エイフスチラ静注用

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
2.4.1.1.　各種ガイドラインの適用 5
2.4.2.　薬理試験 13
2.4.3.　薬物動態試験 14
2.4.4.　毒性試験 15
2.4.5.　総括及び結論 18
2.4.6.　参考文献一覧 20

表の目次

表 2.4-1：　CSL627 の非臨床試験一覧 6
表 2.4-2：　CSL627 で実施した非臨床試験の一覧、並びに試験を実施しなかった理由 8

略語・略号一覧

略語・略号	定義（英語）	定義（日本語）
ADA	Anti-drug-antibodies	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 activity-time curve to infinity	血漿中濃度–時間曲線下面積
AUC_{24h}	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to 24 h	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度–時間曲線下面積
C_{max}	Maximum concentration	最高血漿中濃度
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
FVIII	Coagulation factor VIII	血液凝固第 VIII 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
h	Hour(s)	時間
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IU	International units	国際単位
kg	Kilogram	キログラム
KO	Knock out	ノックアウト
mL	Milliliter	ミリリットル
No.	Number	番号
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
rFVIII	Recombinant human coagulation factor VIII	遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子
$t_{1/2\beta}$	Terminal half-life	終末相半減期
TEG	Thromboelastography	トロンボエラストグラフィー
TEM	Thromboelastometry	トロンボエラストメトリー
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
vWF	von Willebrand Factor	フォン・ヴィレブランド因子

本剤の表記について

本文書を通じて以下の表記を使用する。

- 本剤（エイフスチラ静注用）について、「rVIII-SingleChain」又は「CSL627」と表記する。

2.4. 非臨床試験の概括評価

2.4.1. 非臨床試験計画概略

遺伝子組換え単鎖血液凝固第 VIII 因子（製品番号 CSL627）は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生された一本鎖の遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）製剤である。CSL627 では、野生型の全長第 VIII 因子（FVIII）で発現する B 領域の大部分と、隣接する酸性 a3 ドメインの 4 個のアミノ酸が除去されている（全長 FVIII のアミノ酸 765～1652 を除去）。新たに形成された FVIII の H 鎖と L 鎖の結合には、新規の N-グリコシル化部位が導入されている。野生型 FVIII の B 領域と a3 領域の間に存在するフューリン切断部位が除去されていることから、CSL627 は単鎖の FVIII 分子として発現する。

本剤は以下のコンセプトに基づいて開発された。

- 非活性化 FVIII で起こり得る H 鎖と L 鎖の解離を防止する。
- 結合部位で新たに形成された N-グリカン側鎖の遮蔽効果を使用して、ネオ抗原性が発現する可能性を減ずる。
- 高収量の rFVIII 発現を実現する。
- 安定な単鎖 rFVIII 構造により、高収量の製造工程を実現する。

CSL627 は効果的な止血に必要な FVIII の欠損を補充する、遺伝子組換え蛋白質である。CSL627 の活性化により形成される分子は、内因性の全長 FVIII から形成される活性化 FVIII（FVIIIa）と同一のアミノ酸配列である。

CSL627 の非臨床試験として、薬力学的試験、薬物動態（PK）試験、安全性薬理試験、単回投与毒性試験、反復投与毒性試験、局所刺激性試験及び血栓形成性試験を実施した。安全性薬理試験及び毒性試験は GLP 基準に準拠して実施した。FVIII 欠損マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサルで CSL627 の薬理作用が期待されることから、これらの動物種を薬理試験及び毒性試験に使用した。また、ラットやサルでは膨大な背景データが利用可能で、全長 rFVIII 製剤の ReFacto AF®や Advate®のような市販同効薬の安全性評価に使用されており、医薬品の承認申請を目的として実施される非臨床試験で広く使用される動物種である。本剤は臨床で静脈内投与されることから、非臨床試験の投与経路は静脈内投与とした。

FVIII 欠損患者と類似した凝固系の欠損を示し、血友病 A 患者と同様に出血リスクの増大がみられる FVIII 欠損マウス［FVIII ノックアウト（KO）マウス、血友病 A マウス］（Øvlisen et al., 2008）を使用した 4 試験で、CSL627 の薬力学的効果について検討した。これら FVIII KO マウスを用いた試験として、*ex vivo* 試験［活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）、トロンビン生成及びトロンボエラストグラフィー（TEG）］、並びに *in vivo* 試験（テイルクリップ・モデル）を実施した。また、毒性試験に使用した動物種（ラット及びサル）における薬力学的効果を証明するために、*in vitro* の 2 試験を実施した。

サルの 28 日間反復投与毒性試験に組み込んで、心血管系パラメーターに関する安全性薬理評価を行った。ラットの 28 日間反復投与毒性試験の一部として、CSL627 の神経行動学的影

響について検討した。さらに、CSL627 の血行動態及び電気生理学的パラメーター並びに呼吸系機能に及ぼす影響について、イヌ及びサルに麻酔下又は覚醒（テレメトリー）条件下で CSL627 を累積投与量 1550 IU/kg まで静脈内投与して詳細に評価した。

CSL627 の薬物動態（PK）を評価するため、FVIII KO マウス及びサルを用いて単回静脈内投与の 3 試験を実施した。さらに、単回及び反復投与毒性試験の一部として PK 解析（トキシコキネティクス：TK）を行った。

血友病 A マウス（FVIII KO マウス）を用いて、市販の FVIII 製剤と比較した非臨床の薬力学的データに基づき、本剤を出血傾向の抑制に適用する場合の 1 日最高投与量は 50 IU/kg を予定している。

同様に、生命に危険がある場合の最高用量は、患者当たり 1 日 200 IU/kg の予定である。安全性薬理及び毒性試験の投与量は、予定する FVIII のヒト 1 日平均用量、並びに臨床用量を上回り 30 倍の安全域を担保する 2 用量を設定した。最終的には、適用される安全域の広さは、止血効果の測定とラベリング並びに製剤の出荷のために、発色合成基質法又は凝固一段階法のいずれの *in vitro* アッセイ法を使用するかにより必然的に決定される。特記する場合を除き、本文書に記載した CSL627 の FVIII 活性値の単位はすべて発色合成基質法で測定した単位である。

ラット及びサルを用いて、一般毒性試験（単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験）を実施した。異種（ヒト）蛋白質の抑制抗体が産生されるため、28 日間を超える反復投与試験は実施しなかった。

局所刺激性に対する感受性が高く標準的に使用されるウサギを用いて、静脈内投与並びに想定外の投与経路である動脈内及び静脈周囲投与により、CSL627 の局所刺激性を検討した。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評価した。

Wessler の方法（Wessler et al., 1955）を基に Giles が改変した方法（Giles et al., 1980）に準じた、ウサギの *in vivo* 血栓形成性試験により CSL627 の血栓形成作用を評価した。

2.4.1.1.　各種ガイドラインの適用

モジュール 2.4 の表 2.4-1 に、CSL627 で実施した各非臨床試験の GLP 適合状況を示した。GLP 適合下で実施した非臨床試験（すべての毒性試験及び安全性薬理試験）には、試験報告書に試験を実施した受託研究機関（CRO）の GLP 適合陳述書を添付した。

標準操作手順書に従って試験を実施し、試験結果を適切に記録した。医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（GMP）に従って、CSL627 製剤の製造、品質管理及び出荷を行った。ICH S6(R1)「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に準拠して、CSL627 の非臨床試験を実施した。

2.4　非臨床試験の概括評価
エイフスチラ静注用

表 2.4-1：　CSL627 の非臨床試験一覧

試験の種類／評価した器官系	動物種	バッチ No.	被験薬力価	投与量（IU/kg）	GLP 適用	試験番号
薬理試験（モジュール 2.6.2、2.6.3 及び 4.2.1 参照）						
効力を裏付ける試験／トロンビン生成	ラット	[redacted]	1000 IU	1～30 IU/mL	非適用	IVR[redacted]-03
効力を裏付ける試験／トロンビン生成	サル		1000 IU	1～30 IU/mL	非適用	IVX[redacted]-10
効力を裏付ける試験／TEG/TEM、トロンビン生成	FVIII KO マウス	[redacted]	1000 IU	20	非適用	PSM[redacted]-18
効力を裏付ける試験／aPTT	FVIII KO マウス	[redacted]	1000 IU	20	非適用	PSM[redacted]-23
効力を裏付ける試験／止血効果、aPTT	FVIII KO マウス	[redacted]、	1000 IU	1～150	非適用	ABM 03[redacted]
効力を裏付ける試験／止血効果、aPTT	FVIII KO マウス	[redacted]、	1000 IU	1～150	非適用	ABM 03[redacted] 及び ABM 01[redacted]
安全性薬理試験（反復投与毒性試験）／中枢神経系機能	ラット	[redacted]、	1000 IU	50、250、1250	適用	APQ0013
安全性薬理試験（反復投与毒性試験）／心血管系機能	サル		1000 IU	50、150、500	適用	APQ0014
麻酔イヌの安全性薬理試験／心血管系及び呼吸系機能	イヌ	[redacted]、	1000 IU	50、250、1250（累積投与量：1550）	適用	APQ0016
イヌのテレメトリー試験／心血管系機能	イヌ	[redacted]	1000 IU	50、250、1250（累積投与量：1550）	適用	APQ0018
サルのテレメトリー試験／心血管系機能	サル	[redacted]	1000 IU	50、250、1250（累積投与量：1550）	適用	APQ0019

表 2.4-1：　CSL627 の非臨床試験一覧（続き）

試験の種類	動物種	バッチ No.	被験薬力価	投与量（IU/kg）	GLP 適用	試験番号
薬物動態試験（モジュール 2.6.4、2.6.5 及び 4.2.2 参照）						
薬物動態試験／吸収	FVIII KO マウス	[redacted]	1000 IU	100	非適用	PSM 06[redacted]
薬物動態試験／吸収	サル		1000 IU	50、250	非適用	APQ0015
薬物動態試験／吸収	サル	[redacted]	1000 IU	250	非適用	APQ0020
毒性試験（モジュール 2.6.6、2.6.7 及び 4.2.3 参照）						
単回投与毒性試験	ラット	[redacted]	1000 IU	50、250、1500	適用	APQ0010
単回投与毒性試験	サル		1000 IU	50、250、1500	適用	APQ0011
反復投与毒性試験	ラット	[redacted]、	1000 IU	50、250、1250	適用	APQ0013
反復投与毒性試験	サル	[redacted]	1000 IU	50、150、500	適用	APQ0014
局所刺激性試験	ウサギ	[redacted]	1000 IU	359 IU/mL (0.2 mL/animal) (1.0 mL/animal)	適用	APQ0012
血栓形成性試験	ウサギ	[redacted]	1000 IU	150、300、500、1000	適用	S30668

2.4　非臨床試験の概括評価
エイフスチラ静注用

表 2.4-2：　CSL627 で実施した非臨床試験の一覧、並びに試験を実施しなかった理由

試験項目及びモジュール 4 の項番号	試験番号又は試験を実施しなかった理由
4.2.1　薬理試験	
4.2.1.1　効力を裏付ける試験	IVR[redacted]-03、IVX[redacted]-10、PSM[redacted]-18、PSM[redacted]-23、ABM 03[redacted]、ABM 03[redacted]、ABM 01[redacted]
4.2.1.2　副次的薬理試験	ヒト血液凝固因子を代表する CSL627 の作用機序より、血液凝固作用以外の薬力学的作用は予想されない。効力を裏付ける試験、安全性薬理試験及び毒性試験で観察される副次的薬理作用に相当する所見は何ら認められなかったため、副次的薬理試験は実施しなかった。
4.2.1.3　安全性薬理試験	APQ0013、APQ0014、APQ0016、APQ0018、APQ0019
4.2.1.4　薬力学的薬物相互作用試験	CSL627 の薬理作用に基づき、薬力学的相互作用は予想されないので、試験は実施しなかった。
4.2.2　薬物動態試験	
4.2.2.1　分析法及びバリデーション報告書（別報告書として入手できる場合）	いくつかの分析法はそれぞれの *in vivo* 試験の報告書に記載している。以下のバリデーション報告書が含まれている（10087、10097、10098 及び MEV-83）。
4.2.2.2　吸収	PSM 06[redacted] 試験、APQ0015 試験及び APQ0020 試験は TK 評価を含む。
4.2.2.3　分布	CSL627 を動物に静脈内投与（臨床投与経路）した場合の PK 試験は 4.2.2.2「吸収」の項に記載した。FVIII の異化作用はよく知られているため、生体内分布及び排泄に関する試験は実施していない。FVIII は限定的な組織内分布を示し、大部分は血漿中に分布している（Kosloski et al., 2013）。同様なことが CSL627 でも考えられる。すなわち、CSL627 をカニクイザルに単回投与した時（試験番号：APQ0015）の分布容積は小さく（V_{ss}：26.6–40.3 mL/kg）、同種同効薬である Helixate®（V_{ss}：23.4–32.6 mL/kg）及び ReFacto AF®（V_{ss}：32.7–35.6 mL/kg）と同等であった。このような PK プロファイルのため、分布についての更なる評価が必要になるとは考えられない。ICH S6(R1)ガイドラインによると、放射性標識物質が非標識物質と同等な活性及び生物学的特性を保持している場合にのみ生体内分布試験は有用と考えられている。しかし、放射性同位元素標識法は、被験物質（蛋白質）の品質に全く影響を与えない条件で実施することは難しいと考えられているため、CSL627 の場合も試験実施が困難である。

表 2.4-2：　CSL627 で実施した非臨床試験の一覧、並びに試験を実施しなかった理由（続き）

試験項目及びモジュール 4 の項番号	試験番号又は試験を実施しなかった理由
4.2.2　薬物動態試験（続き）	
4.2.2.4　代謝	CSL627 を静脈内投与（臨床投与経路）した場合の PK 試験は 4.2.2.2「吸収」の項に記載した。FVIII は作用発現組織である血漿から消失する間に不活性になることから（Oldenburg et. al., 2004; Ananyeva et.al., 2001; Lenting et.al., 2010）、代謝試験は実施していない。加えて、ICH S6(R1)ガイドラインによると、血漿蛋白質の代謝経路について一般的な理解が定着しているため、このような薬剤については、従来から実施されている代謝試験は必要とされない。
4.2.2.5　排泄	CSL627 を動物に静脈内投与（臨床投与経路）した場合の PK 試験は 4.2.2.2「吸収」の項に記載した。 FVIII は作用発現組織である血漿から消失する間に不活性になることから、排泄に関する試験は実施しなかった。
4.2.2.6　薬物動態学的薬物相互作用（非臨床）	CSL627 の薬物動態学的薬物相互作用はないと考えられるため、試験は実施していない。
4.2.2.7　その他の薬物動態試験	その他の薬物動態試験は実施していない。
4.2.3　毒性試験	
4.2.3.1　単回投与毒性試験	APQ0010、APQ0011
4.2.3.2　反復投与毒性試験（トキシコキネティクスの評価を含む）	APQ0013、APQ0014
4.2.3.3　遺伝毒性試験	
4.2.3.3.1　*In Vitro* 試験	CSL627 の有効成分は、天然に存在するヒト血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質である。FVIII は DNA との直接的な相互作用がないことから DNA 損傷は予側されず、DNA 結合蛋白質との相互作用もないことから、変異原性を有さないと考えられる。ICH S6(R1)ガイドラインでは、大量の蛋白質を投与した場合、解釈不可能な結果が起こる可能性もあるとされている。したがって、CSL627 の *in vitro* 遺伝毒性試験は実施しなかった。

表 2.4-2：　CSL627 で実施した非臨床試験の一覧、並びに試験を実施しなかった理由（続き）

試験項目及びモジュール 4 の項番号	試験番号又は試験を実施しなかった理由
4.2.3　毒性試験（続き）	
4.2.3.3　遺伝毒性試験（続き）	
4.2.3.3.2　*In Vivo* 試験（トキシコキネティクスの評価を含む）	CSL627 の有効成分は、天然に存在するヒト血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質である。FVIII は DNA との直接的な相互作用がないことから DNA 損傷は予側されず、DNA 結合蛋白質との相互作用もないことから、変異原性を有さないと考えられる。ICH S6(R1)ガイドラインでは、大量の蛋白質を投与した場合、解釈不可能な結果が起こる可能性もあるとされている。したがって、CSL627 の *in vivo* 遺伝毒性試験は実施しなかった。
4.2.3.4　がん原性試験（トキシコキネティクスの評価を含む）	以下の理由により、がん原性試験の実施は不要と判断した。a) ICH S6(R1)ガイドラインでは、バイオ医薬品において標準的ながん原性試験は概して不適当であるとされている、b) CSL627 の有効成分は、天然に存在するヒトの血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質である。したがって、CSL627 のような動物にとって異種のヒト蛋白質は免疫原性を示し、反復投与すると中和活性を有する抗薬物抗体が産生される。次いで、免疫複合体が形成され、薬物曝露量が低下する。そのため、長期のがん原性試験を実施しても、リスク評価に有益な情報は得られないと考えられる。このような理由から、がん原性試験は実施しなかった。
4.2.3.4.1　長期がん原性試験（用量設定試験も含む、ただし、反復投与毒性試験又は薬物動態試験で行われたものは除く）	CSL627 の有効成分は、天然に存在するヒト血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質である。FVIII は DNA との直接的な相互作用がないことから DNA 損傷は予側されず、DNA 結合蛋白質との相互作用もないことから、変異原性を有さないと考えられる。 反復投与毒性試験において、増殖作用を示唆する変化が認められなかった。CSL627 のような動物にとって異種のヒト蛋白質は免疫原性を示し､反復投与すると中和活性のある抗薬物抗体が産生される。次いで、免疫複合体が形成され、薬物曝露量が低下する。そのため、長期のがん原性試験を実施しても、リスク評価に有益な情報は得られないと考えられる。さらに、ICH S6(R1)ガイドラインでは、大量の蛋白質を投与した場合、解釈不可能な結果が起こる可能性もあるとされている。このような理由から、長期投与がん原性試験は実施しなかった。
4.2.3.4.2　短期又は中期がん原性試験（用量設定試験も含む、ただし、反復投与毒性試験又は薬物動態試験で行われたものは除く）	4.2.3.4.1「長期がん原性試験」の項を参照。
4.2.3.4.3　その他の試験	がん原性評価に係わるその他の試験は実施していない。

表 2.4-2：　CSL627 で実施した非臨床試験の一覧、並びに試験を実施しなかった理由（続き）

試験項目及びモジュール 4 の項番号	試験番号又は試験を実施しなかった理由
4.2.3　毒性試験（続き）	
4.2.3.5　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクスの評価を含む）	
4.2.3.5.1　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験	CSL627 の蛋白質（ヒト FVIII）は、体内に本来存在する構造及び機能がよく知られた蛋白質であることから、生殖発生毒性試験の実施は不要とした。また、単回及び反復投与毒性試験において生殖機能への影響を示唆する変化はみられず、生殖毒性、発生毒性、胚・胎児毒性あるいは幼若動物に対する毒性を評価する、特殊毒性試験が必要となる所見も認められなかった。なお、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験において、雌雄生殖器の肉眼的及び病理組織学的検査を実施しており、これらの組織への影響を示唆する所見は認められなかった。本剤は生体内に存在する蛋白質の補充療法として使用されることから、患者の年齢にかかわらず全般的な安全性に関する懸念はないと考えられる。 さらに、血液凝固亢進状態は子宮胎盤循環における血栓形成の原因となり、反復流産のリスク要因となることが知られている。具体的には、抗リン脂質抗体症候群の死産・流産発症原因の一つとして、血栓形成が推定されており（Meroni et al., 2011）、また、血液凝固第 VII 因子等の低下による血栓形成が不育症のリスク要因の一つとして知られている（Sotiriadis et al., 2007）。したがって、正常動物で FVIII の過剰投与は生殖発生毒性の評価に影響する可能性があり、正常動物を用いた生殖発生毒性試験により、血友病の妊婦で血栓形成と関連した生殖発生毒性が発現するリスクを正確に予測することはできないと考える。
4.2.3.5.2　胚・胎児発生に関する試験	4.2.3.5.1「受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験」の項を参照。
4.2.3.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	4.2.3.5.1「受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験」の項を参照。
4.2.3.5.4　新生児を用いた試験（実施された場合）	CSL627 が成人と比べて小児で異なった挙動を示す兆候はみられないことから、幼若動物を使用した毒性試験は実施しなかった。また、幼若動物を使用した非臨床の毒性評価に必要とされる、同一の静脈を使用した長期間にわたる反復投与は、マウスやラットの新生児又は幼若動物では技術的に困難である。このため、新生児を用いた非臨床試験は実施しなかった。
4.2.3.6　局所刺激性試験	APQ0012

表 2.4-2：　CSL627 で実施した非臨床試験の一覧、並びに試験を実施しなかった理由（続き）

試験項目及びモジュール 4 の項番号	試験番号又は試験を実施しなかった理由
4.2.3　毒性試験（続き）	
4.2.3.7　その他の毒性試験（実施又は検討された場合）	
4.2.3.7.1　抗原性試験	FVIII はヒトに免疫原性を示すことが、臨床的に知られている。CSL627 の有効成分は天然に存在するヒト血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質であることから、他のヒト蛋白質と比較して CSL627 に起因するネオ抗原を検出することは困難と考えられる。そのため、動物モデルから新たな情報を得ることは期待できない。したがって、CSL627 の抗原性あるいはネオ抗原性試験は実施していない。
4.2.3.7.2　免疫毒性試験	ラット及びサルの反復投与毒性試験において、CSL627 の免疫毒性について検討した。その結果、これらの試験でリンパ系器官に肉眼的及び病理組織学的所見は認められず、CSL627 は免疫系器官に影響を及ぼさないと考えられた。そのため、CSL627 の独立した免疫毒性試験は実施しなかった。
4.2.3.7.3　毒性発現の機序に関する試験	S30668（血栓形成性試験）
4.2.3.7.4　依存性試験	CSL627 の有効成分は、天然に存在するヒト血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質である。他の FVIII 製剤では、臨床使用で依存性を示す兆候は報告されていない。CSL627 がヒトに依存性を惹起することは予想されないことから、依存性試験は実施しなかった。
4.2.3.7.5　代謝物の毒性試験	CSL627 の代謝物は特定されていないため（4.2.2.4「代謝」の項を参照）、代謝物の毒性試験は実施していない。
4.2.3.7.6　不純物の毒性試験	CSL627 の原薬及び製剤の特性は明らかになっている（モジュール 3：3.2.S.3.2 項及び 3.2.P.5.5 項）。リスク・アセスメントにおいて、特定された不純物のリスクを評価した。 毒性試験に使用した製剤は臨床で使用予定の製剤と同等であり、開発過程で使用した被験物質の同等性が明らかとなっている（3.2.P.2.3 項）。したがって、不純物のリスクはこれまでに実施した反復投与毒性試験で評価されており、不純物に特化した毒性試験は実施しなかった。 特に宿主細胞の蛋白質に起因するリスクについて、ICH S6(R1)ガイドラインでは、宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性があるとされている。CSL627 の反復投与毒性試験では、抗薬物抗体の産生以外には、アレルギー反応やその他の免疫病理学的反応を示唆する所見は認められなかった。
4.2.3.7.7　その他の試験	その他の試験は実施していない。

2.4.2. 薬理試験

CSL627 の効力を裏付ける試験として *in vitro*、*ex vivo* 及び *in vivo* 試験を実施した。*In vitro* 試験は毒性試験に使用した動物種における薬力学的効果を証明するために、ラット及びサルの血漿を用いて実施した。一方、*ex vivo* 及び *in vivo* 試験は、血友病 A 患者と類似した凝固系の欠損を示し、ヒトの患者と同様に出血リスクの増大がみられる（Øvlisen et al., 2008）FVIII KO マウスを用いて実施した。

In vitro 試験では、CSL627 は CD ラットの血漿を用いたトロンビン生成試験において、トロンビンピーク値の上昇及びピーク値到達時間の短縮を誘発して、濃度依存的な薬力学的効果を示した（試験番号 IVR[redacted]-03）。また、カニクイザルの血漿でもトロンビンピーク値の上昇、内因性トロンビン活性の増加及びピーク値到達時間の短縮を特徴とする、濃度依存的な薬力学的効果が認められた（試験番号 IVX[redacted]-10）。これらの結果から、CSL627 の非臨床試験でラット及びカニクイザルが薬理学的に妥当な動物モデルであることが支持される。

FVIII KO マウスを用いて薬力学的パラメーターを比較した *ex vivo* 試験、すなわちトロンボエラストグラフィー（TEG）／トロンボエラストメトリー（TEM）及びトロンビン生成試験（試験番号 PSM[redacted]-18）、並びに aPTT 測定試験（試験番号 PSM[redacted]-23）において、CSL627 及び市販 rFVIII 製剤 Advate®を投与量 20 IU/kg で静脈内投与して効果を比較した。発色合成基質法で測定した FVIII 活性に基づいて投与した場合、CSL627 と Advate®は *ex vivo* で同等の薬力学的効果を示した。

FVIII KO マウスに CSL627 を投与量 1、5、15、40、100 及び 150 IU/kg で静脈内投与し、テイルクリップ・モデルを用いた *in vivo* 試験（試験番号 ABM 03[redacted] 及び ABM 01[redacted]）を実施した。その結果、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、止血までの時間及び aPTT の短縮が認められた。発色合成基質法による FVIII アッセイに基づき投与量を調整すると、CSL627 の総失血量及び止血までの時間は市販の rFVIII 製剤（Helixate®、ReFacto AF®及び Advate®）と実質的な差異はなかった。したがって、これらの試験成績から、血友病 A 患者における本剤の臨床的効果が適切に反映され予測されると考えられる。

以上のように、CSL627 は *in vitro* 試験並びに血友病 A マウスを用いた *ex vivo* 及び *in vivo* 試験で薬力学的効果を示した。発色合成基質法による FVIII アッセイに基づき投与量を調整した場合、CSL627 の効果は市販の rFVIII 製剤（Advate®、Helixate®及び ReFacto AF®）と差異がなかった。

安全性薬理評価は適切な場合には毒性試験の一部として実施し、必要に応じて独立した安全性薬理試験により補完した。

ラット（試験番号 APQ0013）及びカニクイザル（試験番号 APQ0014）の 28 日間反復投与毒性試験において、それぞれ最高 1250 IU/kg/日及び 500 IU/kg/日までの投与量で安全性薬理評価を行った。ラットでの試験では、Irwin テストにより CSL627 の中枢神経系に及ぼす影響を検討した結果、投与に関連した臨床症状の変化は認められなかった。

カニクイザルの反復投与毒性試験（試験番号 APQ0014）に組み込んで、電気生理学的パラメーター及び血圧について評価した。さらに、CSL627 の血行動態及び電気生理学的パラメ

ーター並びに呼吸系に及ぼす影響について、イヌ（試験番号 APQ0016 及び APQ0018）及びサル（試験番号 APQ0019）を用いた麻酔下又はテレメトリー試験で検討した結果、累積投与量 1550 IU/kg まで CSL627 の投与に起因する有害所見は認められなかった。これらの試験成績から総合的に判断して、CSL627 の投与は心臓の電気生理学的機能及び血行動態、並びに呼吸系機能に影響を及ぼさないと考えられた。

以上のように、実施した非臨床の毒性・安全性薬理試験から CSL627 の優れた忍容性及び高い安全性プロファイルが示された。これらの試験成績から、CSL627 は安全性上の懸念はないと考えられた。したがって、CSL627 は血友病 A 患者の治療に有効かつ安全な薬剤であることが示唆された。

2.4.3. 薬物動態試験

CSL627 の PK を評価するため、サル（試験番号 APQ0015、試験番号 APQ0020）及び FVIII KO マウス（試験番号 PSM 06[redacted]）を用いて単回静脈内投与の 3 試験を実施した。本剤の臨床投与経路は静脈内投与のみであるため、非臨床試験ではその他の投与経路については検討しなかった。さらに、単回及び反復投与毒性試験の一部として PK 解析（TK）を行った。

FVIII KO マウスで CSL627 の PK を評価し、CSL627 のプロファイルと臨床で同様に適用される他の rFVIII 製剤のプロファイルの比較、すなわち全長製剤 Helixate®及び Advate®、並びに B 領域欠失製剤 ReFacto AF®について、臨床用量 100 IU/kg における FVIII 活性（凝固一段階法）を直接比較し検討した。Helixate®、Advate®及び ReFacto AF®の 3 製剤は既に長期間臨床適用されているため、発色合成基質法及び凝固一段階法で測定した FVIII 活性により得たこれらの市販製剤との直接比較による PK 解析結果から、CSL627 の臨床用量予測が容易になると考える。

凝固一段階法で測定した FVIII 活性で投与量を調整した 4 種類の被験物質を臨床用量である 100 IU/kg で静脈内投与した。投与 5 及び 30 分後、並びに投与 2、5、8、16、24、32、48 及び 72 時間後に発色合成基質法及び凝固一段階法で血漿中 FVIII 活性を測定した。

その結果、FVIII を欠損した動物において、rFVIII である CSL627 は良好な PK プロファイルを示した。全体的な PK の特徴として、CSL627 は市販されている他の rFVIII 製剤 Helixate®、ReFacto AF®及び Advate®よりも投与後の FVIII 活性が高かったが、投与量調整及び血漿中 FVIII 濃度測定において発色合成基質法又は凝固一段階法のいずれか同一の定量法を用いた場合、他の rFVIII との間で大きな差は認められなかった。したがって、本試験条件は、ヒトでの PK 及び血友病 A 患者での止血効果を最も適切に反映し、予測できる可能性がある。血友病 A マウスで他の rFVIII 濃縮製剤と比較して得られた CSL627 の良好な PK プロファイルは、CSL627 を投与量 50 及び 250 IU/kg でカニクイザルに投与した試験から得られた結果と一致している（試験番号 APQ0015、試験番号 APQ0020）。

APQ0015 試験では、CSL627 を投与量 50 及び 250 IU/kg で 1 群当たり雌雄各 1 例の計 4 例のカニクイザルに単回静脈内ボーラス投与し、薬物動態について検討した。比較対照群には、別途 4 例の動物に FVIII として同一投与量の Helixate®を静脈内投与し、また 2 例の動物に

ReFacto AF®を投与量 250 IU/kg で静脈内投与した。各被験物質の投与前、投与後 15 及び 30 分、並びに投与後 1、2、4、6、12 及び 24 時間に採血した。

CSL627 あるいは FVIII 濃縮製剤（Helixate®又は ReFacto AF®）を投与量 250 IU/kg でカニクイザルに単回静脈内投与した結果、いずれも忍容性は良好であり、悪影響は認められなかった。

CSL627 の推定平均滞留時間及び平均終末相半減期はそれぞれ 13.5 時間及び 9.6 時間であり、ReFacto AF®（13.0 時間及び 10.2 時間）とほぼ同等であり、Helixate®（8.8 時間及び 7.3 時間）よりも長かった（投与量はいずれも 250 IU/kg）。CSL627 の AUC_{24h}（98 IU•h/mL）は ReFacto AF®（76 IU•h/mL）及び Helixate®（62 IU•h/mL）よりも大きく、CSL627 のクリアランス（2.1 mL/h/kg）は ReFacto AF®（2.7 mL/h/kg）及び Helixate®（3.7 mL/h/kg）よりも低値であった。

APQ0020 試験では、CSL627 を投与量 250 IU/kg で単回静脈内投与し、その PK を市販の rFVIII 製剤である Advate®と比較した。血漿サンプルの分析のため、すべての動物（1 群当たり雌雄各 1 例）から、被験物質の投与前、投与後 15 及び 30 分、並びに投与後 1、2、4、6、12 及び 24 時間に静脈血を採取した。

CSL627 及び比較対照製剤の Advate®を投与量 250 IU/kg 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、投与による一般状態の変化及び反応は観察されず、投与に関連すると考えられる投与部位の所見もみられなかった。

CSL627 投与後の FVIII 活性上昇による曝露量は、Advate®投与後の場合と比較して約 2 倍高かった。CSL627 投与後の平均終末相半減期は、Advate®投与後の場合より約 2.7 倍長かった。

以上より、CSL627 は FVIII KO マウス及びカニクイザルにおいて良好な PK プロファイルを示した。

2.4.4. 毒性試験

単回及び反復投与毒性試験は、ラット及びサルを使用して実施した。

CSL627 を投与量 50、250 又は 1500 IU/kg で、1 群当たり雌雄各 5 例の [redacted](SD)ラット（試験番号 APQ0010）、及び 1 群当たり雌雄各 3 例のカニクイザル（試験番号 APQ0011）に単回静脈内（ボーラス）投与して全身毒性を評価した。対照群の動物には、最高用量群と同一液量の生理食塩液（0.9%）を投与した。試験期間中、一般状態・死亡の有無の観察、体重・摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、TK 測定、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した。

単回投与毒性試験の一環として実施した TK 試験の結果、線形性が認められ、終末相半減期（$t_{1/2\beta}$）はラット及びカニクイザルで、それぞれ 2.33～5.11 時間及び 7.00～21.5 時間の範囲であった。サルに CSL627 を 50～1500 IU/kg の広い用量範囲で投与すると、用量に比例した曝露量の増加が観察された。ラット及びサルのいずれも、試験に用いたすべての投与量（50～1500 IU/kg）で AUC 値は雌より雄が高値であったが、C_{max} は雌雄とも同程度であった。

ラット及びカニクイザルに CSL627 を最高投与量 1500 IU/kg まで単回静脈内投与すると、毒性学的意義のある変化は認められず、忍容性が良好であった。NOAEL は両動物種とも 1500 IU/kg と考えられ、生命に危険がある場合の臨床最高用量 200 IU/kg/日の 7.5 倍、出血傾向の抑制に適用する場合の臨床最高用量 50 IU/kg/日の 30 倍に相当する。

ラット（試験番号 APQ0013）及びサル（試験番号 APQ0014）を用いて、CSL627 の反復投与毒性試験を実施した。ラットでは CSL627 を投与量 50、250 及び 1250 IU/kg で 28 日間連日静脈内投与し、14 日間の回復期間を設けた。サルには CSL627 を投与量 50、150 及び 500 IU/kg で 28 日間連日静脈内投与した。なお、ラット及びサルの両動物種とも、28 日目の血漿中 FVIII 濃度は検出限界未満又は無視できる値であり、FVIII の曝露量を低下させる抗薬物抗体が産生されたため、28 日間を超える長期の反復投与毒性試験は実施しなかった。

[redacted](SD)ラットに CSL627 を最長 4 週間静脈内（ボーラス）投与し、全身毒性及び TK を評価した（試験番号 APQ0013）。1 群当たり雌雄各 10 例（及び中間屠殺群として雌雄各 5 例）のラット 3 群に、CSL627 を投与量 50、250 又は 1250 IU/kg/日で投与した。対照群の雌雄各 10 例（及び中間屠殺群の雌雄各 5 例）には、最高用量群と同一液量の生理食塩液（0.9%）を投与した。異種のヒト蛋白質に対する免疫応答が発現する前に初期毒性を検討するため、1 群当たり雌雄各 5 例（中間屠殺群）を 6 日目に屠殺した。さらに、投与に起因する影響の回復性を検討するため、対照群と最高用量群（1250 IU/kg/日群）に雌雄各 5 例を割り付けた（回復性試験）。回復性試験の動物には、4 週間投与後 2 週間の休薬期間を設けた。

6 日目には CSL627 に対する免疫応答は認められず（CSL627 に反応する抗 FVIII 抗体を有する動物は 0%）、忍容性は良好であった。しかし、16 日目には 50 IU/kg/日群の雄 30%及び雌 80%、250 及び 1250 IU/kg/日群の雌雄 100%で CSL627 に反応する抗 FVIII 抗体が認められた。28 日目には 50 IU/kg/日群の雌雄 90%、250 及び 1250 IU/kg/日群の雌雄 100%で抗体反応が認められた。

4 週間投与後に 1250 IU/kg/日群の雌雄で aPTT の軽度延長がみられたが、これは予測された変化であり、毒性を示す変化ではなくヒト抗原に対する強い免疫応答の結果と考えられた。異種のヒト FVIII 蛋白質である CSL627 を連日投与した結果、中和活性を有する抗 FVIII 抗体が産生された。抗 FVIII 抗体は内因性の FVIII と交差反応し、aPTT の軽度延長にみられるように、凝固反応を阻害することが明らかとなった。

中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化、剖検所見又は病理組織学的変化は認められなかった。

以上より、ラットに CSL627 を最高投与量 1250 IU/kg/日まで 6 又は 28 日間反復静脈内（ボーラス）投与すると、有害作用を示唆する所見は認められず、忍容性が良好であった。16 及び 28 日間投与後には、投薬群で CSL627 に対する抗体産生を示す免疫応答が認められたが、この免疫応答により CSL627 の毒性評価が妨げられることはなかった。本試験条件下で、NOAEL は最高投与量の 1250 IU/kg/日と考えられた。

カニクイザルに CSL627 を 4 週間静脈内（ボーラス）投与、並びに試験途中の 6 日目に中間屠殺して全身毒性及び TK を評価した（試験番号 APQ0014）。1 群当たり雌雄各 3 例のカニクイザル 3 群に、CSL627 を投与量 50、150 又は 500 IU/kg/日で 4 週間連日投与した。対照群の雌雄各 3 例には、最高投与量群と同一液量の生理食塩液（0.9%）を投薬群と同様の頻度で投与した。また、異種のヒト蛋白質に対する免疫応答が発現する前に初期毒性を検討するため、1 群当たり雌雄各 1 例を各投薬群に割り付け、5 日間投与後の 6 日目に中間屠殺した（6 日目中間屠殺群）。

全体として、カニクイザルに CSL627 を最高投与量 500 IU/kg/日まで反復静脈内（ボーラス）投与すると、概ね忍容性が良好であった。

投与に関連した一般状態の変化として、6 日目以降に 150 IU/kg/日群の雌雄全例、並びに 500 IU/kg/日群の雄 4 例中 3 例及び雌の全例で、一過性の振戦がみられた。振戦の発現は、6 日目以降にみられた CSL627 に対する抗 FVIII 抗体産生の挙動とかなり一致した。したがって、この所見は急性の抗体反応の結果として免疫系の活性化が関与している可能性が考えられる。

被験物質の投与手技に関連した注射部位の紫斑及び腫脹がみられ、病理組織学的検査で血管周囲及び皮下の出血が認められた。しかし、これらの変化は生理食塩液を投与した対照群を含むすべての群に発現し、その発現頻度及び分布がすべての群でほぼ同等であったことから、CSL627 投与との関連はないと考えられた。

以上より、カニクイザルに CSL627 を最高用量 500 IU/kg/日で静脈内（ボーラス）投与すると、忍容性が良好であった。13 及び 28 日間投与後には、CSL627 投与群で CSL627 に対する抗体産生を示す免疫応答が認められた。本試験条件下で、NOAEL は試験に用いた最高投与量の 500 IU/kg/日と考えられた。

ウサギに CSL627 を静脈内、動脈内及び静脈周囲投与（各投与経路について雄 3 例を使用）して、局所刺激性試験を実施した。観察期間中、いずれの動物においても毒性徴候や一般状態の不良はみられず、体重増加に CSL627 投与の影響はないと考えられた。総合的に判断して、CSL627 を静脈内、動脈内及び静脈周囲に投与すると、投薬に起因する局所的又は全身的な所見は認められず、忍容性が良好であった。生存中に観察された肉眼的所見及び病理組織学的所見は、投与手法に起因する変化と考えられた。

さらに、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験で局所刺激性について評価した結果、CSL627 の静脈内投与では忍容性が良好であった。

CSL627 の血栓形成作用について検討するため、血栓形成性試験を実施した。Wessler の方法（Wessler et al., 1955）を基に Giles が改変した方法（Giles et al., 1980）に準じた、ウサギの *in vivo* 血栓形成性試験を用いて、実験的に血栓形成作用を評価した。

CSL627 の血栓形成リスクを検討するため、適切な静脈を結紮することにより一過性の静脈うっ血を誘発した血栓モデルを使用した。血栓形成リスクを評価するためのパラメーターとして、血栓の発現頻度及び乾燥重量を用いた。今回の血栓形成性試験では、1 群当たり 6

例（雌雄各 3 例）のウサギに、CSL627 を投与量 150、300、500 及び 1000 IU/kg で静脈内投与し、CSL627 の血栓形成作用を評価した。12 例（雌雄各 6 例）のウサギには、生理食塩液を投与してプラセボ群（陰性対照）とした。FEIBA NF 500E はプロトロンビン複合体として活性化因子及び非活性化因子を含有しており、複数の部位で血液凝固カスケードを活性化する（FVIII の作用をバイパスする）ことから、FEIBA NF 500E を陽性対照として用いた。FEIBA NF 500E は FVIII を含有しないので、非活性化 rFVIII 分子からなる別の対照薬として ReFacto AF® 1000IE を用いた。

本試験条件下で CSL627 は投与量 1000 IU/kg で軽微な血栓形成性を示し、NOAEL は 500 IU/kg と考えられた。ReFacto AF®を 500 IU/kg の用量で投与すると、CSL627 を 500～1000 IU/kg のレンジで投与した場合の中間に相当する作用が認められた。げっ歯類における高濃度の血漿中 FVIII に伴う血栓形成リスクは、すでに報告されており（Kawasaki et al., 1999）、予測された所見である。血漿中 FVIII 濃度の長期にわたる上昇（ヒトでもリスク因子として認識される）により、vWF 上で FVIII 結合サイトを増加させると考えられ、最終的には、凝固カスケードの関与した成長中の血栓に送達される FVIII が増加すると考えられている（Kamphuisen et al., 2001）。

2.4.5. 総括及び結論

CSL627 の非臨床試験として、FVIII 欠損（FVIII KO）マウス、ラット及びサルを用いた薬力学的試験、ラット及びサルの反復投与による安全性薬理試験、カニクイザル及び FVIII 欠損マウスを用いた薬物動態試験、並びにラット及びサルの（TK 解析を含む）単回及び反復投与毒性試験を実施した。ラット及びカニクイザルは rFVIII 製剤の ReFacto AF®、Advate®及びその先行品である Recombinate®のような市販同効薬の安全性評価に使用されており、CSL627 と直接比較が可能であることから、CSL627 の毒性評価において薬理学的に適切な動物種として選択した。また、これらの動物種には膨大な背景データが存在し、いずれも医薬品の承認申請を目的として実施される非臨床試験で広く使用される動物種である。さらに、ヒト FVIII 濃縮製剤の曝露によりラットで出血時間及び凝固時間が短縮することを示した Elg らの試験（Elg et al., 2001）に基づき、CSL627 はこれらの動物種で薬理作用を示すと考えられる。反復投与試験では交差反応性を有する抗薬物抗体（ADA）が産生され、外因性及び内因性の血漿 FVIII 活性が中和されて軽度の aPTT 延長がみられることからも、CSL627 が内因性の FVIII と極めて類似することが示される。したがって、CSL627 はラット及び特にカニクイザルで薬力学的活性を示す可能性が非常に高い。類似した観察結果が ReFacto AF®/Xyntha®で報告されており（Pharmacology / Toxicology Review Memorandum, www.fda.gov）、ヒト FVIII 濃縮製剤をサルに投与すると止血効果を示すことが裏付けられる。最後に、CSL627 は CD ラット及びカニクイザルで濃度依存的にトロンビン生成を増加させたことから、両動物種で *in vitro* の薬理効果が示された。

CSL627 について実施した非臨床試験において、血液凝固因子欠損の患者と類似した凝固系の欠損を示し、血友病 A 患者と同様に出血リスクの増大がみられる FVIII 欠損マウス

（Øvlisen et al., 2008）を使用した *ex vivo* 及び *in vivo* 試験で、CSL627 の薬力学的効果が示された。CSL627 及び Advate®を投与量 20 IU/kg で静脈内投与した *ex vivo* 試験では、TEG/TEM、トロンビン生成及び aPTT に関して同等の薬力学的効果が認められた。CSL627 の投与量 1～150 IU/kg において、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、止血までの時間及び aPTT の短縮が観察された。投与量を発色合成基質法で測定した FVIII 活性で補正すると、CSL627 の効力は市販の rFVIII 製剤（Advate®、Helixate®及び ReFacto AF®）と差異がなかった。

CSL627 をラット及びカニクイザルに、それぞれ最高 1250 IU/kg/日及び 500 IU/kg/日までの投与量で 28 日間反復投与し、安全性薬理評価を行った。ラットの Irwin テストにより CSL627 の神経行動学的影響を検討した結果、投与に関連した臨床症状の変化は観察されなかった。また、中枢神経系への影響を示唆する肉眼的又は病理組織学的変化も認められなかった。カニクイザルの反復投与毒性試験に組み込んで、電気生理学的パラメーター及び血圧について評価した。さらに、イヌ及びサルを使用した麻酔下又は覚醒（テレメトリー）条件下の安全性薬理試験で、血行動態及び電気生理学的パラメーター並びに呼吸系機能に及ぼす CSL627 の影響について検討した。その結果、累積投与量 1550 IU/kg まで投与に起因する有害所見は認められなかった。これらの試験成績から総合的に判断して、CSL627 の投与は心臓の電気生理学的機能及び血行動態並びに呼吸系機能に影響を及ぼさないと考えられた。

カニクイザルにおける CSL627 の PK データは実施された試験の範囲で線形性であった。CSL627 の推定平均滞留時間及び平均終末相半減期はそれぞれ 13.5 時間及び 9.6 時間であり、ReFacto AF®とほぼ同等で、Helixate®よりも長かった。CSL627 の AUC_{24h}（98 IU•h/mL）は ReFacto AF®（76 IU•h/mL）及び Helixate®（62 IU•h/mL）よりも高く、CSL627 のクリアランス（2.1 mL/h/kg）は ReFacto AF®（2.7 mL/h/kg）及び Helixate®（3.7 mL/h/kg）よりも低値であった。CSL627 投与後の FVIII 活性上昇に基づく曝露量は Advate®投与後の場合よりも約 2 倍高かった。CSL627 投与後の平均終末相半減期は Advate®投与後の場合より約 2.7 倍長かった。CSL627 の半減期は用量依存的でないことが示された。

単回投与毒性試験の一環として実施したトキシコキネティクス解析の結果、線形性が認められ、$t_{1/2\beta}$ はラットで 2.33～5.11 時間、カニクイザルで 7.00～21.5 時間の範囲であった。サルに CSL627 を 50～1500 IU/kg の広い用量範囲で投与すると、投与量に比例した曝露量の増加が観察された。ラット及びサルのいずれも、試験に用いたすべての投与量（50～1500 IU/kg）で AUC 値は雌より雄が高値であったが、C_{max} は雌雄とも同程度であった。曝露量に関する性差の原因及びヒトとの関連性について、CSL ベーリング社で確認した範囲では公表された文献は見当たらなかった（性差に関する文献がなかったが、対象患者がほぼすべて男性であることが原因である可能性が高い）。

ラット及びカニクイザルに CSL627 を最高投与量 1500 IU/kg まで単回静脈内投与すると、毒性学的意義のある変化は認められず、忍容性が良好であった。NOAEL は両動物種とも 1500 IU/kg と考えられ、生命に危険がある場合の臨床最高用量である 200 IU/kg/日の 7.5 倍、出血傾向の抑制に適用する場合の臨床最高用量である 50 IU/kg/日の 30 倍に相当する。

ラットに最高投与量 1250 IU/kg/日まで 28 日間連日反復投与した結果、毒性を示唆する有害所見は認められず、忍容性が良好であった。CSL627 投与群で 28 日間投与後に CSL627 に対する抗体産生を示す免疫応答が認められ、60 例中 51 例では 16 日目に最初の反応が観察された。

カニクイザルに最高投与量 500 IU/kg/日まで 28 日間反復投与した場合にも、有害所見は認められず、忍容性が良好であった。ラットでみられたように、多くの動物（カニクイザル）で抗 CSL627 抗体が産生され、広範な急性の ADA 反応の下で、CSL627 の曝露量が減少することを示す血漿中 FVIII 濃度の低下に直接関連する。また、ADA 反応は凝固時間（aPTT）の延長とも関連し、ADA が内因性 FVIII の凝固作用と交差反応することを示している。

これらの試験条件下での NOAEL は、ラット及びカニクイザルで試験に用いた最高投与量、それぞれ 1250 IU/kg/日及び 500 IU/kg/日と推定され、生命に危険がある場合の臨床最高用量 200 IU/kg/日の少なくとも 6.3 倍及び 2.5 倍、出血傾向を抑制する場合の臨床用量 50 IU/kg/日の 25 倍及び 10 倍に相当する。

局所刺激性に関して、CSL627 はウサギの静脈内、動脈内及び静脈周囲投与、並びにラット及びサルの静脈内投与による忍容性が良好であった。

ウサギの Wessler うっ血モデル変法を用い、CSL627 の血栓形成性について検討した。本試験条件下で、CSL627 は投与量 1000 IU/kg で軽微な血栓形成性を示し、NOAEL は 500 IU/kg と考えられた。げっ歯類での高濃度の血漿中 FVIII に伴う血栓形成リスクは、すでに報告されおり（Kawasaki et al., 1999）、予測された所見である。血漿中 FVIII 濃度の長期にわたる上昇（ヒトでもリスク因子として認識される）により、vWF 上で FVIII 結合サイトを増加させると考えられ、最終的には、凝固カスケードの関与した成長中の血栓に送達される FVIII が増加すると考えられている（Kamphuisen et al., 2001）。

全体として、CSL627 の安全性薬理試験及び毒性試験では、CSL627 投与により有害な全身毒性を示す所見はみられず、忍容性が良好であり、安全性薬理に関わる懸念や血栓形成性及び局所刺激性も認められなかった。

また、CSL627 の非臨床試験では、大量出血／外傷の臨床的見地から血友病 A 患者の病態を模した FVIII 欠損モデル動物を用いた、市販 rFVIII 製剤との比較試験で同等の止血効果が示された。

以上のように、CSL627 で実施した非臨床の毒性試験及び安全性薬理試験により、優れた忍容性及び安全性プロファイルが示され、安全性に関わる懸念は認められなかった。したがって、CSL627 は血友病 A 患者の治療に有効かつ安全な薬剤であることが示唆された。

2.4.6. 参考文献一覧

Ananyeva NM, Kouiavskaia DV, Shima M and Saenko EL: Catabolism of the Coagulation Factor VIII. Trends Cardiovasc. Med., 11, 251-257, 2001.

Elg M, Carlsson S and Gustafsson D: Effects of agents, used to treat bleeding disorders, on bleeding time prolonged by a very high dose of a direct thrombin inhibitor in anesthesized rats and rabbits. Thromb. Res., 101, 159-170, 2001.

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

ICH harmonised tripartite guideline: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, S6(R1), Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011.

Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ and Bertina RM: Elevated Factor VIII Levels and the Risk of Thrombosis. Arterioscler Thromb. Vasc. Biol., 21, 731-738, 2001.

Kawasaki T, Kaida T, Arnout J, Vermylen J and Hoylaerts MF: A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma Factor VIII levels are thrombogenic. Thromb. Haemost., 81, 306-311, 1999.

Lenting PJ, Pegon JN, Christophe OD and Denis CV: Factor VIII and von Willebrand factor – too sweet for their own good. Haemophilia, 16 (Suppl. 5), 194-199, 2010.

Matthew PK, Dipak SP, Donald EM and Balu-Iyer SV: Allometry of factor VIII and informed scaling of next-generation therapeutic proteins. J. Pharm. Sci., 102(7), 2380-2394, July 2013.

Meroni PL, Borghi MO, Raschi E and Tedesco F: Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. Nat. Rev. Rheumatol., 7, 330-339, 2011.

Oldenburg J, Ananyeva NM and Saenko EL: Molecular basis of haemophilia A. Haemophilia, 10 (Suppl. 4), 133-139, 2004.

Øvlisen K, Kristensen AT and Tranholm M: *In vivo* models of haemophilia – status on current knowledge of clinical phenotypes and therapeutic interventions. Haemophilia, 14, 248-259, 2008.

Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E and Kalantaridou SN: Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet. Gynecol., 109(5), 1146-1155, May 2007.

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