イデルビオン静注用 250
イデルビオン静注用 500
イデルビオン静注用 1000
イデルビオン静注用 2000

2.4　非臨床試験の概括評価

CSL ベーリング株式会社

目次

略語・略号一覧 3
2.4.　非臨床試験の概括評価 4
2.4.1.　非臨床試験計画概略 4
2.4.2.　薬理試験 5
2.4.3.　薬物動態試験 6
2.4.4.　毒性試験 7
2.4.5.　総括及び結論 11
2.4.6.　参考文献一覧 13

表目次

表 2.4-1：　薬理試験一覧 6
表 2.4-2：　薬物動態試験一覧 7
表 2.4-3：　毒性試験一覧 9
表 2.4-4：　ヒトの単回投与後、並びにラット及びサルの反復投与後に観察された rIX-FP の AUC 及び Cmax 10

略語・略号一覧

略語・略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
ADA	Anti-drug-antibody	抗薬物抗体
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 plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to the last sample with quantifiable drug concentration	0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0\rightarrow\infty}$	AUC extrapolated to infinity	0 時間から無限時間までの血中濃度曲線下面積
cDNA	Complementary DNA	相補的デオキシリボ核酸
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
FVIIa/TF	Activated coagulation factor VII/Tissue Factor	活性化血液凝固第 VII 因子／組織因子
FIX	Coagulation factor IX	血液凝固第 IX 因子
FXIa	Activated coagulation factor XI	活性化血液凝固第 XI 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
IU	International units	国際単位
KO	Knock out	ノックアウト
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NZW	New Zealand White	－
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
rFIX	Recombinant human coagulation factor IX	遺伝子組換えヒト血液凝固第 IX 因子
rIX-FP	Recombinant human coagulation factor IX fused to human albumin	遺伝子組換えヒト血液凝固第 IX 因子－アルブミン融合タンパク質（CSL654）
SD	Sprague Dawley	－
$t_{1/2}$	Terminal half-life	半減期
WBCT	Whole blood clotting time	全血凝固時間

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1　非臨床試験計画概略

血友病 B は血液凝固第 IX 因子（FIX）の欠損から生じる出血性疾患で、X 染色体に連鎖して劣性遺伝することが知られている。血友病 B の症状・徴候は、凝固因子欠乏の程度及び出血の部位により様々である。そのため、自然発生又は外傷により誘発される関節、筋肉及び組織内への出血が特徴的である。しかし、血友病 B は FIX 補充療法により十分に止血管理が可能である。

FIX は肝臓で産生されるタンパク質であり、内因系及び外因系の両凝固経路において血栓形成に極めて重要である。外因系経路では、活性化第 VII 因子／組織因子（FVIIa/TF）複合体により FIX が活性化される。内因系経路では、活性化第 XI 因子（FXIa）により FIX が活性化される。活性化された FIX は、活性化第 VIII 因子（FVIII）と共に第 X 因子（FX）を活性化する。このようなカスケードの結果、最終的にプロトロンビンがトロンビンに転換される。次いで、トロンビンがフィブリノゲンをフィブリンに転換して血栓を形成する。

血友病治療の目的は、出血を治療あるいは防止して関節及び組織の損傷を軽減することにより、患者の生活の質を改善することである。FIX 補充療法により、凝固因子の欠乏と出血傾向を一時的に是正することができる。遺伝子組換え第 IX 因子（rFIX）など FIX 製剤は半減期（$t_{1/2}$）が 1 日に満たないことから、出血事象の予防療法には週 2、3 回の投与が必要である。

rIX-FP は、チャイニーズ・ハムスター卵巣（CHO）細胞で産生される精製されたヒト遺伝子組換えタンパク質であり、$t_{1/2}$ を延長するためヒト FIX にヒトアルブミンを遺伝子融合して生成される。ヒト FIX の相補的デオキシリボ核酸（cDNA）とヒトアルブミンの cDNA をクローンし、rIX-FP を産生するために、2 つの cDNA を FIX 由来のリンカー配列を用いて結合した。ヒト FIX とヒトアルブミンの間のリンカー配列は、FIX 活性化に関与する内因性 FIX の配列に由来し、融合タンパクの切断は FIX 活性化と同じ酵素（FXIa 又は FVIIa/TF）により行われる。ヒトアルブミン融合技術の利点は、未変化のヒト FIX を遺伝子組換えヒトアルブミンに融合して同時に発現できることである。

rIX-FP の非臨床試験として、以下の試験を実施した（表 2.4-1、表 2.4-2 及び表 2.4-3 参照）。

各種動物の血漿を使用した *in vitro* 試験、血友病 B イヌ及び FIX ノックアウト（KO）マウスを用いた *in vivo* 試験により、rIX-FP の薬力学的作用を検討した。

ラットを用いて呼吸系の安全性薬理試験を実施した。また、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において、循環器系及び中枢神経系に及ぼす影響を評価した。

サル及び血友病 B イヌを用いて rIX-FP の薬物動態試験を実施し、ラットを用いて rIX-FP の生体内分布試験を実施した。ラット及びサルを用いて単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験を実施した。

ウサギを用いて局所刺激性試験を実施し、さらに、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験において局所刺激性について検討した。

遺伝毒性について評価するため 2 種の *in vitro* 試験、細菌を用いる復帰突然変異試験（AMES 試験、Ames et al., 1975、Maron et al., 1983）、並びに、培養ヒトリンパ球を用いる染色体異常試験（Heddle et al., 1970、Scott et al., 1990）を実施した。

ウサギを用いた Wessler モデルの変法（Wessler et al., 1955、Giles et al., 1980）により、rIX-FP の血栓形成性を検討した。

なお、非臨床試験で使用した製剤について、パイロットスケール（[redacted]L）の原体は、CSLB 社のオーストラリア Parkville の施設で製造した。実生産スケール（[redacted]L）の原体は、[redacted]（米国、[redacted]）で中間体まで製造し、CSLB 社のドイツ Marburg の施設で精製して最終製剤を製造した。

2.4.2　薬理試験

表 2.4-1 に実施した薬理試験の一覧を示す。効力を裏付ける試験としては、初めに試験系として薬理学的に適切な動物種を確認するため、rIX-FP を添加した血漿を用いた *in vitro* 試験を実施した。血漿中の rIX-FP 濃度が増加するに伴い血液凝固パラメーターの活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）が短縮したことに示されるように、サル、ラット及びウサギで rIX-FP の薬理活性が確認された。

さらに、FIX 欠損動物モデルを用いた *in vivo* 試験を実施した。FIX 欠損マウス及びイヌはヒトの血友病患者と同様の凝固系機能不全がみられ、血友病 B 患者と同様の出血事象の増加も認められる。

FIX 欠損マウスに rIX-FP を 50、100 及び 200 IU/kg の用量で静脈内投与した結果、対照群と比べて有意かつ用量依存的な総失血量の減少、止血時間及び aPTT の短縮が認められた。

血友病 B イヌに rIX-FP 又は市販の遺伝子組換えヒト FIX 製剤［ベネフィクス®、ノナコグアルファ（遺伝子組換え）、以下 BeneFIX®と記載］を、100 IU/kg の用量で単回静脈内投与した。その後、薬力学［aPTT 及び全血凝固時間（WBCT）］評価、並びに薬物動態パラメーターの評価（2.4.3 項、参照）のため血液試料を採取した。その結果、rIX-FP の投与により aPTT 及び WBCT の短縮が認められた。

安全性薬理試験では、rIX-FP 投与が呼吸機能に及ぼす影響を検討した。本試験はプレチスモグラフィーによる呼吸系パラメーターの検査で、標準的に使用される覚醒ラットを用いて実施した。rIX-FP の投与により、呼吸系パラメーター（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 500 IU/kg 以上と考えられた。

サルを用いた反復投与毒性試験において、rIX-FP の心血管系に及ぼす影響を評価した。心電図、血圧及び心拍数に rIX-FP 投与の影響は認められなかった。

ラット及びサルの単回投与毒性試験、並びにラット及びサルの反復投与毒性試験において、一般症状、剖検所見及び病理組織学的検査に基づき、rIX-FP の中枢神経系に及ぼす影響を評価した（CTD 2.6.6 項、参照）。いずれの試験においても中枢神経系への影響を示すと考えられる、被験物質の投与に関連した変化は認められなかった。

表 2.4-1：　薬理試験一覧

試験の種類／動物種・系統	投与期間／経路	投与量	性／動物数	試験番号	GLP適用
aPTT に及ぼす影響／ヒト、カニクイザル、ラット、ウサギ血漿	*In vitro*	0, 0.5, 1.0, 1.5 及び 2.0 IU/mL	–	IVX 01/09	非適用
薬力学的試験（aPTT 及び WBCT）／イヌ（血友病 B モデル）	単回／静脈内	100 IU/kg	雄 2、雌 1（rIX-FP） 雌 2（BeneFIX®）	040200011	非適用
止血効果に関する試験／FIX KO マウス	単回／静脈内	0, 50, 100 及び 200 IU/kg	雄 7～8 雌 7～8	NBM 04/09	非適用
凝固効果に関する試験／FIX KO マウス	単回／静脈内	0, 50, 100 及び 200 IU/kg	雄 0～10 雌 5～14	NBM 05/09	非適用
安全性薬理試験（呼吸系パラメーター評価）／ラット（[redacted] (SD)）	単回／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg	雄 8	APQ0003	適用
反復投与毒性試験（安全性薬理評価）／カニクイザル	4 週間／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg/day	雄 4、雌 4	APQ0001	適用

注：中枢神経系に及ぼす影響は、ラット（試験番号 APQ0005）及びカニクイザル（試験番号 APQ0007）の単回投与毒性試験、並びにラット（試験番号 APQ0009 及び APQ0021）及びカニクイザル（試験番号 APQ0001）の反復投与毒性試験において、一般状態観察、剖検及び病理組織学的検査に基づき評価した。いずれの試験においても、被験物質に関連した中枢神経系への影響を示す変化は認められなかった。

2.4.3　薬物動態試験

サルを用いた薬物動態試験（表 2.4-2、参照）では、rIX-FP を 50 及び 100 IU/kg の投与量で静脈内投与した。rIX-FP の薬物動態は用量に比例した変化がみられ、性差はみられなかった。血漿中 $t_{1/2}$ は平均 42.2 時間であり、これは他の遺伝子組換えヒト FIX 製剤の $t_{1/2}$（12.7 時間、Mc Carthy et al., 2002）の 3 倍を超える値であった。本薬物動態試験における免疫原性検査では、ヒト FIX あるいはヒトのアルブミンに対する抗体産生は認められなかった。

血友病 B イヌを用いた薬物動態試験では、rIX-FP 又は市販の遺伝子組換えヒト FIX 製剤 BeneFIX®を 100 IU/kg の投与量で単回静脈内投与した。その結果、rIX-FP の薬物動態は C_{max} 及び AUC が BeneFIX®より高く、優れていた。rIX-FP 及び BeneFIX®はいずれも、血友病 B イヌで抗体反応を誘発した。

ラット及びサルを用いた単回及び反復投与毒性試験において、トキシコキネティクス測定を実施した。

FIX の体内分布及びその分布に対するアルブミン融合の影響を検討するため、ラットに放射性標識体の rIX-FP、BeneFIX®又はヒトアルブミン（Recombumin®）を単回静脈内投与して（放射活性として約 400 µCi/kg）、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験を実施した。その結果、[^{3}H]-rIX-FP 及び[^{3}H]-BeneFIX®の組織分布プロファイルは類似しており、アルブミン融合に依存しないことが示唆された。対照的に、[^{3}H]-アルブミンの体内分布は異なって現れた。

また、[^{3}H]-rIX-FP 及び[^{3}H]-アルブミン由来の放射能はいずれも 120 時間にわたり検出されたが、[^{3}H]-BeneFIX®由来の放射能は 24 時間のみ検出可能であったことから、アルブミン融合の結果[^{3}H]-rIX-FP の組織中 $t_{1/2}$ が延長するという考えが一層支持された。

表 2.4-2：　薬物動態試験一覧

試験の種類／動物種・系統	投与期間／経路	投与量	性／動物数	試験番号	GLP 適用
薬物動態試験（吸収）／カニクイザル	単回／静脈内	50 及び 100 IU/kg	雄 1、雌 1	APQ0002	非適用
薬物動態試験（吸収）／イヌ（血友病 B モデル）	単回／静脈内	100 IU/kg	雄 2、雌 1（rIX-FP）雌 2（BeneFIX®）	040200011	非適用
薬物動態試験（分布、排泄）／ラット（[redacted] (SD)）	単回／静脈内	221 IU/kg（rIX-FP）1000 IU/kg（BeneFIX®）6.25 mg/kg（アルブミン）	雄 8（rIX-FP）雄 4（BeneFIX®）雄 8（アルブミン）	CSL/01 及び CSL/03	非適用

注：ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験において、トキシコキネティクス測定を実施した（CTD 2.6.6.2、2.6.6.3 及び 2.6.7.7 項、参照）。

2.4.4　毒性試験

毒性試験プログラムとして、表 2.4-3 に示すげっ歯類及び非げっ歯類を用いた単回及び反復静脈内（ボーラス）投与試験を実施した。ラット及びサルで rIX-FP の薬理活性が確認されている（試験番号 IVX 01/09、CTD 2.6.2.2 項、参照）ことから、これらの動物種を用いて毒性試験を実施した。毒性試験に用いた低用量 75 IU/kg は当初予定された臨床最高投与量であり、この臨床投与量に対して中間用量（150 IU/kg 及び 500 IU/kg）及び高用量（2000 IU/kg）は当初の臨床最高投与量のそれぞれ 2 倍、6.7 倍及び 26.7 倍の投与量に相当する。（また、新たな臨床最高投与量 100 IU/kg に対して、毒性試験に用いた中間用量及び高用量は、それぞれ 1.5 倍、5 倍及び 20 倍の投与量に相当する。）

サル及びラットに rIX-FP を最大 500 IU/kg の用量で単回静脈内（ボーラス）投与した結果、忍容性は良好であり、毒性学的意義のある変化は認められなかった。NOAEL はいずれの動物種とも 500 IU/kg と推定された。

パイロットスケール（[redacted]L）及び実生産スケール（[redacted]L）で製造された rIX-FP の毒性プロファイルを比較するため、ラットを用いて 500 IU/kg の投与量で単回静脈内投与試験及びトキシコキネティクス試験を実施した。全体として、パイロットスケールと実生産スケールの rIX-FP を 500 IU/kg の用量で単回静脈内投与した結果、いずれの製造工程の物質でも明らかな毒性は認められなかった。また、実生産スケールの被験物質を投与した場合には製剤中の#不純物 濃度が増加したにもかかわらず、パイロットスケールと実生産スケールの被験物質で、トキシコキネティクスや毒性プロファイルに関して明らかな差異は認められなかった。

本剤は臨床で血友病 B 患者に反復投与されることから、4 週間及び 26 週間反復投与毒性試験を実施した。動物にとって異種のヒトタンパク質に対する免疫反応が予想されることから、6 日目に中間屠殺を行った。ラットに rIX-FP を最大 500 IU/kg/日の用量で、最長 28 日間静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、毒性を示唆する所見は認められなかった。本試験条件下で、NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。サルにおいても同様の結果であり、NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

また、SD 系ラットに rIX-FP を 2000 IU/kg/日の用量で 5 日間（中間評価）、又は 500 及び 2000 IU/kg/日の用量で 26 週間投与した結果、忍容性が良好であった。rIX-FP 投与に関連する毒性所見は認められなかった。NOAEL は 2000 IU/kg/日と推定された。

rIX-FP はラット及びサルを用いた 4 週間以上の反復投与毒性試験において、多くの動物で rIX-FP に対する中和・抗薬物抗体（ADA）の産生を特徴とする、強い免疫反応を引き起こした。ADA 陽性動物の数は投与回数及び投与量と共に増加し、ADA 陽性動物で AUC 及び C_{max} が低下したことにみられるように、曝露量の減少を引き起こした。26 週間反復投与毒性試験において、rIX-FP をラットに 2000 IU/kg/日の用量で投与した場合、ADA 産生の兆候がみられた。しかし、おそらく循環血中 rIX-FP のマスキング効果（急速な抗原－抗体複合体の形成）のために ADA を直接検出することができず、結果として血漿中 rIX-FP 濃度がわずかに低下し、検出できるほどの抗 rIX-FP 抗体が血漿中に存在しなかったと考えられる。

表 2.4-4 に rIX-FP のラット及びサルの反復投与毒性試験における曝露量、並びに臨床試験（Santagostino E et al., 2012）で測定した曝露量の比較を示す。C_{max} に関して、75 IU/kg では非臨床試験に使用した動物の曝露量は、ヒトの曝露量と同等あるいはそれを上回る。ラット及びサルにおける 500 IU/kg 初回投与後の C_{max} はそれぞれ 6.96 及び 7.82 IU/mL であり、この値は血友病 B 患者の臨床投与量 75 IU/kg で観察された C_{max} の 8.5 倍及び 9.54 倍に相当する。ラット及びサルにおいて 500 IU/kg/日で 28 日間反復投与後に観察された C_{max} では、臨床投与量 75 IU/kg における C_{max} のそれぞれ 11.3 倍及び 20.3 倍に増加する。ラットの 2000 IU/kg/日反復投与では、9 週目に C_{max} 平均値が最大値の 74.38 IU/mL に増加し、この値は臨床投与量 75 IU/kg における C_{max} の 91 倍に相当する。また、新たな臨床最高投与量 100 IU/kg に関しては、ラット及びサルの非臨床試験における 500 IU/kg/日 28 日間反復投与後の C_{max} は、臨床投与量 100 IU/kg における C_{max}（臨床投与量 75 IU/kg を基に線形外挿した推定値）と比較して、それぞれ約 8 倍（ラット）及び約 15 倍（サル）高いと考えられる。同様に、ラットの 2000 IU/kg/日反復投与後の C_{max} は、臨床投与量 100 IU/kg における C_{max} と比べて約 68 倍高いと考えられる。

ラット及びサルにおける rIX-FP の 500 IU/kg 投与で観察された $AUC_{0\text{-}t}$ は、初回投与後には 116.14 IU•h/mL（ラット）及び 108.28 IU•h/mL（サル）、28 日間投与後には 75.14 IU•h/mL（ラット）及び 273.26 IU•h/mL（サル）であった。したがって、臨床投与量 75 IU/kg におけるヒトの曝露量と比較すると 1 日目では 1.3 倍（ラット）及び 1.2 倍（サル）、28 日目では 0.8 倍（ラット）及び 3.0 倍（サル）に相当する。ラットの 2000 IU/kg/日反復投与では、13 週目に AUC 平

均値が最大値の 882.86 IU•h/mL 増加した。この値は、臨床投与量 75 IU/kg における AUC の 9.8 倍に相当する。

したがって、非臨床試験に使用したラット及びサルの曝露量は、臨床投与量 75 IU/kg でのヒトの曝露量を最大 9.8 倍上回っており、十分な安全域が確保されていると考えられる。なお、新たな臨床最高投与量 100 IU/kg に関しては、臨床投与量 75 IU/kg から線形外挿したヒトの AUC に対して、ラット及びサルは約 7 倍の曝露量である。

rIX-FP の遺伝毒性について評価するため 2 種の *in vitro* 試験、細菌を用いる復帰突然変異試験（AMES 試験）及びヒトリンパ球を用いる染色体異常試験を実施した。いずれの試験においても、変異原性を示すエビデンスは認められなかった。

ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験において、局所刺激性の評価を行った。さらに、ウサギを用いて単回静脈内、動脈内及び静脈周囲投与による局所刺激性試験を実施した。rIX-FP を反復静脈内（ボーラス）投与したラット及びサルの忍容性は良好であり、局所刺激性は認められなかった。また、ウサギではいずれの投与経路においても投与局所の所見及び全身症状は認められなかった。

rIX-FP の血栓形成性について、血栓形成を評価する標準的方法のウサギを用いた Wessler うっ血モデル変法により検討した。rIX-FP は、試験に用いた 3 用量（75、150 及び 500 IU/kg)で血栓形成性を示さなかった。

表 2.4-3：　毒性試験一覧

試験の種類／動物種・系統	投与期間／経路	投与量	性／動物数	試験番号	GLP 適用
単回投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	単回／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg	雄 5、雌 5	APQ0005	適用
単回投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	単回／静脈内	0, 500 IU/kg	雄 5、雌 5	8244656	適用
単回投与毒性試験／カニクイザル	単回／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg	雄 3、雌 3	APQ0007	適用
反復投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	4 週間／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg	雄 15～18 雌 15～18	APQ0009	適用
反復投与毒性試験／ラット（[redacted] (SD)）	26 週間／静脈内	500 及び 2000 IU/kg	雄 13、雌 13（500 IU/kg） 雄 22、雌 23（2000 IU/kg）	APQ0021	適用
反復投与毒性試験／カニクイザル	4 週間／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg	雄 4、雌 4	APQ0001	適用
復帰突然変異試験／ネズミチフス菌、大腸菌	*In vitro*	0, 0.1～200 IU/プレート	–	APQ0004	適用
染色体異常試験／ヒトリンパ球	*In vitro*	0, 0.1～20 IU/mL	–	APQ0006	適用

表 2.4-3：　毒性試験一覧（続き）

試験の種類／動物種・系統	投与期間／経路	投与量	性／動物数	試験番号	GLP適用
局所刺激性試験／NZW ウサギ	単回／静脈内	1.2 mL/匹（静脈内） 1.3 mL/匹（動脈内） 0.2 mL/匹（静脈周囲）	雌 4	APQ0008	適用
血栓形成性試験／NZW ウサギ	単回／静脈内	0, 75, 150 及び 500 IU/kg	雄 3、雌 3	S22456	適用

表 2.4-4：　ヒトの単回投与後、並びにラット及びサルの反復投与後に観察された rIX-FP の AUC 及び Cmax *

	投与量（IU/kg）	25	50	75	150	500	2000
ヒト§							
$AUC_{0\rightarrow\infty}$ (IU•h/mL)	平均値	41.92	70.90	89.95	–	–	–
	S.D.	16.28	16.23	17.58	–	–	–
C_{max} (IU/mL)	平均値	0.41	0.69	0.82	–	–	–
	S.D.	0.05	0.13	0.14	–	–	–
ラット（1 日目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	19.5	35.08	116.14	348.92
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	1.02	2.38	6.96	31.075
ラット（28 日目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	9.15	32.22	75.14	–
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	1.13	2.80	9.23	–
サル（1 日目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	16.08	32.25	108.28	–
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	1.04	2.06	7.82	–
サル（28 日目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	46.62	79.54	273.26	–
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	2.60	4.30	16.63	–
ラット（57 日目＝9 週目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	–	–	–	739.3
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	–	–	–	74.38
ラット（85 日目＝13 週目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	–	–	–	882.86
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	–	–	–	57.16
ラット（143 日目＝21 週目）							
$AUC_{0\text{-}t}$ (IU•h/mL)	平均値	–	–	–	–	–	836.795
C_{max} (IU/mL)	平均値	–	–	–	–	–	58.305

* ヒトは、投与後 7 日間（25 IU/kg）又は 10/14 日間（50 IU/kg 及び 75 IU/kg）で測定した値。ラット及びサルの投与量 75、150 及び 500 IU/kg/日は、単回投与及び 4 週間反復投与毒性試験における 1 日目及び 28 日目の値。ラットの投与量 2000 IU/kg/日は、代表的な 1 日目並びに 9、13 及び 21 週目の値を示した。
§ 出典：Santagostino E et al., 2012.　　S.D.：標準偏差

2.4.5　総括及び結論

効力を裏付ける試験としては、初めに試験系として薬理学的に適切な動物種を確認するため、rIX-FP を添加した血漿を用いた *in vitro* 試験を実施した。血漿中の rIX-FP 濃度が増加するに伴い血液凝固パラメーターの aPTT が短縮したことに示されるように、サル、ラット及びウサギで rIX-FP の薬理活性が確認された。

rIX-FP の 100 IU/kg 静脈内投与により、血友病 B イヌで aPTT 及び WBCT の短縮が認められた。薬物動態プロファイル（C_{max} 及び AUC 等）については、市販の遺伝子組換えヒト FIX 製剤（BeneFIX®）より優れていた。rIX-FP 及び BeneFIX®はいずれも、血友病 B イヌで抗薬物抗体反応を誘発した。

FIX 欠損マウスに rIX-FP を 50、100 及び 200 IU/kg の用量で静脈内投与した結果、対照群と比較して有意かつ用量依存的な総失血量の減少、止血時間及び aPTT の短縮が認められた。

サルを用いた薬物動態試験では、rIX-FP を 50 及び 100 IU/kg の投与量で静脈内投与した。rIX-FP の薬物動態は、試験に用いた投与量の範囲で線形であり、性差はみられなかった。血漿中 $t_{1/2}$ は平均 42.2 時間であり、これは市販の遺伝子組換えヒト FIX 製剤の $t_{1/2}$（12.7 時間、Mc Carthy et al., 2002）と比較して、3 倍を超える値であった。本薬物動態試験における免疫原性検査では、ヒト FIX あるいはヒトのアルブミンに対する抗体産生は認められなかった。

定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験の結果から、[^{3}H]-rIX-FP 及び[^{3}H]-BeneFIX®の組織分布は類似しており、アルブミン融合に依存しないことが示唆された。対照的に、[^{3}H]-アルブミンの体内分布は異なって現れた。また、[^{3}H]-rIX-FP 及び[^{3}H]-アルブミン由来の放射能はいずれも 120 時間にわたり検出されたが、[^{3}H]-BeneFIX®由来の放射能は 24 時間のみ検出可能であったことから、アルブミン融合の結果[^{3}H]-rIX-FP の組織中 $t_{1/2}$ が延長するという考えが一層支持された。

ラットにおける安全性薬理試験では呼吸系パラメーター（呼吸数、1 回換気量及び分時換気量）に rIX-FP の影響はみられなかった。NOAEL は 500 IU/kg 以上と考えられた。

ラット及びサルに rIX-FP を最大 500 IU/kg の用量で単回静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、毒性学的意義のある変化は認められなかった。製造工程（パイロットスケール及び実生産スケール）による毒性プロファイルの差異はみられず、NOAEL はいずれの動物種とも 500 IU/kg と推定された。

ラットに rIX-FP を最大 500 IU/kg/日の用量で 28 日間連日静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、毒性を示唆する所見は認められなかった。28 日間の投与後、rIX-FP 投与群でヒトアルブミン及びヒト FIX に対する抗体産生を示す免疫反応が認められ、初期反応は 16 日目に 3 匹で認められた。本試験における NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

rIX-FP をラットに 500 及び 2000 IU/kg/日の用量で 26 週間静脈内投与した結果、rIX-FP 投与に関連した毒性学的意義のある所見は認められず、忍容性が良好であった。本試験における NOAEL は 2000 IU/kg/日と推定された。

サルに rIX-FP を最大 500 IU/kg/日の用量で、最長 28 日間静脈内投与した結果、忍容性は良好であり、毒性学的変化は認められなかった。rIX-FP を投与した多くの動物で抗ヒト FIX 抗体の産生が認められ、500 IU/kg/日群の 1 匹で抗ヒトアルブミン抗体の産生が観察された。本試験条件下での NOAEL は 500 IU/kg/日と推定された。

細菌を用いる復帰突然変異試験（AMES 試験）及び哺乳類細胞（ヒトリンパ球）を用いる *in vitro* 染色体異常試験により、rIX-FP の遺伝毒性を検討した。細菌を用いた試験系で rIX-FP の変異原性を示すエビデンスは認められず、さらに、*in vitro* 細胞遺伝学的試験においても rIX-FP が染色体の構造的異常を誘発させることを示すエビデンスは認められなかった。

ウサギにおいて rIX-FP の静脈内、動脈内及び静脈周囲投与での忍容性は良好であり、投与局所の所見及び全身症状は認められなかった。

ウサギの Wessler うっ血モデル変法により rIX-FP の血栓形成性を評価した結果、試験に用いた 3 用量（75、150 及び 500 IU/kg）で血栓形成性は認められなかった。

非臨床試験プログラム全体として、血友病 B 患者の病態を模した 2 種の動物モデルにおいて rIX-FP の止血効果が示された。市販の遺伝子組換え FIX 製剤と比較して、rIX-FP の優れた薬物動態特性が示された。さらに、安全性薬理試験及び毒性試験では rIX-FP を最大 2000 IU/kg の用量で投与した結果、忍容性が良好であり、有害な毒性、血栓形成性若しくは局所刺激性を示す所見は認められなかった。また、2 種の *in vitro* 試験系において rIX-FP は遺伝毒性を示さなかった。

臨床最高用量及び非臨床試験の最大投与量に基づく安全域から、予定する臨床用量で有害作用は発現しないと判断することが妥当と考えられる。特に、C_{max} は rIX-FP の凝固活性に関連した有害作用の重要な指標であり、動物の曝露量は当初予定した臨床投与量 75 IU/kg におけるヒトの曝露量の 91 倍を上回ることから、臨床での安全性が担保されると考えられる。また、新たな臨床最高投与量 100 IU/kg に関しては、臨床投与量 75 IU/kg から線形外挿した C_{max} を約 68 倍上回る。

以上のように、rIX-FP の非臨床試験により臨床用量での薬力学的効果、好ましい薬物動態特性及び優れた安全性特性が明らかとなった。非臨床試験の結果より rIX-FP は好ましい適切なリスク・ベネフィットを有することから、血友病 B 患者に rIX-FP を使用することが支持される。

2.4.6　参考文献一覧

Amcs BN, McCann J, Yamasaki E. Mcthods for dctccting carcinogcns and mutagcns with thc Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Res. 1975; 31, 347-364.

Giles AR, Johnston M, Hoogendoorn H, Blajchman M, Hirsh J. The thrombogenicity of prothrombin complex concentrates: I. The relationship between in vitro characteristics and in vivo thrombogenicity in rabbits. Thromb Res. 1980; 17(3-4), 353-366.

Heddle JA and Bodycote DJ. On the formation of chromosomal aberrations. Mutation Res. 1970; 9, 117-126.

Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Res. 1983; 113, 173-215.

McCarthy K, Stewart P, Sigman J, Read M, Keith JC Jr, Brinkhous KM, Nichols TC, Schaub RG. Pharmacokinetics of recombinant factor IX after intravenous and subcutaneous administration in dogs and cynomolgus monkeys. Thromb Haemost. 2002; 87, 824-830.

Santagostino E, Negrier C, Klamroth R, Tiede A, Pabinger-Fasching I, Voigt C, Jacobs I, Morfini M. Safety and pharmacokinetics of a novel recombinant fusion protein linking coagulation factor IX with albumin (rIX-FP) in hemophilia B patients. Blood. 2012; 120(12), 2405-2411.

Scott D, Dean B, Danford, ND and Kirkland, DJ (1990) Metaphase chromosome aberration assays in vitro in Kirkland, DJ (Ed.) Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures. Report of the UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Report, Part I revised p. 62. Cambridge University Press, Cambridge.

Wessler S, Ward K, Ho C. Studies in intravascular coagulation. III. The pathogenesis of serum-induced venous thrombosis. J.C.I. 1955; 34, 647-651.