性は約 260 IU/mg（12.1 IU/nmol）であった［3］。

FIX は、γ-カルボキシグルタミン酸残基（Gla ドメイン）に存在する初めの 12 個のグルタミン酸残基の γ-カルボキシル化、セリンリン酸化、チロシン硫酸化、糖鎖付加など翻訳後修飾を受ける複数の機能的ドメインを含む複合タンパク質である。rFIXFc の特性を詳細に検討したところ、BeneFIX との比活性差はこれら翻訳後修飾の欠如によるものではないことが示唆された［3］。また、rFIXFc と BeneFIX の Gla ドメインの配列は、アミノ酸解析及びペプチドマッピングによってその類似性が確認されている。

ヒト免疫グロブリン G_1（IgG_1）の定常領域（Fc 領域）に FIX を融合させることにより、同タンパク質の *in vivo* でのクリアランスは減少するが、rFIXFc が持つ生化学的特性により *in vivo* での回収率及び機能に影響を与える可能性がある。そこで、rFIXFc と BeneFIX の凝固活性を比較する *in vitro* 試験を追加実施し、rFIXFc の機能的性質を調べるとともに、構造の違いが FIX 成分の機能に影響を及ぼすかどうかを検討した。

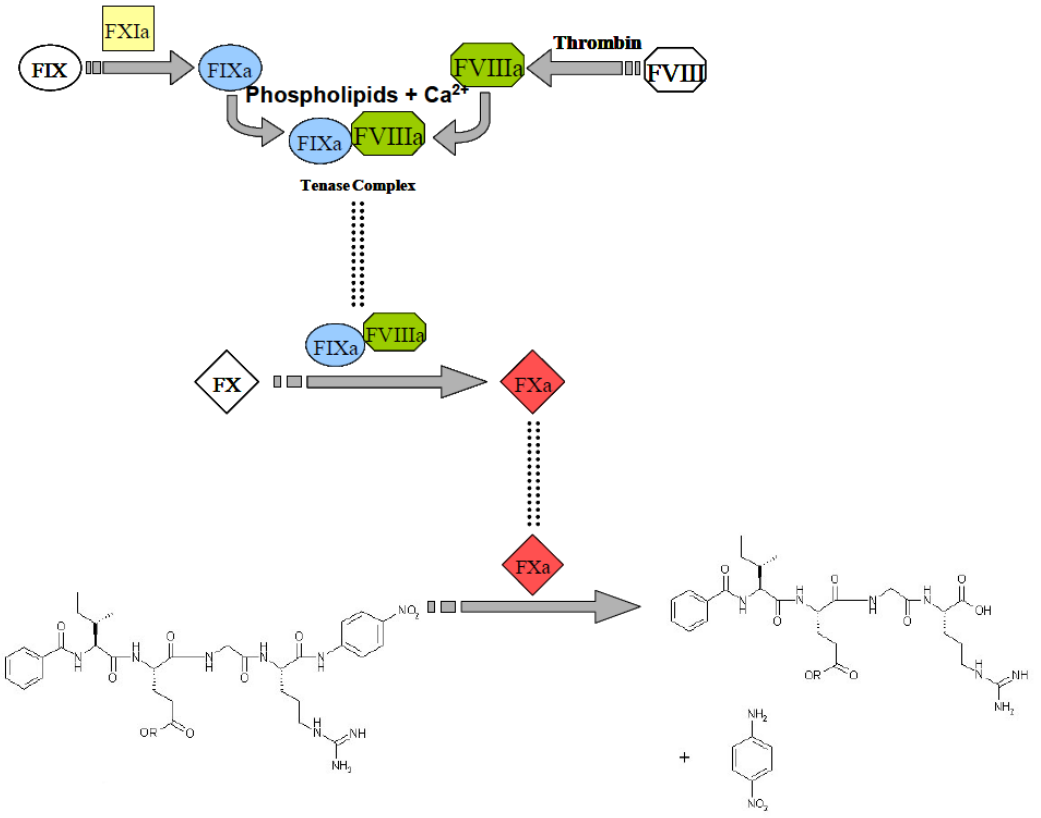
2.1.1　凝固活性化（テンナーゼ複合体形成を利用したFXa生成試験）

（試験番号 R-FIX-024、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料）

rFIXFc と BeneFIX の比較はテンナーゼ複合体形成を利用した FXa 生成試験（図 1）を実施し、FX を FXa に変換させる FIXa の活性を測定した。リン脂質源［セファリン、合成リン脂質小胞（25%ホスファチジルセリン／75%ホスファチジルコリン）又は血小板］及びカルシウム存在下

で、α-トロンビンによって活性化された FVIII（FVIIIa）に FIXa を加えた。生成したテンナーゼ複合体に、発色基質又は蛍光発生基質存在下で FX を加え、活性化 FX（FXa）生成の指標として吸光度又は蛍光度を測定した。

図 1　発色法を用いたFXa生成試験の概要



［試験番号 R-FIX-024　Figure 1］

（1）　ATIII による FIXa 生成阻害

ATIII による FIXa 生成阻害を評価した。FXIa で活性化した活性化 rFIXFc（rFIXa-Fc）又は活性化 BeneFIX（rFIXa）100 nmol/L と各種濃度の ATIII を混合し、FIXa（rFIXa-Fc 及び rFIXa）による FX 活性化を評価した。ATIII の濃度を上げると、それに対応して rFIXa-Fc 及び rFIXa はどちらも阻害された。モル過剰（>100 nmol/L）の ATIII を加えた場合、rFIXa-Fc 及び rFIXa による FX 活性化はどちらもベースラインレベルであった。以上の結果より、ATIII による rFIXa-Fc 阻害作用は適切に維持されていることが示唆された。

（2）　FIX のテンナーゼ複合体形成能

rFIXFc が全長組み換え FVIII（[redacted]）とテンナーゼ複合体を形成する能力を評価した。本試験では FIX 活性化、FVIIIa 及びリン脂質の有無によるテンナーゼ複合体形成への影響を評価した。rFIXFc 及び BeneFIX を FXIa による活性化なしでインキュベートした場合、FXa 生成速度が著しく低かった（<0.1 nmol/L/min）ことから、FIX 活性化は複合体形成に必須であることが示唆された。また、FVIIIa、カルシウム及びセファリン存在下で rFIXFc 及び BeneFIX を FXIa で活性化させた場合、テンナーゼ複合体が形成され、その FXa 生成速度は rFIXa-Fc 及び rFIXa でそれぞれ 21.7 ± 2.9 及び 22.0 ± 2.5 nmol/L/min と著しく増加した。FVIIIa 非存在下では、FXa 生成速度が 0.1 nmol/L/min 未満まで低下したことから、本アッセイは FVIIIa と FIXa（rFIXa-Fc 又は rFIXa）による複合体形成に特異的であることが示唆された。リン脂質非存在下では、rFIXa-Fc と rFIXa はどちらも FVIIIa と複合体を形成しなかった（FXa 生成速度<0.1 nmol/L/min）。

以上より、リン脂質及びカルシウム存在下で rFIXa-Fc は FVIIIa と活性化テンナーゼ複合体を形成し、その複合体は rFIXa の場合と同様の速度で FX を FXa に変換することが示唆された。

（3）　FIX 中の FIXa 濃度

本試験で用いた rFIXFc 及び BeneFIX 中の活性化されていない状態での rFIXa-Fc 及び rFIXa 濃度を定性的に比較するためのアッセイを構築した。FVIIIa 及び FIXa（rFIXa-Fc 及び rFIXa；1 nmol/L）による FXa 生成速度を FVIIIa 及び FIX（rFIXFc 及び BeneFIX；125、250、500 及び 1000 nmol/L）による FXa 生成速度と比較した。rFIXa 1 nmol/L による FXa 生成速度は、250 nmol/L から 500 nmol/L の BeneFIX による生成速度の範囲であった。つまり 250～500 nmol/L の BeneFIX が 1 nmol/L の rFIXa を含んでいることを示唆しており、BeneFIX 中の FIXa 含有率は 0.2%～0.4%となる。一方、rFIXFc 中の rFIXa-Fc は BeneFIX 中の rFIXa と比較して極めて少なく、1000 nmol/L の rFIXFc による FXa 生成速度は、最低用量 BeneFIX（125 nmol/L）よりも低かった。試験したそれぞれの濃度での rFIXFc 及び BeneFIX の FXa 生成比を比較すると、rFIXFc は BeneFIX より少なくとも 30 倍遅い速度で FXa を生成した。

（4）　FIXa と FVIIIa との相互作用

FIXa と FVIIIa との相互作用に対する Fc ドメインの影響を評価するため、FXa 生成試験を用いて rFIXa-Fc 及び rFIXa の FVIIIa に対する解離定数（K_d）及び最大反応速度（V_{max}）を算出した。リン脂質源としてセファリン、合成リン脂質小胞又は血小板を用いた。FVIIIa に対する rFIXa-Fc 及び rFIXa の K_d 並びに V_{max} は試験した全ての条件下で同程度であった。また、予想した通り、解離定数及び反応速度は rFIXa-Fc 及び rFIXa ともにリン脂質源によって異なっていた。以上の結果から、rFIXFc の Fc ドメインは FVIIIa との相互作用に影響を与えないことが示唆された。

（5）　テンナーゼ複合体による FXa 生成速度

FX に対するテンナーゼ複合体の親和性を表すミカエリス・メンテン定数（K_m）及び V_{max} に及ぼす Fc ドメインの影響を基質存在下で検討した。リン脂質源として合成リン脂質小胞又は血小

板（活性化及び非活性化）存在下、各種濃度の FX において FXIa 又は FVIIa/TF で活性化させた rFIXFc 及び BeneFIX のテンナーゼ複合体活性を評価した。

合成リン脂質小胞又は非活性化血小板を用いた場合、FXIa で活性化した rFIXFc によるテンナーゼ複合体形成の K_m 及び V_{max} は FXIa で活性化した BeneFIX の場合と類似していた。また、FVIIa/TF で活性化した場合と比較したところ、rFIXa-Fc 及び rFIXa とも活性化条件に関わらず同様のパラメーター値を示した。更に、活性化及び非活性化血小板を用いた場合で比較したところ、それぞれの条件下で rFIXa-Fc 及び rFIXa は同様のパラメーター値を示した。

［小括］

以上、rFIXFc の機能的性質を様々な *in vitro* アッセイを用いて BeneFIX と比較した。

rFIXa-Fc は、ATIII との相互作用、テンナーゼ複合体形成能及び FVIIIa との相互作用の点で rFIXa と類似していた。この類似性は、FXIa 又は FVIIa／TF による活性化のいずれの場合でも同様に認められた。rFIXFc により形成されたテンナーゼ複合体は、活性化又は非活性化血小板、合成リン脂質小胞もしくはセファリンのいずれを用いた場合でも BeneFIX により形成された複合体と類似していた。

aPTT 測定による rFIXFc の比活性が減少した理由は不明であるが、今回実施した試験では検出されなかった FIX 活性化速度及びテンナーゼ複合体形成に関するわずかな違いが aPTT 測定に影響を及ぼした可能性が考えられる。しかし、全ての *in vivo* 試験では体重 1 kg 当たりの IU を基準として動物に投与するため、比活性差が影響することはないと考えられる。また、患者への rFIXFc 投与も質量（mg）ではなく効力（IU）を基準として行われることから、治療上の影響はないと思われる。

2.1.2　FcRnに対する結合親和性

（試験番号 R-FIX-042、添付資料 4.2.1.1.2、評価資料）

ヒト FcRn 並びにラット及びサル（毒性試験で用いた動物種）の FcRn に対する rFIXFc の結合親和性を表面プラズモン共鳴法により検討した。

各動物種の可溶性 FcRn に対する rFIXFc の EC_{50} の平均値±標準偏差（n = 3）を算出した。rFIXFc のラット可溶性 FcRn に対する EC_{50}（48.5 ± 0.74 nmol/L）は、ヒト（235 ± 26 nmol/L）及びサル（318 ± 31 nmol/L）の可溶性 FcRn よりも低く、ヒト IgG の各動物種の可溶性 FcRn に対する結合親和性と同じ傾向を示した。毒性試験に用いた動物種（ラット及びサル）の FcRn 受容体はどちらも十分な親和性で rFIXFc と結合することが示唆された。

2.2　*In vivo*試験

rFIXFc の *in vivo* での凝固活性を 2 種の血友病 B モデル動物（マウス及びイヌ）を用いて検討した。血友病 B マウスから採取した血漿での rFIXFc の凝固活性を BeneFIX と比較した（2.2.1 項）。

大型動物を用いた血友病Bモデルとして Chapel Hill コロニーの血友病Bイヌ［4］を使用し、rFIXFcの薬力学とPKを検討した。血友病Bイヌでは、rFIXFcの凝固活性をaPTTアッセイとWBCTアッセイの 2 通りの方法で求めるとともに、ELISA法により血漿中rFIXFc濃度を測定した（2.2.2 項）。

2.2.1　血友病Bマウスを用いた凝固活性試験

（試験番号 R-FIX-017、添付資料 4.2.1.1.3、評価資料）

rFIXFcとBeneFIXの凝固活性比較のため、血友病Bマウスを用いた薬力学試験を実施した。用いた血友病Bマウスは選択的遺伝子ターゲティングによりFIXを選択的に欠損させたC57BL/6 系マウスである［5］。これらのマウスは内因性FIX凝固活性を持たず、重症血友病Bのモデルとして頻用されている。血友病BマウスでのrFIXFcのPKパラメーターは薬力学との相関性を検討できるように活性を基準として解析した。凝固活性はクエン酸添加血漿を用いたaPTTにより測定した。血友病BマウスにrFIXFc又はBeneFIXを単回又は反復静脈内投与し、投与後の凝固活性を比較した。rFIXFc（219 IU/kg）及びBeneFIX（200 IU/kg）はいずれもリン酸緩衝生理食塩液に溶解し、0.2 mLを単回又は反復静脈内投与した。

単回投与試験では、rFIXFc 又は BeneFIX を静脈内投与し、rFIXFc 群は投与 30 分後並びに 8、24、48、72 及び 96 時間後に、BeneFIX 群は投与 15 分後並びに 8、24、48 及び 72 時間後に心穿刺により血液を採取し、血漿の凝固活性を測定した。各時点 3～4 匹のマウスを用いた。

反復投与試験では、第 0 日に rFIXFc 又は BeneFIX をそれぞれ 6 群（各群 4～5 匹）のマウスに静脈内投与した。投与 15 分後と 96 時間後、最初の 2 群から心穿刺により血液を採取し、血漿の凝固活性を測定した。投与 96 時間後（第 4 日）、初回投与を受けた残りの群に 2 回目の投与を行い、投与 15 分後と 96 時間後に採血した。初回投与 192 時間後（第 8 日）に 3 回目の投与を行い、同様に採血した。

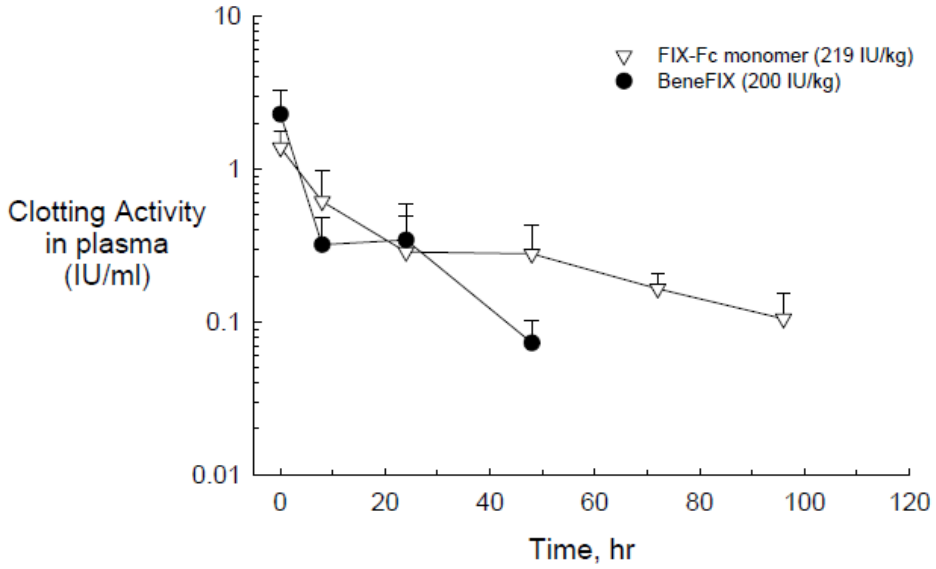
各 FIX 製剤の 3 回連続投与後の最高濃度（投与 15 分後）とトラフ濃度（投与 96 時間後）での凝固活性は、aPTT 法にて測定した。マウス血漿を用いた凝固一段法は aPTT 試薬（[redacted]、活性化セファロプラスチン試薬、[redacted]）及び rFIXFc 標準物質を用いて [redacted]（[redacted]）で測定した。

単回静脈内投与後の aPTT 法による凝固活性の結果を図 2 に示す。単回投与 24 時間後まで、rFIXFc 及び BeneFIX は同様の凝固活性を示した。投与 48 時間後、rFIXFc の凝固活性は高いままであったが、BeneFIX の凝固活性は低下した。また、投与 96 時間後でも rFIXFc の凝固活性は維持されていたが、投与 48 時間後より以降の測定点での BeneFIX の凝固活性は全ての動物で検出不能であった。

反復静脈内投与後の aPTT 法による凝固活性の結果を図 3 に示す。両 FIX 製剤とも投与 15 分後には凝固障害の改善作用が認められていた。しかし、投与 96 時間後では、rFIXFc 群で活性（約 0.1 IU/mL）が維持されていたのに対し、BeneFIX 群では全例で凝固活性が検出できなかった。同様の結果は、第 4 日と第 8 日の 2 回目及び 3 回目投与時にも確認された。これらの所見は、血友

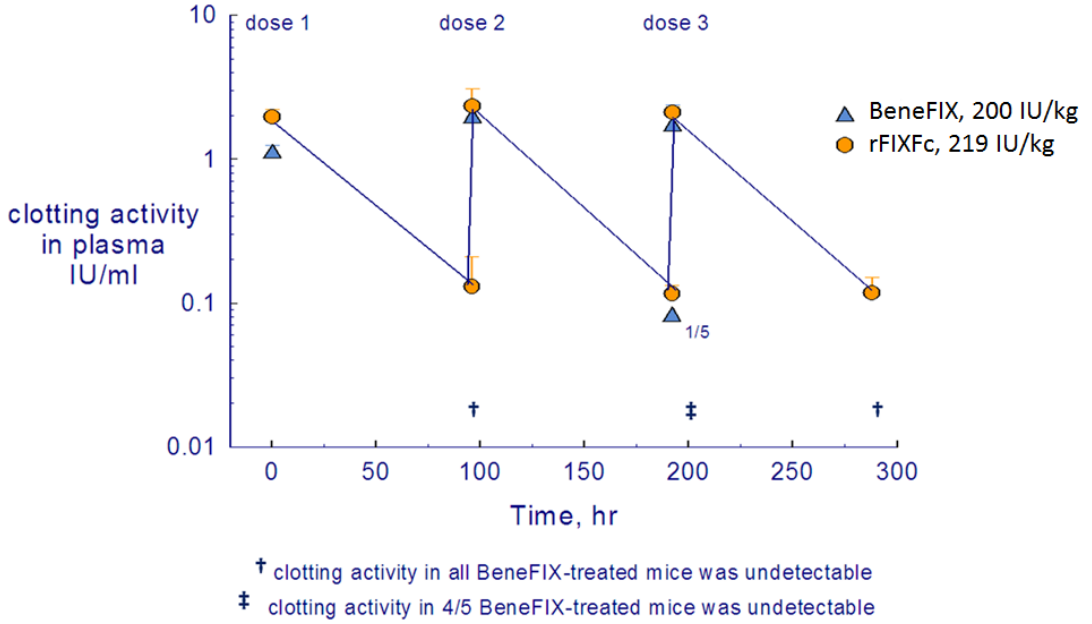
病 B マウスで血漿中 rFIXFc 及び BeneFIX の $t_{1/2}$（それぞれ 40 時間及び 13.2 時間）を比較した PK 試験（2.6.4.3.1.1.1.1 項）の結果とも整合する。

図 2　血友病Bマウスにおけるの凝固活性（aPTT）



［試験番号 R-FIX-017　Figure 1］

図 3　血友病Bマウスにおけるの凝固活性（aPTT）



［試験番号 R-FIX-017　Figure 2 を改変］

2.2.2　血友病 B イヌを用いた凝固活性試験

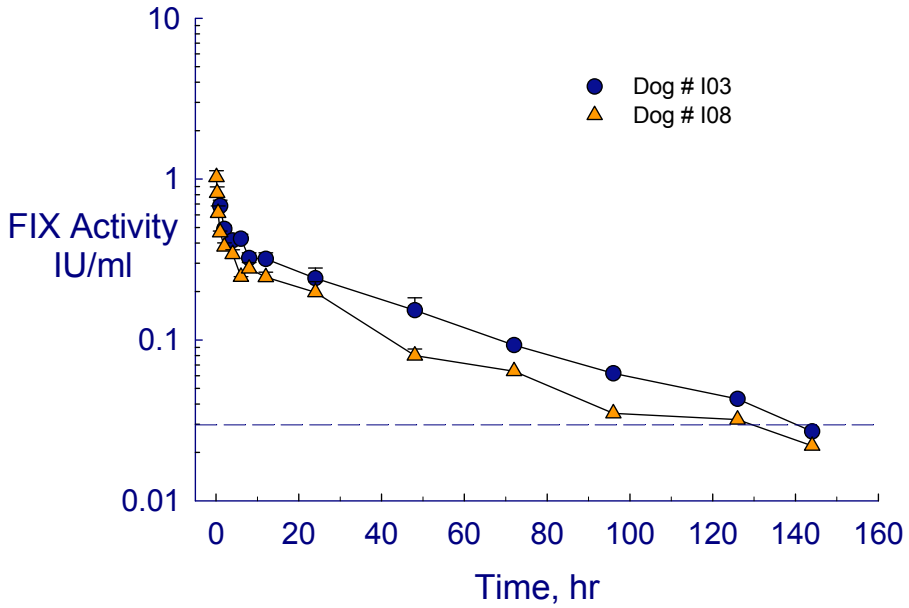
（試験番号 R-FIX-014、添付資料 4.2.2.2.5、評価資料）

大型動物を用いた血友病モデルとして Chapel Hill コロニーの血友病 B イヌ［4］を使用し、rFIXFc の凝固活性を検討した。2 匹（雌雄 1 匹ずつ）の血友病 B イヌに rFIXFc（135 又は 137 IU/kg）を単回静脈内投与し、投与前と投与 5、15 及び 30 分後並びに 1、2、4、6、8、12、24、27、30、48、51、54、72、80、96、126、144 及び 168 時間後に血液試料を採取した。試料は凝固活性測定及び rFIXFc 濃度測定用に処理した。

凝固活性は aPTT と WBCT の 2 通りの方法で測定し、定量的な aPTT 測定結果を半定量的な WBCT 測定結果と比較した。WBCT 測定では、各時点で血液試料を採取し、シリコンチューブ内のクロット形成を 30 秒ごとに観察し、クロット形成に必要な時間を測定した。

aPTT による凝固活性推移（図 4）は ELISA 法で求めた血漿中 rFIXFc 濃度推移と概ね一致した。[redacted]（[redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted]）を用いたノンコンパートメントモデルによる PK 解析の結果、rFIXFc の $t_{1/2}$は、aPTT による凝固活性から算出した平均値が約 38 時間、rFIXFc 濃度から算出した平均値が約 47 時間であった。これらの値は、同一モデルを用いて文献報告された BeneFIX の $t_{1/2}$（18.9～22.5 時間）に比べて長かった［6］。さらに、投与した rFIXFc 製剤の比活性を考慮して血漿中 rFIXFc 濃度から算出した凝固活性は、aPTT で直接測定した凝固活性と類似していた。試験結果の詳細は 2.6.4.3.1.3 項に記載している。

図 4　血友病 B イヌにおける rFIXFc の凝固活性（aPTT）



破線は正常 FIX レベルの 3%レベルを示している。

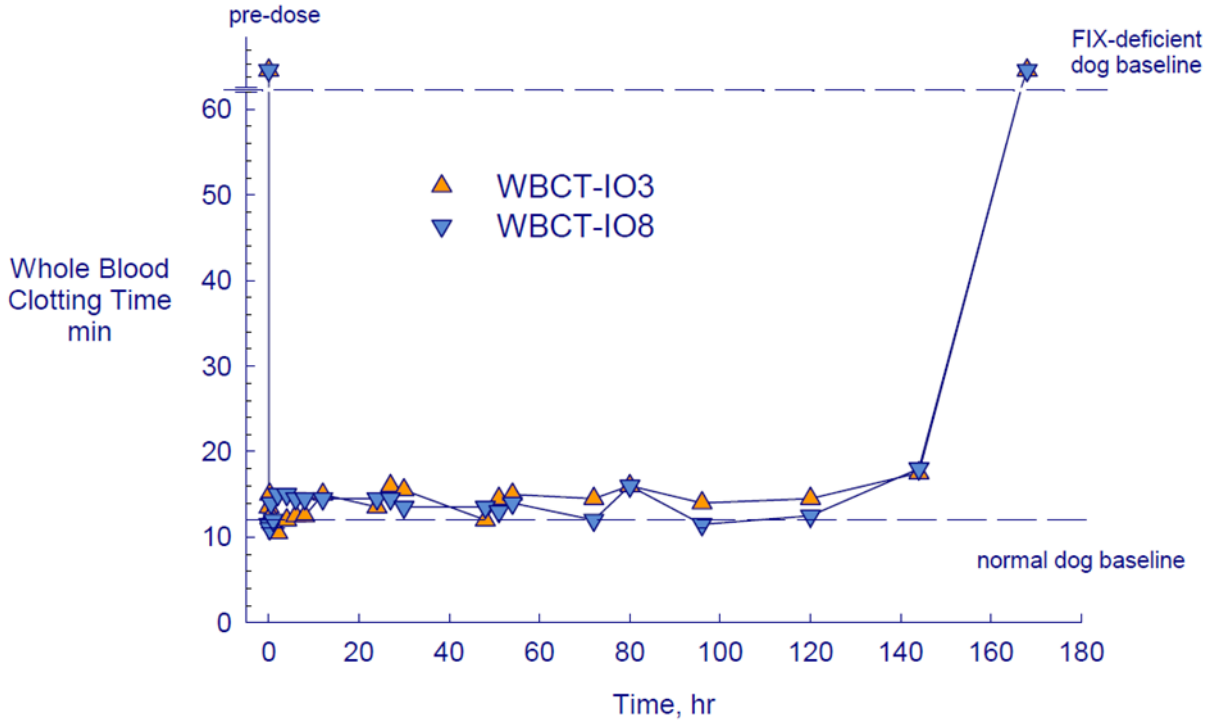
［試験番号 R-FIX-014　Figure 5 を改変］

WBCT による凝固活性を図 5 に示す。正常イヌの WBCT は 10～12 分であるのに対し、血友病 B イヌでは 60 分以上であった。2 匹の血友病 B イヌにおける WBCT は、rFIXFc の静脈内投与に

より正常レベルに改善し、rFIXFc 投与 144 時間後まで正常レベルをほぼ維持した後、投与 168 時間後に投与前レベルに戻った。

これらの aPTT 及び WBCT による凝固活性の測定結果から FIX 因子の活性レベルが正常の約 1%～3%以上であれば、WBCT は正常範囲に留まることが期待される。

図 5　血友病Bイヌにおける凝固活性（WBCT）



［試験番号 R-FIX-014　Figure 3］

2.2.3　血友病Bマウス出血モデルでのrFIXFcの効果

血友病 B 患者の出血コントロール及び出血予防に対する rFIXFc の効果を予測するため、血友病 B マウスを用いた薬力学試験を実施した。出血（急性出血の補充療法）モデル及び出血予防（定期補充療法）モデルの 2 つの出血モデルを用いて評価した。

2.2.3.1　尾切断出血モデルに対する止血効果

（試験番号 R-FIX-031-R1、添付資料 4.2.1.1.4、評価資料）

血友病Bマウスを用いた尾切断出血モデルにおけるrFIXFcの止血効果を検討した。血友病マウス尾切断出血モデルは、正常から重症の血友病の出血モデルとして広く用いられており、凝固因子補充療法としての効果を定量的に評価することができる［7］。本試験では、rFIXFcの効果をBeneFIXと比較した。

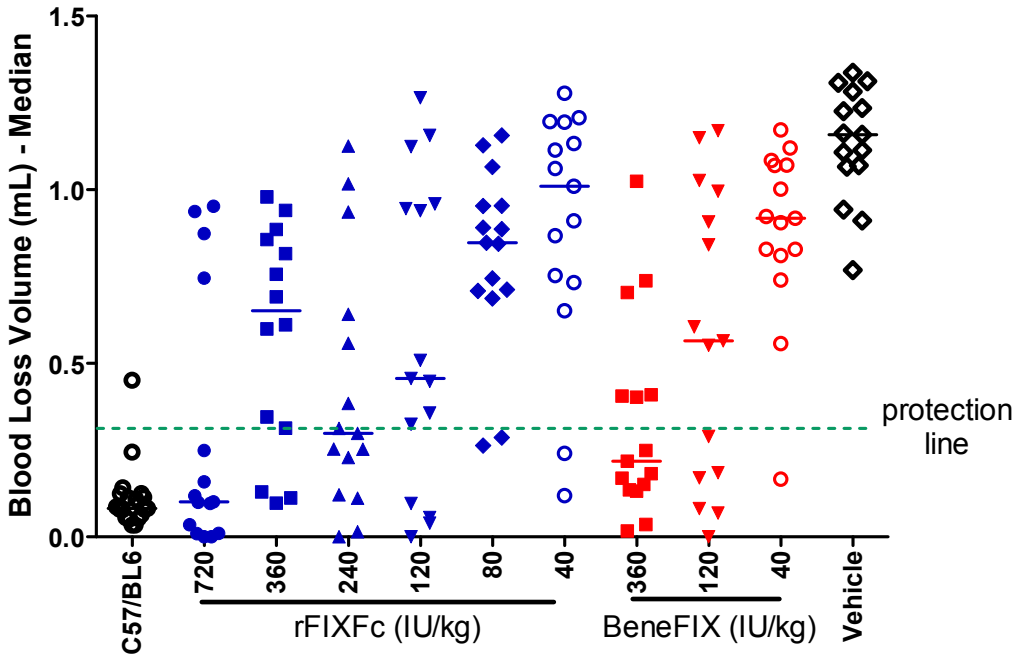
血友病 B マウスは 50 mg/kg ケタミン及び 0.5 mg/kg デクスメデトミジンによる麻酔後、体温を

維持するため温熱パッドの上に置いた。尾静脈を拡張させるために尾を 37°C の生理食塩液で 10 分間暖め、rFIXFc（40、80、120、240、360 及び 720 IU/kg、各群 20 匹）、BeneFIX（40、120 及び 360 IU/kg、各群 20 匹）又は溶媒（20 匹）を尾静脈に単回投与した。投与 5 分後、外科用メスで尾の先端 4 mm を切断した。出血する血液を 37°C 生理食塩液 13 mL 中に 30 分間回収し、総失血量を重量測定法により評価した。C57BL/6 マウス（18 匹）を対照群とした。

さらに、尾切断時に各群 5 匹を血漿 FIX 活性（aPTT）の確認に用いた。各個体の総失血量、各群の失血量中央値及び出血予防率を本試験のエンドポイントとした。

尾切断時、rFIXFc 及び BeneFIX の血漿 FIX 活性はそれぞれの同用量群で同程度であった。rFIXFc、BeneFIX 及び溶媒を投与した血友病 B マウスの失血量を図 6 に示す。

図 6　血友病 B マウス尾切断出血モデルでの失血量

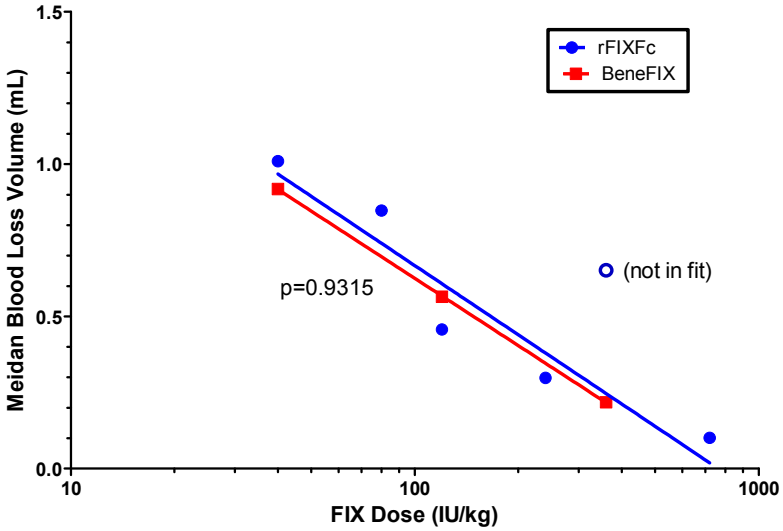


［試験番号 R-FIX-031-R1　Figure 2］

図中の“protection line”は、正常失血量閾値を表している。正常失血閾値は、尾切断した C57BL/6 マウスの平均失血量（0.109 mL）に標準偏差（0.101 mL）の 2 倍を加算し、0.311 mL と算出した。血友病 B マウスの失血量がこの閾値以下の場合、出血を防止したとみなした。rFIXFc 720、360、240、120、80 及び 40 IU/kg を投与した群の失血量中央値はそれぞれ 0.101、0.651、0.298、0.457、0.847 及び 1.010 mL であり、出血防止できた個体の割合（出血防止率）はそれぞれ 73%、29%、60%、27%、13%及び 13%であった。BeneFIX 360、120 及び 40 IU/kg を投与した群の失血量中央値はそれぞれ 0.218、0.564 及び 0.918 mL であり、出血予防率はそれぞれ 60%、40%及び 6.7%であった。全ての FIX 製剤投与群では、溶媒投与群と比較して有意に出血量が抑制された（one-way ANOVA with Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$)）。同用量の rFIXFc と BeneFIX の失血量は、同程度であった。

用量（log_{10}）と失血量（中央値）をプロットした直線を図 7 に示す。また、用量（log_{10}）と出血防止率（%）をプロットした直線を図 8 に示す。

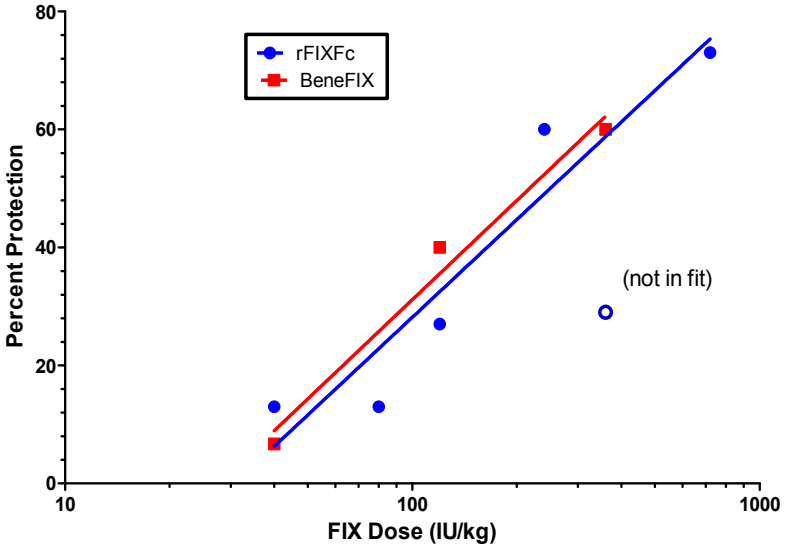
図 7　血友病 B マウス尾切断出血モデルにおける rFIXFc 及び BeneFIX の
用量－失血量（中央値）直線



注：not in fit と表示した点は回帰直線に含めていない

［試験番号 R-FIX-031-R1　Figure 3］

図 8　血友病 B マウス尾切断出血モデルにおける rFIXFc 及び BeneFIX の
用量－出血防止率直線



注：not in fit と表示した点は回帰直線に含めていない

［試験番号 R-FIX-031-R1　Figure 4］

溶媒投与群と比較して、rFIXFc 及び BeneFIX は血友病 B マウス尾切断出血モデルの失血量を

有意に減少させ、出血予防率を上昇させた。検討した用量範囲（rFIXFc は 40～720 IU/kg、BeneFIX は 40～360 IU/kg）で、両 FIX 製剤は失血量中央値及び出血予防率において類似の止血作用を示した。rFIXFc 及び BeneFIX は血友病 B マウス尾切断後の出血を同程度、用量依存的に抑制したことから、両 FIX 製剤は出血に対して同様の効果を示すことが示唆される。以上の結果より、rFIXFc は血友病 B 患者の出血エピソードに対する BeneFIX の効果と同程度の作用が期待される。

2.2.3.2　尾静脈切断モデルに対する出血予防効果

（試験番号 R-FIX-032-R1、添付資料 4.2.1.1.5、評価資料）

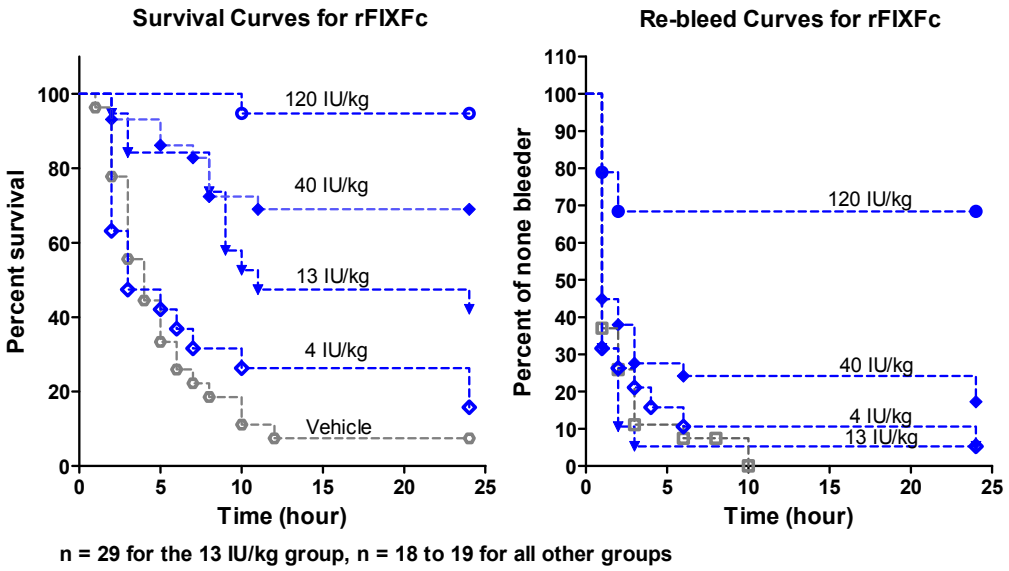
血友病Bマウス尾静脈切断（Tail Vein Transection: TVT）モデルを用いて、rFIXFcの出血予防効果を評価し、ベネフィクスと比較した。TVTモデルは重症血友病患者での静脈出血を模倣したものであり、FIX補充療法の効果を定量的に評価するために用いられる［8］。

TVT は以下の手順で行った。血友病 B マウスを 50 mg/kg ケタミン／0.125 mg/kg デクスメデトミジン／0.1 mg/kg ブプレノルフィンで麻酔し、TVT 開始時にはデクスメデトミジンの作用を抑制するため 1 mg/kg アチパメゾールを投与した。適切な深度の麻酔下で尾の直径が約 3.0 mm の場所の外側尾静脈を外科用メスで切断した。その後、尾を素早く 37°C の生理食塩液を含むチューブに入れ、チューブを回しながら血液を洗い流した。出血が止まったら、白い紙の床敷きを敷いたケージにマウスを戻した。

4 用量（4、13、40 及び 120 IU/kg）の rFIXFc 及び BeneFIX をそれぞれ TVT の 72 及び 24 時間前にマウスに単回静脈内投与した。TVT 後、最初の出血が止まってから 24 時間後まで創傷を観察することにより再出血頻度を評価した。rFIXFc の 4 用量（120、40、13 及び 4 IU/kg）は、TVT 時の正常 FIX 血漿濃度のそれぞれ 9%、3%、1%及び 0.3% FIX 活性に相当する。

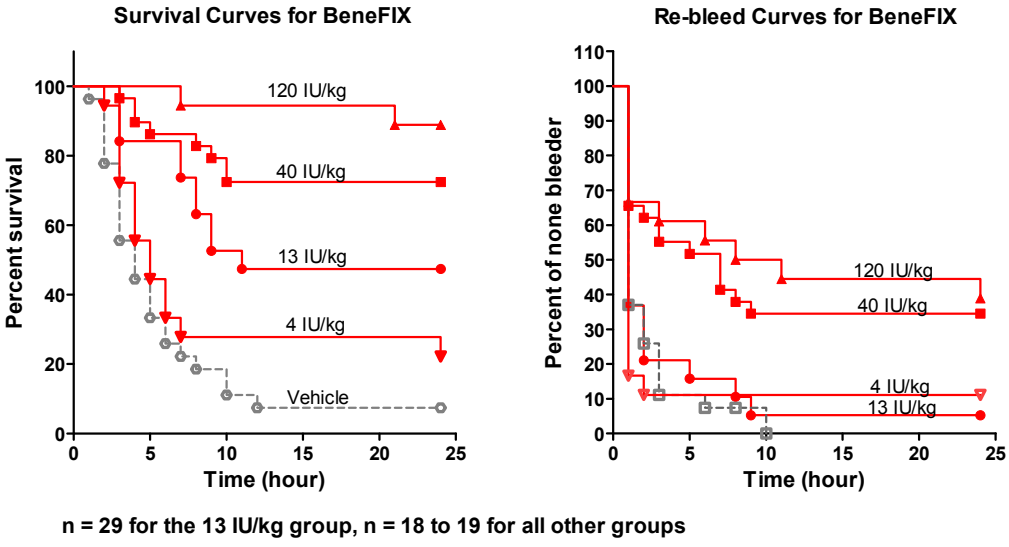
TVT 72 時間前に投与した rFIXFc 投与群の再出血予防率及び生存率の時間推移を図 9 に示す。また、TVT 24 時間前に投与した BeneFIX 投与群の再出血予防率及び生存率推移を図 10 に示す。

図 9　rFIXFc による血友病 B マウス TVT モデルの生存率及び再出血予防率
（TVT 72 時間前投与）



［試験番号 R-FIX-032-R1　Figure 1］

図 10　BeneFIX による血友病 B マウス TVT モデルの生存率及び再出血予防率
（TVT 24 時間前投与）

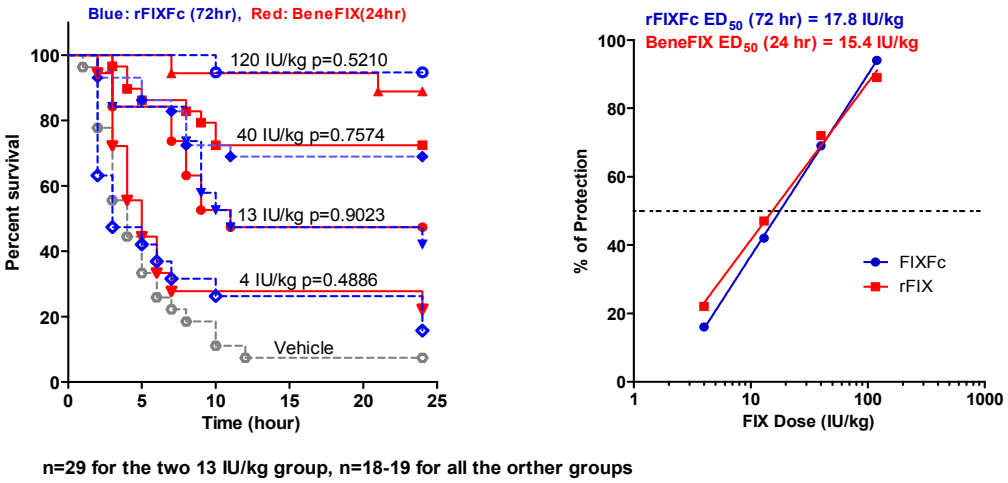


［試験番号 R-FIX-032-R1　Figure 2］

TVT 72 時間前に投与した rFIXFc 投与群の TVT 24 時間後の生存率は、用量 4、13、40 及び 120 IU/kg でそれぞれ 16%、42%、69%及び 96%、また再出血予防率はそれぞれ 5%、5%、17%及び 67%であった。TVT 24 時間前に同用量の BeneFIX を投与したマウスの TVT 24 時間後の生存率はそれぞれ 22%、57%、72%及び 89%、再出血予防率は 11%、5%、24%及び 39%であった。

両 FIX 製剤とも 2 低用量（4 及び 13 IU/kg）投与群の再出血予防効果は限定的であったため、生存率のデータのみを統計解析に使用した。まず、同用量の両 FIX 製剤の生存曲線を log-rank (Mantel-COX) test により比較したところ、全ての用量群で有意差はなく（$p > 0.05$）、TVT 72 時間前に投与した rFIXFc と 24 時間前に投与した BeneFIX の効果は同程度であることが示された（図 11）。この結果から、血友病 B マウス TVT モデルに対する rFIXFc の出血予防効果は約 3 倍持続することが示唆される。次に、TVT 24 時間後生存率の用量反応直線をプロットし、両 FIX 製剤の 50%有効用量（ED_{50}）を算出した。TVT 72 時間前に投与した rFIXFc の ED_{50} は 17.8 IU/kg、TVT 24 時間前に投与した BeneFIX の ED_{50} は 15.4 IU/kg であり、rFIXFc の血友病 B マウスに対する出血予防効果は BeneFIX と比較して約 3 倍長く持続することが示唆された（図 11）。

図 11　rFIXFc（72 時間前投与）及び BeneFIX（24 時間前投与）による血友病 B マウス TVT モデルの生存率比較

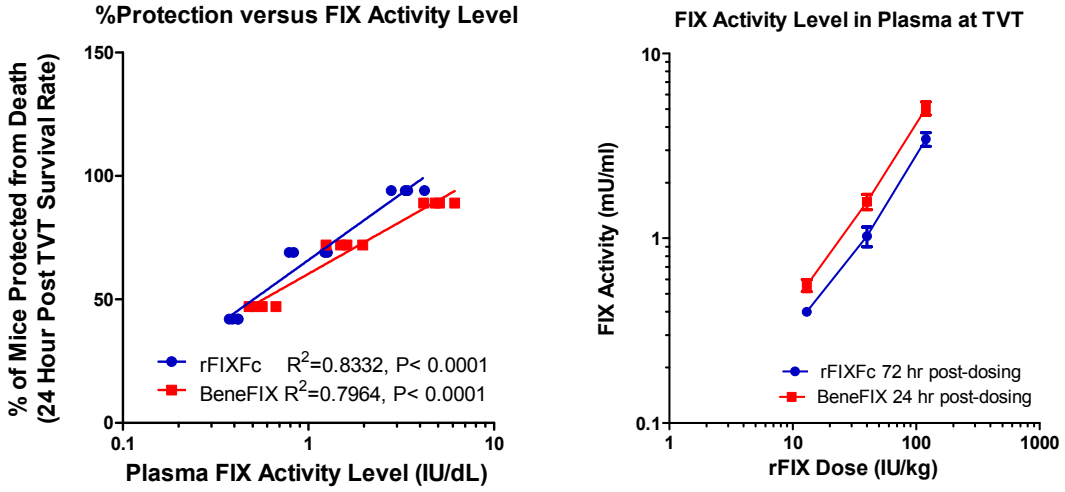


n=29 for the two 13 IU/kg group, n=18-19 for all the orther groups

［試験番号 R-FIX-032-R1　Figure 3］

TVT 時の血漿 FIX 活性を測定するため、各群 4 匹から採取した血漿試料で aPTT 測定を行った。測定結果を TVT 時の rFIXFc 及び BeneFIX 血漿濃度（FIX 活性）と出血予防効果（生存率）との相関性を調べるために用いた（図 12）。両 FIX 製剤の相関分析から、どちらも TVT 後の血友病 B マウス生存率は血漿濃度との強い相関が認められた（rFIXFc：r^2=0.8332、BeneFIX：r^2=0.7964、いずれも $p < 0.0001$）。この結果は、血漿 FIX 活性から出血予防効果を予測することが可能であることを示唆している。

図 12　FIX 製剤による出血予防効果と TVT 時血漿濃度との相関関係



［試験番号 R-FIX-032-R1　Figure 4］

［小括］

In vitro での凝固活性の検討結果（2.1 項）から予測されたように、出血モデルに対する rFIXFc の止血作用は BeneFIX と同程度であった（2.2.3.1 項）。出血予防モデルにおいて、生存率 ED_{50} による評価で rFIXFc は BeneFIX よりも約 3 倍長い予防効果を示し（2.2.3.2 項）、この結果は血友病 B マウスを用いた薬力学試験で認められた rFIXFc の持続的な凝固活性（2.2.1 項）と一致していた。

2.3　製剤間の凝固活性比較

rFIXFc と BeneFIX の開発中の製剤変更後の凝固活性比較のため、血友病 B マウスを用いた薬力学試験を実施した。凝固活性はクエン酸添加血漿を用いた aPTT 又はクエン酸添加全血を用いた ROTEM により測定した。

2.3.1　凍結液剤及び凍結乾燥剤の凝固活性比較（aPTT）

（試験番号 R-FIX-027、添付資料 4.2.2.7.1、評価資料）

血友病 B マウスを用いて、rFIXFc の凍結液剤及び凍結乾燥剤（[redacted] L 製剤）を比較する単回静脈内投与試験を実施した。各時点 4 匹（雌雄 2 匹ずつ）のマウスに 200 IU/kg の rFIXFc 製剤を投与し、両製剤の凝固活性を比較検討した。rFIXFc 投与 0.25、8、24、48、72 及び 96 時間後に血液試料を採取し、凝固一段法による aPTT 測定により凝固活性を求めた。

凍結液剤投与後と凍結乾燥剤投与後の最高血漿中濃度（C_{max}）の平均値±標準偏差は、それぞれ 1.20 ± 0.70 IU/mL 及び 1.44 ± 0.31 IU/mL とほぼ同じであった。また、投与 96 時間後の血漿中 rFIXFc 濃度も凍結液剤と凍結乾燥剤で概ね一致した（それぞれ 0.05 ± 0.02 IU/mL 及び

0.05 ± 0.01 IU/mL）。

2.3.2　[redacted] L及び [redacted] L製剤の凝固活性比較（aPTT及びROTEM）

（試験番号 N-FIX-010-R1、添付資料 4.2.1.1.6、評価資料）

血友病 B マウスを用いて、凍結乾燥剤（[redacted] L 製剤及び [redacted] L 製剤）の薬理活性を比較する単回静脈内投与試験を実施した。本試験では、クエン酸添加血漿を用いた凝固一段法（aPTT 測定）又はクエン酸添加全血を用いた ROTEM により凝固活性を測定した。rFIXFc（[redacted] L 製剤及び [redacted] L 製剤）は 50 IU/kg を、対照として BeneFIX は 100 IU/kg をそれぞれ血友病 B マウスに投与した。

aPTT 測定法による凝固活性比較試験では、投与 5 分後に BeneFIX（0.64 ± 0.024 IU/mL）は同程度の活性を示した両 rFIXFc 製剤（[redacted] L 製剤及び [redacted] L 製剤それぞれ 0.21 ± 0.013 及び 0.18 ± 0.046 IU/mL）よりも高い凝固活性を示したが、BeneFIX の用量は rFIXFc よりも高いことから、予想通りの結果であった。一方、投与 72 時間後の BeneFIX（0.0042 ± 0.0012 IU/mL）の凝固活性は、同程度の活性を示した両 rFIXFc 製剤（[redacted] L 製剤及び [redacted] L 製剤それぞれ 0.012 ± 0.00092 及び 0.016 ± 0.0013 IU/mL）よりもはるかに下回った。以上の結果より、rFIXFc は BeneFIX の半分の用量にもかかわらず、BeneFIX より持続的な凝固活性を示した。

ROTEM による比較試験では、投与 5 分後から 216 時間後までの特定した時点で採血し、クエン酸添加全血のカルシウム存在下で凝固時間、クロット形成時間及び α 角度を測定した。これらのパラメーターに関して、C57BL/6 マウスを用いて正常範囲を、未処置血友病 B マウスを用いて血友病の範囲をそれぞれ決定した。血液試料は採取 5 分以内に ROTEM による分析を行った。

ROTEM による凝固活性は、全ての測定時点において、[redacted] L 製剤及び [redacted] L 製剤で同程度であった。BeneFIX と比較して、投与 5 分後では両 rFIXFc 製剤は全てのパラメーターに対して同程度の活性を示したが、72 時間後では、BeneFIX の半分の用量であるにもかかわらず全てのパラメーターに対してより持続的な活性を示した。ROTEM による両製剤の持続的な凝固活性は、aPTT 測定で認められた持続的活性と整合していた。

3.　副次的薬理試験

rFIXFc は、血友病 B 患者での欠損又は機能不全 FIX の補充療法に用いるため、正常の凝固カスケードに対する rFIXFc の影響に関する副次的薬理試験は実施していない。

4.　安全性薬理試験

心血管系、呼吸器系又は中枢神経系に対する rFIXFc の影響を検討するための独立した安全性薬理試験は実施していない。rFIXFc は IgG_1 の Fc 領域に FIX を結合させた Fc 融合タンパク質である。FIX は血友病 B 患者に対する補充療法として豊富な臨床経験がある。また、Fc 領域は多く

の抗体医薬を含む様々な医薬品で使用されている。さらに、臨床用量での rFIXFc 血漿中濃度は内因性 IgG_1 の血漿中濃度と比較してはるかに低いことから、rFIXFc の Fc 領域による望ましくない作用が生じるとは考え難い。以上の理由から、安全性薬理試験は実施不要と判断した。

実施した毒性試験の観察項目に安全性薬理試験に該当する項目が含まれている。臨床用量の 10 倍に相当する 1000 IU/kg までの投与量で実施したラット 4 週間反復投与毒性試験（試験番号 N102010）並びにサルでの 5 週間（試験番号 N102011）及び 27 週間（試験番号 N102015）投与毒性試験での rFIXFc の忍容性は良好であり、中枢神経系及び呼吸器系への作用を示唆する一般状態の変化は認められていない。サル反復投与毒性試験では、いずれの試験でも心電図への影響は観察されなかった（2.6.6.3 項）。また、ウサギ Wessler うっ血血栓症モデル（試験番号 N102013 及び N102018-B）を用いて rFIXFc の血栓形成能を評価する 2 試験を実施した（2.6.6.8 項）。その結果、rFIXFc 投与群の平均血栓形成スコアは凍結液剤、凍結乾燥剤のいずれも生理食塩液群及び溶媒対照群と類似し、Wessler うっ血血栓症モデルの結果から rFIXFc の血栓形成リスクは低いと判断された。

5.　薬力学的薬物相互作用試験

生物学的製剤が低分子化合物のチトクローム P450 及び他の肝臓の酵素による代謝に影響を与えるとは考えにくく、生物学的製剤において薬物相互作用が生じるとは考えられないことから、薬物相互作用試験は実施していない。

6.　考察及び結論

rFIXFc は、血友病 B に対して定期補充療法、急性出血の補充療法又は周術期の補充療法に適用するために開発された長時間作用型 FIX 製剤である。

テンナーゼ複合体形成を利用した様々な *in vitro* 試験において、リン脂質表面との親和性、テンナーゼ複合体形成能、ATIII による不活化などを含む凝固カスケードの構成成分との相互作用に関して rFIXFc と BeneFIX は同程度であることが明らかとなった。rFIXFc の比活性はモル基準で BeneFIX の約半分であったが、既存の FIX 製剤と同様、患者には効力（IU）を基準に rFIXFc を投与するためこの比活性差による影響はないと考えられる。

In vivo 試験では、rFIXFc は BeneFIX と比較して PK の改善とともに、その薬力学的作用も改善されていることが示唆された。rFIXFc は、血友病 B マウス及び血友病 B イヌのモデルで同用量の BeneFIX と同程度の止血効果を示したが、作用持続時間は BeneFIX より長かった。血友病 B マウスを用いた出血モデルに対する rFIXFc の効果は BeneFIX と同程度であったが、出血予防モデルでは rFIXFc は BeneFIX よりも 3 倍長い予防効果を示した。以上のように、出血エピソードに対する rFIXFc の効果は BeneFIX と同程度であったが、BeneFIX と比較して持続した出血予防作用を示した。また、rFIXFc 及び BeneFIX を用いた血友病 B マウス TVT モデルでの試験結果から凝固一段法による血漿 FIX 活性を用いて効果を予測できることが示唆された。

血友病 B マウスを用いた試験で、rFIXFc の凍結液剤と凍結乾燥剤は同様に持続した凝固活性（aPTT）を示した。rFIXFc の [redacted] L 製剤及び [redacted] L 製剤の凝固活性（ROTEM）は BeneFIX と同程度であったが、BeneFIXと比較して持続的な凝固活性を示した。これらの薬力学試験結果から、GLP 毒性試験及び臨床試験で用いられた異なる製造工程による rFIXFc の類似性が示された。

2 つの血友病 B 動物モデルを用いた薬力学試験で、rFIXFc は BeneFIX と比較して持続的な凝固活性を示した。rFIXFc の持続的な凝固活性は、血友病 B マウス出血モデルの生存率改善と関連していた。以上の *in vitro* 及び *in vivo* 薬力学試験の結果は、rFIXFc の臨床開発・製造承認をサポートするものと考えられる。

7.　引用文献

1　Bitonti AJ, Dumont JA, Low SC, et al. Pulmonary delivery of an erythropoietin Fc fusion protein in non-human primates through an immunoglobulin transport pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:9763-9768.（添付資料 4.3.16）

2　Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ, Brown AC, Akilesh S, Jung N, Petkova S, Avanessian L, Choi EY, Shaffer DJ, Eden PA, Anderson CL. The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs. J Immunol. 2003 Apr 1;170(7):3528-33.（添付資料 4.3.20）

3　Peters RT, Low SC, Kamphaus GD, Dumont JA, Amari JV, Lu Q, Zarbis-Papastoitsis G, Reidy TJ, Merricks EP, Nichols TC, Bitonti AJ. Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein. Blood. 2010 Mar 11;115(10):2057-64.（添付資料 4.3.11）

4　Evans JP, Brinkhous KM, Brayer GD, Reisner HM, High KA.Canine hemophilia B resulting from a point mutation with unusual consequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1989 Dec;86(24):10095-9.（添付資料 4.3.18）

5　Lin HF, Maeda N, Smithies O, Straight DL, Stafford DW. A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. Blood. 1997 Nov 15;90(10):3962-6.（添付資料 4.3.19）

6　Brinkhous KM, Sigman JL, Read MS, Stewart PF, McCarthy KP, Timony GA, Leppanen SD, Rup BJ, Keith JC Jr, Garzone PD, Schaub RG. Recombinant human factor IX: replacement therapy, prophylaxis, and pharmacokinetics in canine hemophilia B. Blood. 1996 Oct 1;88(7):2603-10.（添付資料 4.3.5）

7　Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, Sakorafas P, Fraley C, Drager D, Reidy T, McCue J, Franck HW, Merricks EP, Nichols TC, Bitonti AJ, Pierce GF, Jiang H. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. Blood. 2012 Mar 29;119(13):3024-30.（添付資料 4.3.17）

8　Pan J, Liu T, Kim JY, Zhu D, Patel C, Cui ZH, Zhang X, Newgren JO, Reames A, Canivel D, Jesmok G, Pierce GF, Sommer JM, Jiang H. Enhanced efficacy of recombinant FVIII in noncovalent complex with PEGylated liposome in hemophilia A mice. Blood. 2009 Sep 24;114(13):2802-11.（添付資料 4.3.4）