# ヘムライブラ皮下注30 mg
# ヘムライブラ皮下注60 mg
# ヘムライブラ皮下注90 mg
# ヘムライブラ皮下注105 mg
# ヘムライブラ皮下注150 mg
# （エミシズマブ（遺伝子組換え））

**[インヒビターを保有する先天性血友病A]**

第2部　（モジュール2）：CTDの概要（サマリー）

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

中外製薬株式会社

略語一覧

| 略語 | 英名 | 和名 |
|---|---|---|
| aPCC | activated prothrombin complex concentrate | 活性型プロトロンビン複合体製剤 |
| FIXa | activated factor IX | 活性型血液凝固第 IX 因子 |
| FVIII | factor VIII | 血液凝固第 VIII 因子 |
| FX | factor X | 血液凝固第 X 因子 |
| IgG | immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| QOL | quality of life | 生活の質 |
| rFVIIa | recombinant activated factor VII | 遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子 |

# 目次

頁
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 ..... 4
2.6.1 緒言 ..... 4
2.6.1.1 血友病 A の医療ニーズ ..... 4
2.6.1.2 二重特異性抗体による FVIII 補因子機能の代替（エミシズマブの創製） ..... 4
2.6.1.3 エミシズマブの薬理学的特性 ..... 5
2.6.1.4 承認申請の概要 ..... 5
2.6.1.5 参考文献 ..... 5

# 2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

## 2.6.1 緒言

### 2.6.1.1 血友病Aの医療ニーズ

血友病 A は，FVIII の先天的欠損又は機能不全に起因する出血性疾患である。FVIII をコードする遺伝子は X 染色体上に存在し，遺伝子異常は伴性劣性遺伝形式により発現するため，発症患者のほとんどは男性である。主な出血部位は，関節内，筋肉内，皮下，口腔内，頭蓋内，消化管，鼻腔内などであるが，中でも関節内に繰返し生じる出血は，関節の器質的障害や歩行困難などの機能的障害を伴う血友病性関節症に進展することも多く，血友病 A 患者の QOL を低下させる最大の要因となっている。血友病 A の重症度は，血液中の FVIII 活性により規定されており，FVIII 活性1%未満が重症，1%以上5%以下が中等症，5%を超えて40%未満が軽症と分類される。血友病 A 患者の約50%を占める重症患者は月に数回の出血症状を呈するが，中等症患者及び軽症患者では出血の頻度及び重篤度が顕著に低下する。このことから，重症血友病 A 患者においては，血液中の FVIII 活性を1%以上に維持することが，出血症状の発現阻止に有効と考えられている[1)]。

血友病 A では，FVIII 製剤の補充療法が標準治療として確立されている。FVIII 補充療法は，出血時に FVIII 製剤を投与する間歇的補充療法（on-demand 療法）と，出血症状の発現阻止を目的とした定期補充療法（予防治療法）に大別される。定期補充療法は，血中 FVIII 活性を1%以上に維持することを目標とし，出血の発現抑制，特に関節内での反復出血の抑制に有効であり，近年，先進国においては定期補充療法の浸透率が向上している[2)]。

しかしながら，FVIII 活性を1%以上保持するための標準的な定期補充療法プロトコールでは，週3回の頻回の静脈内投与が必要であり，血管確保の困難さが問題となっている。血管確保の問題は定期補充療法の浸透に対して最大の阻害要因である。以上の定期補充療法における課題から，皮下投与が可能な治療薬，投与頻度が少ない長期作用型の治療薬へのニーズは高い。

更に，FVIII 製剤が投与された重症患者の15～30%に，FVIII に対するインヒビター（中和抗体）が発生し，血友病 A 治療の大きな問題となっている。5 BU（Bethesda unit）/mL 未満の低力価のインヒビター保有患者の多くには，高用量の FVIII 製剤投与による中和療法が第一選択となるが，5 BU/mL 以上の高力価のインヒビター保有患者に対しては，rFVIIa 製剤や aPCC などのバイパス製剤による on-demand 療法が用いられる。しかしながら，バイパス製剤の止血効果は FVIII 製剤に比べ不安定であり，またバイパス製剤も血中半減期が短く頻回の静脈内投与を必要とすることから，止血管理には困難を伴う。近年，aPCC 製剤によるインヒビター保有患者の定期投与療法が適用可能となっているが，止血効果の不安定さ及び頻回の静脈内投与は依然として課題であり，インヒビター非保有患者で求められている以上に，インヒビター保有患者においても皮下投与が可能な治療薬及び投与頻度が少ない長期作用型の治療薬による定期投与療法に対する医療ニーズは高い[3)]。

### 2.6.1.2 二重特異性抗体によるFVIII補因子機能の代替（エミシズマブの創製）

FVIII の補因子としての作用機序のひとつとして，FIXa が FX を活性化するリン脂質膜上の酵素反応において両因子を適切な位置関係に保持することが挙げられる。この科学的前提に基づき，FVIII の補因子機能を「一方の腕で FIXa に結合し，他方の腕で FX に結合する二重特異性抗体（bispecific antibody）」により代替する「FVIII 補因子機能代替抗体」のコンセプトを考案した[4)]。二重特異性抗体は，非対称の構造を有する人工的な抗体分子であり，通常の抗体分子の2個の抗原結合部位が同じ抗原に結合するのに対し，二重特異性抗体は2個の抗原結合部位が異なる抗原に結合する特性を有する。

FIXa 及び FX に結合する FVIII 機能代替抗体は，IgG 分子としての特性から，①血中半減期が長いため投与頻度が少ない，②皮下投与が可能である，③FVIII インヒビター保有患者にも

有効である，④FVIII インヒビターを誘導しない，など，現状の血友病 A 標準治療における課題を克服できると考えられた。我々は，検討を進めた結果，血友病 A 患者における定期投与療法に有効と考えられる FVIII 機能代替活性を有する二重特異性抗体エミシズマブ（遺伝子組換え）（以下，本薬）を創製した[5]。本薬は，FIXa 及び FX を標的とするヒト化二重特異性モノクローナル改変 IgG4抗体である。本薬の創製にあたっては，1) IgG エフェクター機能の低減の観点から IgG4骨格を採用したヒト化改変，2) FVIII 機能代替活性・溶解性・免疫原性等の観点からの最適化，3) 動態・精製効率の観点からの等電点最適化，4) 生産効率化のための L 鎖共通化，などの抗体工学技術が適用されている[5]。

以上の特性を考慮すると，本薬を「FVIII インヒビターを保有する先天性血友病 A 患者における出血傾向抑制を目的とした定期投与療法」に適用することにより，投与頻度が少なく，皮下投与が可能となり，利便性が向上するとともに，血漿中濃度が安定して推移することなどから安定した出血傾向抑制効果が期待でき，インヒビター保有血友病 A 患者の医療課題を克服することが期待される。

### 2.6.1.3 エミシズマブの薬理学的特性

本薬は，FIXa 及び FX に対する遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル改変 IgG4抗体である。本薬は，数 μmol/L 程度の親和性にて FIXa 及び FX と結合し，FIXa による FX の活性化を促進する作用，すなわち FVIII の機能を代替する補因子活性を示した。本薬は，FVIII インヒビター存在下の血漿においても FIXa による FX の活性化を促進し，血友病 A 動物モデルにおいて止血作用を示した[6]。また，本薬は，血友病 A 動物モデルにおいて低頻度の皮下投与で出血傾向抑制作用を示すことが確認されたことから[7]，血友病 A インヒビター患者の現行療法では達成されていない有効な定期投与療法を提供し得ると考えられた。

### 2.6.1.4 承認申請の概要

本申請で予定している効能・効果及び用法・用量については2.2に記載した。

### 2.6.1.5 参考文献


1) Srivastava A, Brewer AK, Mauser-Bunschoten EP, Key NS, Kitchen S, Llinas A, et al. Guidelines for the management of hemophilia. Haemophilia 2013;19:e1-47.
2) Manco-Johnson MJ, Abshire TC, Shapiro AD, Riske B, Hacker MR, Kilcoyne R, et al. Prophylaxis versus episodic treatment to prevent joint disease in boys with severe hemophilia. N Engl J Med 2007;357:535-44.
3) Leissinger CA, Becton DL, Ewing NP, Valentino LA. Prophylactic treatment with activated prothrombin complex concentrate (FEIBA) reduces the frequency of bleeding episodes in paediatric patients with haemophilia A and inhibitors. Haemophilia 2007;13:249-55.
4) Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. Nat Med 2012;18(10):1570-4.
5) Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, Moriyama C, Wakabayashi T, et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. PLoS One 2013;8(2):e57479.
6) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. J Thromb Haemost 2014;12(2):206-13.
7) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. Blood 2014;124(20):3165-71.

# ヘムライブラ皮下注30 mg
# ヘムライブラ皮下注60 mg
# ヘムライブラ皮下注90 mg
# ヘムライブラ皮下注105 mg
# ヘムライブラ皮下注150 mg
# （エミシズマブ（遺伝子組換え））

**［インヒビターを保有する先天性血友病A］**

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

中外製薬株式会社

略語一覧

| 略語 | 英名 | 和名 |
|---|---|---|
| Abs | absorbance | 吸光度，吸光度変化 |
| aPCC | activated prothrombin complex concentrate | 活性型プロトロンビン複合体製剤 |
| APTT | activated partial thromboplastin time | 活性化部分トロンボプラスチン時間 |
| CH5534262 | emicizumab | エミシズマブ |
| cyFcγR | cynomolgus monkey Fcγ receptor | カニクイザル Fcγ レセプター |
| cyFcRn | cynomolgus monkey neonatal Fc receptor | カニクイザル胎児性 Fc レセプター |
| cyFIX | cynomolgus monkey factor IX | カニクイザル血液凝固第 IX 因子 |
| cyFIXa | cynomolgus monkey activated factor IX | カニクイザル活性型血液凝固第 IX 因子 |
| cyFX | cynomolgus monkey factor X | カニクイザル血液凝固第 X 因子 |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay | 酵素免疫測定法 |
| ETP | endogenous thrombin potential | 内因性トロンビン産生能，内因性トロンビンポテンシャル，総トロンビン生成量 |
| FDP | fibrin and fibrinogen degradation products | フィブリン・フィブリノーゲン分解産物 |
| FII | factor II or prothrombin | 血液凝固第 II 因子又はプロトロンビン |
| FIX | factor IX | 血液凝固第 IX 因子 |
| FIXa | activated factor IX | 活性型血液凝固第 IX 因子 |
| FVa | activated factor V | 活性型血液凝固第 V 因子 |
| FVIIa | activated factor VII | 活性型血液凝固第 VII 因子 |
| FVIII | factor VIII | 血液凝固第 VIII 因子 |
| FVIIIa | activated factor VIII | 活性型血液凝固第 VIII 因子 |
| FX | factor X | 血液凝固第 X 因子 |
| FXa | activated factor X | 活性型血液凝固第 X 因子 |
| FXIa | activated factor XI | 活性型血液凝固第 XI 因子 |
| hFcγR | human Fcγ receptor | ヒト Fcγ レセプター |
| hFcRn | human neonatal Fc receptor | ヒト胎児性 Fc レセプター |
| hFIX | human factor IX | ヒト血液凝固第 IX 因子 |
| hFIXa | human activated factor IX | ヒト活性型血液凝固第 IX 因子 |
| hFVa | human activated factor V | ヒト活性型血液凝固第 V 因子 |
| hFVIIa | human activated factor VII | ヒト活性型血液凝固第 VII 因子 |
| hFX | human factor X | ヒト血液凝固第 X 因子 |
| hFXa | human activated factor X | ヒト活性型血液凝固第 X 因子 |
| ICH | International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for human use | 医薬品規制調和国際会議 |
| IgG | immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| IV | intravenous | 静脈内投与 |
| $K_D$ | disassociation constant | 解離定数 |
| NOAEL | no observed adverse effect level | 無毒性量 |
| PT | prothrombin time | プロトロンビン時間 |

| 略語 | 英名 | 和名 |
|---|---|---|
| rpFVIII | recombinant porcine factor VIII | 遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子 |
| SD | standard deviation | 標準偏差 |
| SC | subcutaneous | 皮下投与 |
| TF | tissue factor | 組織因子 |
| ttPeak | time to peak | 最大トロンビン生成量に至るまでの時間 |

# 目次

頁
2.6.2 薬理試験の概要文 ..... 6
2.6.2.1 まとめ ..... 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 ..... 11
2.6.2.2.1 ヒト及びカニクイザルの FIX 及び FX に対する結合性 ..... 11
2.6.2.2.2 ヒトの FIXa による FX の活性化に対するエミシズマブの効果 ..... 11
2.6.2.2.3 カニクイザル，ラット，マウスの各 FIXa による FX の活性化に対するエミシズマブの効果 ..... 12
2.6.2.2.4 血友病 A ヒト血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間に対するエミシズマブの効果 ..... 14
2.6.2.2.5 血友病 A ヒト血漿における FXIa 惹起トロンビン生成に対するエミシズマブの効果 ..... 15
2.6.2.2.6 FVIII 中和カニクイザル血漿におけるトロンビン生成を指標としたエミシズマブの薬理作用 ..... 15
2.6.2.2.7 血友病 A ヒト血漿におけるトロンビン生成を指標とした FVIII 及びバイパス製剤の作用に対するエミシズマブの影響 ..... 16
2.6.2.2.8 酵素アッセイを用いたヒト FIX 及び FX 関連反応に対するエミシズマブの影響 ..... 16
2.6.2.2.9 酵素アッセイを用いたカニクイザル FIX 及び FX 関連反応に対するエミシズマブの影響 ..... 17
2.6.2.2.10 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの効果（0.3，1 及び 3 mg/kg 皮下投与） ..... 18
2.6.2.2.11 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの効果（10 及び 50 mg/kg 皮下投与） ..... 22
2.6.2.2.12 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの効果（静脈内投与） ..... 23
2.6.2.2.13 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおけるエミシズマブの効果 ..... 24
2.6.2.2.14 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの影響（200 mg/kg 皮下投与） ..... 29
2.6.2.2.15 カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおけるエミシズマブの皮下投与部位出血への影響 ..... 30
2.6.2.2.16 カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおけるエミシズマブの皮下剥離部出血への影響 ..... 31
2.6.2.2.17 カニクイザル静脈うっ血モデルにおけるエミシズマブの血栓形成への影響 ..... 32
2.6.2.2.18 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおけるエミシズマブ

とバイパス製剤併用の血栓形成への影響.....32
2.6.2.3 副次的薬理試験.....33
2.6.2.3.1 ヒト及びカニクイザル Fcγ レセプターに対する結合性.....33
2.6.2.3.2 ヒト及びカニクイザル胎児性 Fc レセプターに対する結合性.....35
2.6.2.3.3 ヒト補体 C1q に対する結合性.....36
2.6.2.4 安全性薬理試験.....36
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....36
2.6.2.6 考察及び結論.....37
2.6.2.7 図表.....38
2.6.2.8 参考文献.....39

# 2.6.2 薬理試験の概要文

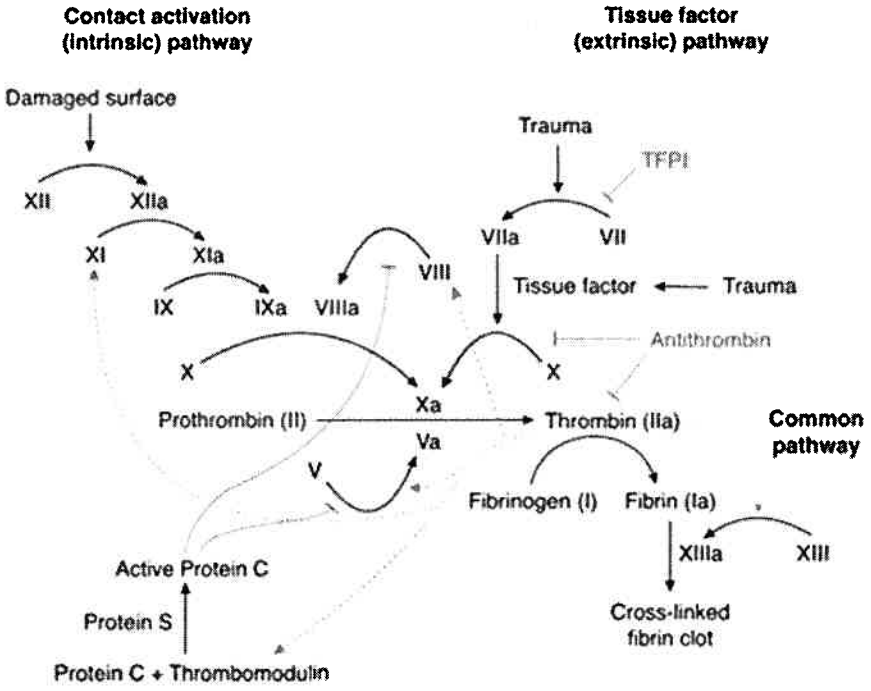
## 2.6.2.1 まとめ

エミシズマブ（以下，本薬）は，FIXa 及び FX に対する遺伝子組換えヒト化二重特異性モノクローナル改変 IgG4抗体である[1]。本薬は，数 μmol/L 程度の親和性にて FIXa 及び FX と結合し，FIXa による FX の活性化を促進する作用，すなわち FVIII の機能を代替する補因子活性を示した。本薬は，FVIII インヒビター存在下の血漿においても FIXa による FX の活性化を促進し，血友病 A 動物モデルにおいて止血作用を示した[2]。また，本薬は，血友病 A 動物モデルにおいて低頻度の皮下投与で出血傾向抑制作用を示すことが確認されたことから[3]，血友病 A インヒビター患者の現行療法[4]では達成されていない有効な定期投与療法を提供し得ると考えられた[2), 3), 5)]。

(1) 凝固系の概略及び本薬の作用

血漿凝固系の活性化経路（実線矢印及び破線矢印）及び阻害経路（実線）の概略を図 2.6.2.1-1に示す。生体での止血作用は，細胞成分も含め高度に制御されており，概略図は血漿凝固系の活性化プロセスの重要な経路を示している。主要な活性化経路として，外因系/組織因子経路及び内因系/接触活性化経路の二つがあり，各経路に相当する凝固検査法として，各々 PT 及び APTT が測定される。生成したトロンビンは，FVIII を FVIIIa へ活性化する等の作用により凝固系を増幅するとともに，フィブリノーゲンを切断してフィブリン形成へ寄与する。血漿凝固系の活性化の研究指標として，トロンビン生成が測定される。

図 2.6.2.1-1 凝固経路




FVIII は，FIXa による FX 活性化の酵素反応を促進する補因子として機能する。血漿中で凝固反応が開始され，少量のトロンビンが生成されると，FVIII はトロンビンによる酵素的切断を受け，FVIIIa に変換される。FVIIIa は，FIXa による FX 活性化反応を数十万倍に促進することから，血液凝固反応を初期相（initiation phase）から増幅相（propagation phase）での爆発的

な凝固反応へ進展させる過程で，重要な役割を担っている。止血血栓の形成には，FIXa が，活性化血小板上で，FVIIIa と複合体を形成する必要がある。活性化血小板上で結合したこの複合体により FX が活性化される。血友病 A は FVIII の欠損又は機能低下に起因しているが，本薬は，FIXa と FX へ直接結合して FIXa による FX 活性化を促進する作用，すなわち FVIII の機能を代替する補因子活性を有すること，また，血友病 A 病態において出血傾向抑制作用及び止血作用を示すことを以下の効力を裏付ける試験にて明らかとした。

(2) 効力を裏付ける試験

薬効薬理試験として，本薬の効果及び作用機序を各種 *in vitro* 及び *in vivo* の試験により検討した。薬効薬理試験（*in vitro*）では，本薬の FVIII 機能代替の補因子活性及び特性を調べるために，FIX，FX，FIXa 及び FXa に対する結合能，及び合成発色基質を用いた酵素アッセイにおける FIXa による FX 活性化を促進する活性を検討した。また，合成発色基質を用いた酵素アッセイにおいて，カニクイザル，ラット又はマウスの凝固因子を用いて交差反応性を検討した。更に，血友病 A ヒト血漿（FVIII 欠乏ヒト血漿）を用いて，APTT に対する効果，及び FXIa により惹起されたトロンビン生成に対する効果を検討した。加えて，FVIII 欠乏ヒト血漿を用いたトロンビン生成試験において，FVIII 及びバイパス製剤（FVIIa 及び aPCC）の作用に対する本薬の影響を検討した。また，合成発色基質を用いた酵素アッセイを用いて，FIX 及び FX が関連する各種凝固反応に対する本薬の影響を検討した。

薬効薬理試験（*in vivo*）では，サル FVIII に対する中和抗体を投与後に筋肉内穿刺等の施術により出血を惹起するカニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬の出血傾向抑制効果及び止血効果を検討した。また，抗サル FVIII 中和抗体を反復投与して，日常行動・操作により生じる出血（自然出血）を8週間観察するカニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおいて，本薬の出血傾向抑制効果を検討した。更に，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害の出血への影響を評価するため，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬高用量投与（200 mg/kg）の影響を検討した。また，カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおいて，本薬の皮下投与部位出血への影響及び皮下剥離傷害部位への本薬皮下投与の影響についても検討した。加えて，本薬の凝固反応促進活性が血栓形成リスクを増大させるかを評価するため，カニクイザル静脈うっ血モデル及びカニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおいて，本薬の血栓形成への影響を検討した。

1) 薬効薬理試験（*in vitro*）

① 抗原への結合性

本薬は，表面プラズモン共鳴を用いた結合測定において数 μmol/L 程度の親和性にて，ヒト FIX（hFIX），ヒト FX（hFX），ヒト活性型 FIX（hFIXa），ヒト活性型 FX（hFXa），カニクイザル FIX（cyFIX）及びカニクイザル FX（cyFX）に対して濃度依存的に結合した。

② FVIII 機能代替活性

本薬は，合成発色基質を用いた酵素アッセイにおいて濃度依存的に FIXa による FX の活性化を促進した。また，合成発色基質を用いた酵素アッセイにおいて本薬はカニクイザルに交差し，ラット及びマウスには交差しなかった。更に，本薬は，FVIII 欠乏ヒト血漿において，APTT の濃度依存的短縮，すなわち血漿凝固促進活性を示し，かつ FXIa により惹起したトロンビン生成量の経時的変化から算出したパラメータを濃度依存的に改善し，トロンビン生成を促進した。以上より，本薬は FIXa による FX 活性化を促進する活性，すなわち FVIII 機能代替活性を有し，FVIII 欠乏ヒト血漿において凝固促進活性を有することが明らかとなった。

③ FVIII 又はバイパス製剤共存下での作用

本薬は，FVIII 欠乏ヒト血漿を用いたトロンビン生成試験において，FVIII 又は aPCC との併用でトロンビン生成を更に促進させた。また，本薬は，低濃度の FVIIa 添加時の Lag time を延長させたことから，FVIIa との併用でトロンビン生成開始時間を延長させる場合があることが示されたが，FVIIa 添加時の Peak height 及び内因性トロンビン産生能（ETP）を増加させたことから，FVIIa と本薬の併用により，トロンビン生成量は更に増加することが示された。

④ FIX 及び FX 関連反応への影響

合成発色基質を用いた酵素アッセイにより，FIX 及び FX が関連する各種反応，すなわち（1）FXIa による FIX 活性化：N1反応，（2）FVIIa/組織因子（TF）による FIX 活性化：N2反応，（3）FIXa/FVIIIa による FX 活性化：N3反応，（4）FVIIa/TF による FX 活性化：N5反応及び（5）FXa/FVa によるプロトロンビン（FII）活性化：N6反応，の5つの反応に対する本薬の影響を検討した。本試験において，3つの反応（N3，N5及び N6）において本薬による阻害作用がみられ，1つの反応（N1）において弱い阻害作用がみられた。

2) 薬効薬理試験（*in vivo*）

① 皮下投与による人為的出血に対する出血傾向抑制効果

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいては，出血に伴う血液ヘモグロビン濃度低下が生じ，体表に出血痕が観察された。本薬の皮下投与（0.3，1又は3 mg/kg）により，対照群と比べて，この血液ヘモグロビン濃度低下は用量依存的に抑制される傾向を示し，体表にみられる出血痕面積は1及び3 mg/kg の用量で有意に抑制された。同様のカニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬の皮下投与（50 mg/kg）により，溶媒投与群と比べて，血液ヘモグロビン濃度低下及び体表にみられる出血痕面積は有意に抑制された。本薬の皮下投与（10 mg/kg）においても，これらの出血症状が抑制される傾向がみられた。これらのことから，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける本薬の皮下投与による出血傾向抑制効果が確認された。

② 静脈内投与による人為的出血に対する止血効果

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，出血刺激後の本薬静脈内投与（0.3，1又は3 mg/kg）により，対照群と比べて，血液ヘモグロビン濃度低下は用量依存的に抑制される傾向を示し，体表にみられる出血痕面積は1及び3 mg/kg の用量で有意に抑制された。これらのことから，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける本薬の静脈内投与による止血効果が確認された。

③ 反復皮下投与による自然出血に対する出血傾向抑制効果

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおいて，本薬は，初回（Day 0）の3.97 mg/kg 単回皮下投与及び2回目（Day 7）以降の1 mg/kg 週1回計7回反復皮下投与の用量用法により，血液ヘモグロビン濃度の観察期間中の最小値，及び出血症状（体表の出血痕，血尿，関節内出血による関節障害に伴う跛行）がみられない日数を，溶媒投与群と比較して有意に増加させた。また，本薬は，跛行が観察された日数，及び Day 56剖検時に関節内出血が認められた関節数を，溶媒投与群と比較して有意に減少させた。以上より，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおいて，本薬は，関節内出血を含め血友病 A に特徴的な出血症状に対して抑制効果を示すことが確認された。

④ 出血に対する高用量及び高濃度の影響

*In vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害（2.6.2.2.8及び2.6.2.2.9）の出血への影響を評価するため，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬高用量皮下投与（200 mg/kg）の影響を検討した。その結果，200 mg/kg の本薬を皮下投与

しても出血は増加せず，逆に出血傾向が有意に抑制されたことから，本モデルにおいて，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害は，*in vivo* での出血増加をもたらさないことが明らかとなった。

カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおいて，本薬の皮下投与部位の出血について検討した結果，外貌からの観察では全投与部位で変化が認められなかった。一部の投与部位の皮下織において，肉眼的に暗赤色部がみられ，病理組織学的には軽微あるいは軽度な出血性変化がみられた。各投与部位皮下織におけるこれらの暗赤色部は，溶媒と本薬の比較において，その大きさに明らかな差はみられず，発現頻度にも大差はなかった。以上より，投与部位皮下織における暗赤色部は，投与手技（注射針の刺入による物理的影響等）に起因する変化の可能性が考えられた。

本薬を皮下投与（10 mg/kg）して4日目のカニクイザルにサル FVIII に対する中和抗体を投与して血友病 A 病態にしたのち，皮下剥離により出血を惹起した。この皮下剥離傷害部に本薬（80 mg/mL）を皮下投与して，皮下剥離部出血に対する本薬高濃度の影響を評価した。剥離部ごとの体表出血痕面積は，溶媒投与群と比較して本薬投与群で有意に抑制されたことから，本モデルにおいて血友病 A の定期投与療法として本薬を反復皮下投与しているときに，投与部位に出血刺激が加わっても，投与した高濃度の本薬が出血を増悪させる可能性は低いことが示された。

⑤ 血栓形成への影響

本薬の凝固反応促進活性が血栓形成リスクを増大させるかを評価するため，カニクイザル静脈うっ血モデルにおいて，本薬の血栓形成への影響を検討した結果，投与なし（対照）では，うっ血部位に血栓がほとんど観察されないのに対して，陽性対照である FVIIa の静脈内投与では，うっ血部位の血栓重量が有意に増加した。本薬及び FVIII の静脈内投与でもうっ血部位に血栓が生じ，その血栓重量は FVIIa 投与で生じる血栓重量を著しく上回るものではなかった。以上より，本薬が血栓を生じるリスクは，FVIIa 及び FVIII でみられる血栓形成リスクを著しく上回るものではないと考えられた。

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおいて，本薬とバイパス製剤を併用した場合の血栓形成への影響を検討した。対照（投与なし）群及び本薬単独投与群では，いずれのうっ血部位においても血栓がみられなかったのに対して，FVIIa 又は aPCC の単独投与群では，うっ血部位に血栓がみられた。この血栓重量は，FVIIa 投与群よりも aPCC 投与群において増加する傾向がみられた。本薬と FVIIa 又は aPCC の併用投与群では，うっ血部位に血栓がみられ，この併用時の血栓重量は，aPCC 単独投与群の最大値よりも増加した例もあったが，それぞれ FVIIa 又は aPCC の単独投与群と比較して，有意な差はみられなかった。以上より，本薬と FVIIa 又は aPCC を併用した場合の血栓形成リスクは，aPCC 単独でみられる血栓形成リスクを著しく上回る可能性は低いと考えられた。

⑥ 薬効薬理試験（*in vivo*）のまとめ

本薬は，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて出血傾向抑制効果及び止血効果を示したこと，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおいて出血傾向抑制効果を示したことから，本薬による FVIII 機能代替は，血友病 A の有効な治療方法のひとつとなると考えられた。また，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける本薬高用量皮下投与（200 mg/kg）及びカニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおける皮下剥離傷害部への本薬高濃度皮下投与（80 mg/mL）は，出血を増悪させず，逆に出血傾向を有意に抑制したことから，これらのモデルにおいて，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害は，*in vivo* での出血増加をもたらさないことが明らかになった。更に，カニクイザル静脈うっ血モデルにおいて本薬が血栓を生じるリスクは，FVIIa 及び FVIII でみられる血栓形成リスクを著しく上回るものではないと考えられ，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈

うっ血モデルにおいて本薬とFVIIa又はaPCCを併用した場合の血栓形成リスクは，aPCC単独でみられる血栓形成リスクを著しく上回る可能性は低いと考えられた。

(3) 副次的薬理試験

1) Fc領域の結合性

① Fcγレセプターへの結合性

抗体が定常領域を介したエフェクター作用を発揮する上で重要な分子であるFcγレセプターに対する本薬の結合性を表面プラズモン共鳴にて検討した。ヒト及びカニクイザルのFcγレセプターに対して，定常領域が改変IgG4である本薬は，同領域がIgG1であるリツキシマブ及びIgG4であるナタリズマブと比べて，結合量が極端に増加することはなかった。このため，ヒトFcγレセプターとの結合の観点において，定常領域を介したエフェクター作用を発現するリスクは低いと考えられた。

② 胎児性Fcレセプターへの結合性

ヒト胎児性Fcレセプター（hFcRn）及びカニクイザル胎児性Fcレセプター（cyFcRn）に対する本薬の結合性を表面プラズモン共鳴にて検討した。pH 7.4では，hFcRn及びcyFcRnのいずれも，6 μmol/Lまでの濃度範囲において，本薬又はナタリズマブにほとんど結合しなかった。pH 6.0では，本薬及びナタリズマブのhFcRnに対する結合の$K_D$値は，それぞれ3.1～3.6 μmol/L及び2.4～2.5 μmol/Lであった。また，本薬及びナタリズマブのcyFcRnに対する結合の$K_D$値は，それぞれ2.8～3.1 μmol/L及び2.1～2.3 μmol/Lであった。本薬はhFcRn及びcyFcRnに対して，ナタリズマブすなわち通常のIgG4抗体と同等の親和性及びpH依存性の結合を示すことが確認された。

③ 補体C1qへの結合性

ヒト補体C1のサブユニットC1qに対する本薬の結合性をELISA法により評価した。ヒト補体C1qに対して，定常領域が改変IgG4である本薬は，IgG4であるナタリズマブとほぼ同程度の結合性を示し，また，IgG1であるリツキシマブと比べると，その結合性は顕著に弱かった。したがって，ヒトC1qとの結合の観点において，本薬が定常領域を介したエフェクター作用を発現するリスクは低いと考えられた。

(4) 安全性薬理試験

本薬の中枢神経系，呼吸器系及び心血管系への影響について，カニクイザルを用いた13週間皮下投与試験及び26週間皮下投与試験における一般状態観察，神経行動学的機能観察（13週間試験でのみ実施），心電図検査及び病理学的検査により評価した結果，本薬の皮下投与による影響は認められなかった。また，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験における一般状態観察，心電図検査及び病理学的検査により，中枢神経系，呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響を評価した結果，本薬の影響は認められなかった。

本剤に含まれる新添加物L-アスパラギン酸の中枢神経系，呼吸器系及び心血管系への影響について，本薬のカニクイザルを用いた13週間皮下投与試験及び26週間皮下投与試験の対照群における一般状態観察，神経行動学的機能観察（13週間皮下投与試験でのみ実施），心電図検査及び病理学的検査により評価した結果，溶媒（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成でありL-アスパラギン酸を含む）の皮下投与に関連した毒性は認められなかった。また，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験の対照群における一般状態観察，心電図検査及び病理学的検査により評価した結果，溶媒（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成でありL-アスパラギン酸を含む）の静脈内投与に関連した毒性は認められなかった。

(5) 薬力学的薬物相互作用試験

本薬と FVIII 又はバイパス製剤を組み合わせて添加した FVIII 欠乏ヒト血漿のトロンビン生成試験を実施し，FVIII 及びバイパス製剤の作用に対する本薬の影響を検討した（2.6.2.2.7）。また，カニクイザル静脈うっ血モデルにおいて本薬と FVIII が共存した場合の血栓形成への影響を検討し（2.6.2.2.17），カニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおいて本薬とバイパス製剤を併用した場合の血栓形成への影響を検討した（2.6.2.2.18）。これらは，本薬と FVIII 又はバイパス製剤との相互作用を検討した試験ではあるが，効力を裏付ける試験でもあるため，詳細は効力を裏付ける試験の項にまとめて記載した。

## 2.6.2.2 効力を裏付ける試験

薬効薬理試験では，本薬に対し CH5534262，RO5534262又は ACE910という呼称も用いているため，試験結果を示す図表又は文献中では，本薬が CH5534262，RO5534262又は ACE910と表記される場合もある。

### 2.6.2.2.1 ヒト及びカニクイザルの FIX 及び FX に対する結合性

（資料番号4.2.1.1-1及び資料番号4.2.1.1-2）

表面プラズモン共鳴法を用いて，hFIX，hFX，hFIXa，hFXa，cyFIX 及び cyFX に対する本薬の結合性を検討した。なお，陰性対照物質として本薬と同じ IgG4サブクラスであるナタリズマブを用いた。hFIX，hFX，hFIXa，hFXa，cyFIX 及び cyFX は，本薬と濃度依存的に結合した（4.2.1.1-1 Figure 1）。これら各凝固因子は，ナタリズマブに対して，いずれも640 nmol/L までの濃度範囲において結合性を示さなかった（4.2.1.1-1 Figure 2）。

表面プラズモン共鳴法を用いて，本薬の hFIX，hFIXa，hFX 及び hFXa に対する $K_D$ 値を求めた。本薬をセンサーチップ上に固定することが技術的に困難であったため，本薬の $K_D$ 値は，hFIX 及び hFIXa，又は hFX 及び hFXa を認識する本薬の2つの可変領域をそれぞれ持つ，2つの異なる単一特異性サロゲート抗体を用いた測定値から推定した。hFIX 及び hFIXa を認識する可変領域を有する抗体に対して，hFIX 及び hFIXa は濃度依存的な結合性を示し，$K_D$ 値はそれぞれ1.6 μmol/L 及び1.5 μmol/L であった（4.2.1.1-2 Table 1）。同様に，hFX 及び hFXa を認識する可変領域を有する抗体に対して，hFX 及び hFXa は濃度依存的な結合性を示し，$K_D$ 値はそれぞれ1.8 μmol/L 及び0.98 μmol/L であった（4.2.1.1-2 Table 1）。これらの結果から，本薬は，数 μmol/L 程度の親和性にて標的抗原へ結合することが示唆された。

### 2.6.2.2.2 ヒトの FIXa による FX の活性化に対するエミシズマブの効果

（資料番号4.2.1.1-3）

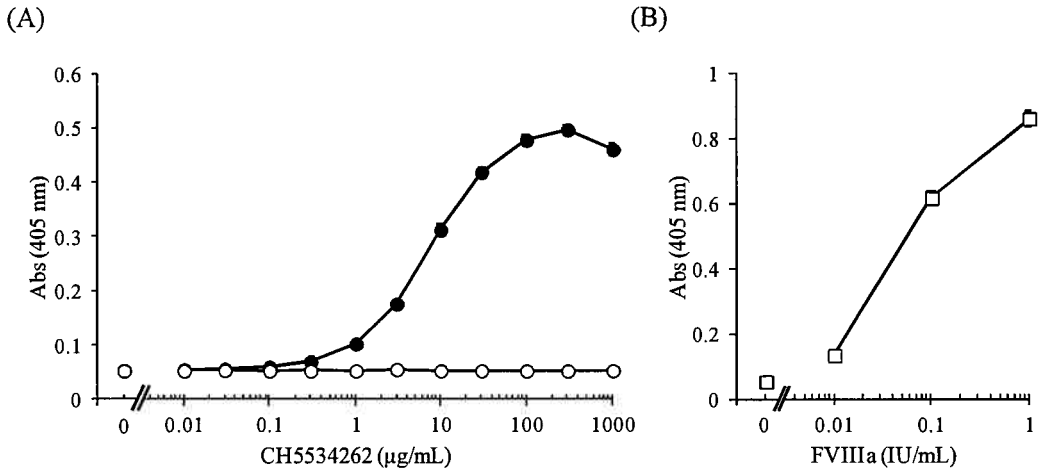
合成発色基質を用いた酵素アッセイにおいて，本薬の，FIXa による FX 活性化を促進する活性，すなわち FVIII 機能代替活性を検討した。各凝固因子はヒト由来のものを使用した。

本薬と FIXa を混合し，これに FX を加えて，本薬が FIXa による FX 活性化を促進する活性を検討した。本薬が直接 FX を活性化しないことを確認するために，本薬のみを FX へ加える群も設定した。また，試験系の成立を確認するために，FIXa と FVIIIa を混合し，これに FX を加える群を設けた。生成した FXa の活性は，その合成発色基質 S-2222を添加することによって発色反応を開始させ，波長405 nm の吸光度増加により測定した。

その結果，FIXa 存在下でのみ本薬による濃度依存的な吸光度増加，すなわち FX 活性化が確認された（図 2.6.2.2.2-1A）。

以上より，本薬は FIXa による FX 活性化を促進する活性，すなわち FVIII 機能代替活性を有することが明らかとなった。なお，FIXa 存在下で FVIIIa による濃度依存的な吸光度増加が観察され，本試験系は FVIIIa の補因子活性を反映することが確認された（図 2.6.2.2.2-1B）。

図 2.6.2.2.2-1 ヒトのFIXaによるFXの活性化に対するエミシズマブの効果




(A) ヒトのFIXaによるFXの活性化に対する本薬の効果，(B) ヒトのFIXaによるFXの活性化に対するFVIIIaの効果

平均値 ± 標準偏差（n＝3），3組の測定結果から算出した。

黒丸（●）は本薬へFIXaを添加した群を，白丸（○）はFIXaを添加しなかった群を示す

白四角（□）はFVIIIa群を示す。

Absは吸光度を示す。

[4.2.1.1-3 Figure 1及びFigure 2を改変]

### 2.6.2.2.3 カニクイザル，ラット，マウスの各FIXaによるFXの活性化に対するエミシズマブの効果

（資料番号4.2.1.1-4）

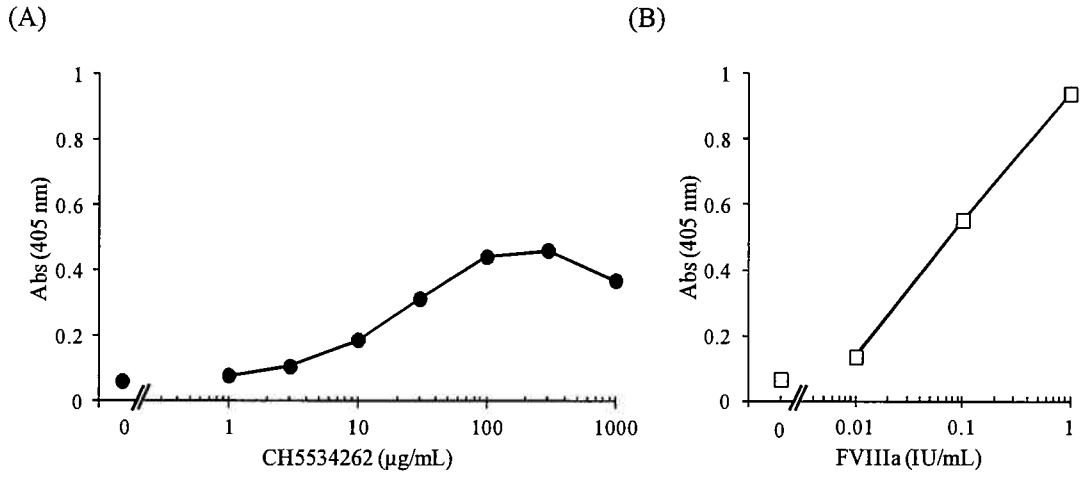
合成発色基質を用いた酵素アッセイにおいて，本薬のカニクイザル，ラット，マウスに対する交差反応性を検討した。

カニクイザルに対する交差反応性を評価するため，本薬とカニクイザル FIXa を混合し，これにカニクイザル FX を加えて，本薬がカニクイザル FIXa によるカニクイザル FX 活性化を促進する活性を検討した。また，試験系の成立を確認するために，カニクイザル FIXa とヒト FVIIIa を混合し，これにカニクイザル FX を加える群を設けた。生成した FXa の活性は，合成発色基質 S-2222添加後の波長405 nm の吸光度増加により測定した。カニクイザルに対する交差反応性評価と同様にして，ラット及びマウスに対する交差反応性を評価するため，ラット FIXa によるラット FX 活性化を促進する本薬の活性及びマウス FIXa によるマウス FX 活性化を促進する本薬の活性について検討した。

カニクイザル由来試料を用いた試験では，本薬による濃度依存的な吸光度増加，すなわち FX 活性化が確認された（図 2.6.2.2.3-1A）。したがって，本薬はカニクイザル FIXa によるカニクイザル FX 活性化を促進する活性を有し，カニクイザルに交差することが示された。なお，ヒト FVIIIa の濃度依存的な吸光度増加も観察されており，カニクイザル由来試料を用いた試験系の成立を確認した（図 2.6.2.2.3-1B）。

ラット及びマウス由来試料を用いた試験では，ヒト FVIIIa の濃度依存的な吸光度増加が観察されており，それぞれの試験系の成立を確認した。しかし，本薬による吸光度増加は確認されなかった（図 2.6.2.2.3-2及び図 2.6.2.2.3-3）。したがって，本薬はラット及びマウスに交差しないことが示された。

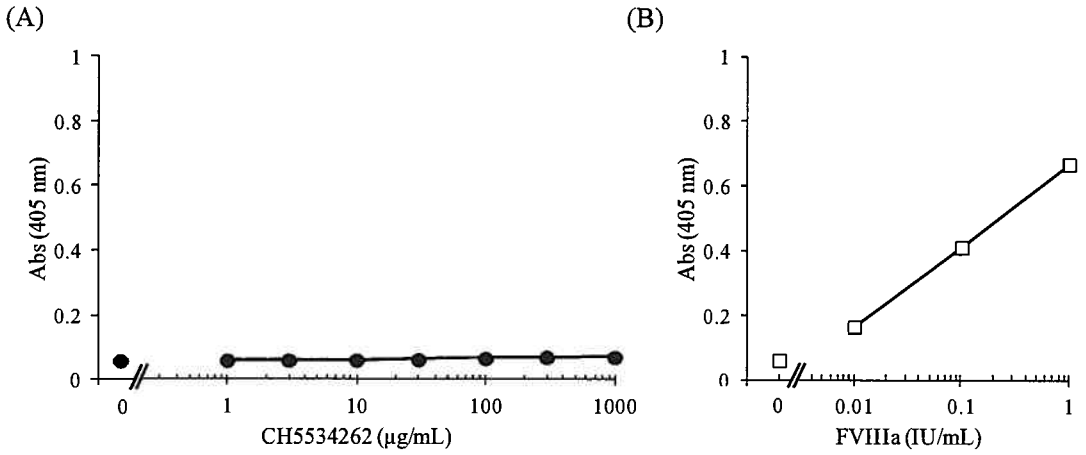
図 2.6.2.2.3-1 カニクイザルの FIXa による FX の活性化に対するエミシズマブの効果




(A) カニクイザルの FIXa による FX の活性化に対する本薬の効果，(B) カニクイザルの FIXa による FX の活性化に対するヒト FVIIIa の効果
平均値 ± 標準偏差（n＝3），3組の測定結果から算出した。
Abs は吸光度を示す。

[4.2.1.1-4 Figure 1を改変]

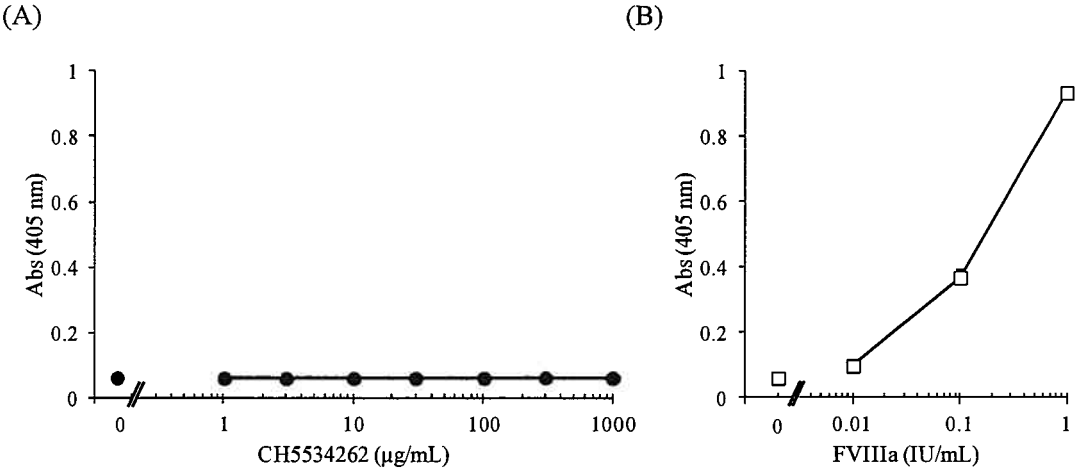
図 2.6.2.2.3-2 ラットの FIXa による FX の活性化に対するエミシズマブの効果




(A) ラットの FIXa による FX の活性化に対する本薬の効果，(B) ラットの FIXa による FX の活性化に対するヒト FVIIIa の効果
平均値 ± 標準偏差（n＝3），3組の測定結果から算出した。
Abs は吸光度を示す。

[4.2.1.1-4 Figure 3を改変]

図 2.6.2.2.3-3 マウスの FIXa による FX の活性化に対するエミシズマブの効果




(A) マウスの FIXa による FX の活性化に対する本薬の効果，(B) マウスの FIXa による FX の活性化に対するヒト FVIIIa の効果
平均値 ± 標準偏差（n＝3），3組の測定結果から算出した。
Abs は吸光度を示す。

[4.2.1.1-4 Figure 2を改変]

## 2.6.2.2.4 血友病 A ヒト血漿の活性化部分トロンボプラスチン時間に対するエミシズマブの効果

（資料番号4.2.1.1-5）

FVIII 欠乏ヒト血漿の APTT に対する本薬の効果を検討した。また，APTT 短縮を指標に本薬の最小反応濃度を決定した。

FVIII 欠乏ヒト血漿で希釈調製した各濃度の本薬に関して，血液凝固自動測定装置で APTT を測定した。また，以下の式を満たす本薬の最小濃度を最小反応濃度とした。

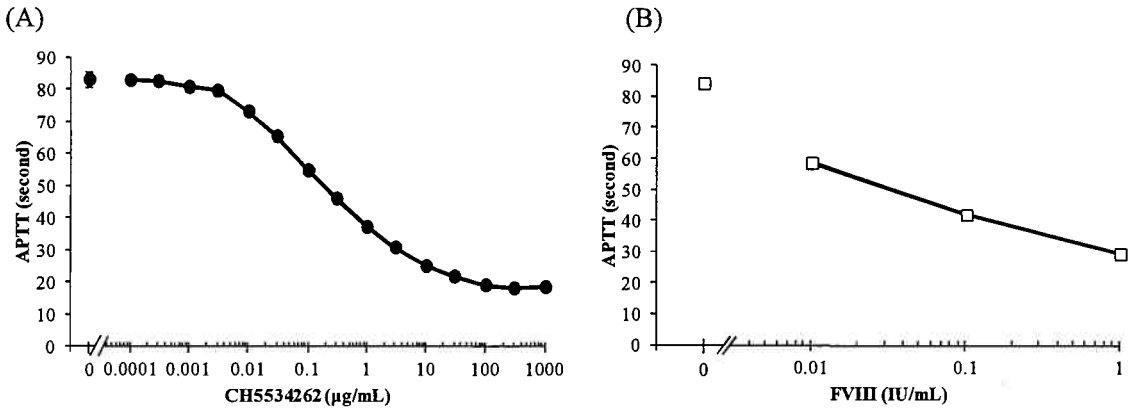
$M \leq M_0 - 1.64 \times SD_0$

M: FVIII 欠乏ヒト血漿で調製した各濃度の本薬溶液の APTT の平均値
$M_0$: FVIII 欠乏ヒト血漿で調製した0 μg/mL の本薬溶液の APTT の平均値
$SD_0$: FVIII 欠乏ヒト血漿で調製した0 μg/mL の本薬溶液の APTT の標準偏差

なお，試験系の成立を確認するために，FVIII 欠乏ヒト血漿で希釈調製した各濃度の FVIII に関して，同様に APTT を測定した。

本薬は，FVIII 欠乏ヒト血漿において，APTT の濃度依存的短縮，すなわち，血漿凝固促進活性を示した（図 2.6.2.2.4-1A）。本系における，上記の式を満たす本薬の最小反応濃度は 0.01 μg/mL であった。また，本系では，FVIII が APTT を濃度依存的に短縮させることが確認された（図 2.6.2.2.4-1B）。

図 2.6.2.2.4-1 FVIII 欠乏ヒト血漿の APTT に対するエミシズマブの効果




(A) FVIII 欠乏ヒト血漿の APTT に対する本薬の効果
平均値 ± 標準偏差（n＝5），5回の独立した実験の結果から算出した。
(B) FVIII 欠乏ヒト血漿の APTT に対する FVIII の効果
3組の測定結果の中央値を示した。

[4.2.1.1-5 Figure 1及び Figure 2を改変]

## 2.6.2.2.5 血友病 A ヒト血漿における FXIa 惹起トロンビン生成に対するエミシズマブの効果

（資料番号4.2.1.1-6）

トロンビン生成試験は，トロンビンに対する蛍光基質を用いて，生成されるトロンビン量を酵素活性として経時的に測定する試験である。本試験では血漿におけるトロンビン生成量の経時的変化から，トロンビン生成開始時間（Lag time），最大トロンビン生成量（Peak height），最大トロンビン生成量に至るまでの時間（Time to Peak：ttPeak）及び内因性トロンビン産生能（Endogenous thrombin potential：ETP）のパラメータが算出される。FVIII 欠乏ヒト血漿を用いて，FXIa により惹起されたトロンビン生成に対する本薬の効果を検討した。

FVIII 欠乏ヒト血漿で希釈調製した各濃度の本薬に，FXIa を含む凝固開始試薬を添加してトロンビン生成反応を開始し，トロンビン生成蛍光システムで上記パラメータを測定した。なお，試験系の成立を確認するために，FVIII 欠乏ヒト血漿で希釈調製した各濃度の FVIII に関して，同様にトロンビン生成に関する上記パラメータを測定した。

本薬は Lag time を濃度依存的に短縮させ（4.2.1.1-6 Figure 1A），Peak height を濃度依存的に増加させた（4.2.1.1-6 Figure 2A）。また，本薬は ttPeak を濃度依存的に短縮させ（4.2.1.1-6 Figure 3A），ETP を濃度依存的に増加させた（4.2.1.1-6 Figure 4A）。なお，FVIII も同様に，Lag time 及び ttPeak を濃度依存的に短縮させ（4.2.1.1-6 Figure 1B 及び Figure 3B），Peak height 及び ETP を濃度依存的に増加させた（4.2.1.1-6 Figure 2B 及び Figure 4B）。

以上より，本薬は，FVIII 欠乏ヒト血漿において，FXIa により惹起したトロンビン生成量の経時的変化から算出したパラメータ（Lag time，Peak height，ttPeak 及び ETP）を濃度依存的に改善し，トロンビン生成を促進することが示された。

## 2.6.2.2.6 FVIII 中和カニクイザル血漿におけるトロンビン生成を指標としたエミシズマブの薬理作用

（資料番号4.2.1.1-7）

FVIII 中和カニクイザル血漿におけるトロンビン生成を指標とした本薬の薬理活性を評価した。また，FVIII 中和ヒト血漿においても同様の評価を実施した。

カニクイザルとヒトにおける凝固因子の活性や量の相違は，トロンビン生成へ影響を及ぼす

可能性があり，本薬添加時のトロンビン生成量から直接種差を評価することは困難である。そこで，ブタ FVIII はカニクイザル及びヒトの双方へ反応することから，種差によるトロンビン生成の挙動を補正するため，ブタ FVIII の活性を基準値としておき，その基準値を元に本薬の活性を算出した。トロンビン生成試験では4種のパラメータ（Lag time，Peak height，ttPeak 及び ETP）が算出されるが，本試験では Peak height によって本薬の活性を評価した。すなわち，カニクイザル及びヒトの血漿において，ブタ FVIII の0.01 U/mL 又は0.05 U/mL の活性に相当する Peak height を示すために必要な本薬の濃度を算出し，比較した。

ブタ FVIII 0.01 U/mL 活性に相当する換算本薬濃度の幾何平均値は，カニクイザル血漿及びヒト血漿それぞれにおいて4.81 μg/mL 及び2.52 μg/mL であった。ブタ FVIII 0.05 U/mL 活性に相当する換算本薬濃度の幾何平均値は，カニクイザル血漿及びヒト血漿それぞれにおいて67.1 μg/mL 及び27.0 μg/mL であった（4.2.1.1-7 Table 1）。

なお，カニクイザル血漿個体別又はヒト血漿個体別の比較において，いずれの血漿においてもブタ FVIII の0.01 U/mL 及び0.05 U/mL の活性に相当する換算本薬濃度の個体間差は大きく，カニクイザル血漿とヒト血漿における換算本薬濃度の幾何平均値の差は，それぞれの個体間差に比べると小さかった（4.2.1.1-7 Figure 1）。

### 2.6.2.2.7 血友病 A ヒト血漿におけるトロンビン生成を指標とした FVIII 及びバイパス製剤の作用に対するエミシズマブの影響

（資料番号4.2.1.1-8）

現在臨床において使用されている血友病 A 治療薬として，FVIII 及びバイパス製剤（FVIIa 及び aPCC）がある。本薬はこれら既存薬と併用される可能性がある。本試験では，本薬と FVIII，本薬と FVIIa 及び本薬と aPCC それぞれの組み合わせで添加した FVIII 欠乏ヒト血漿のトロンビン生成試験を実施し，FVIII 及びバイパス製剤の作用に対する本薬の影響を検討した。

本薬と FVIII の組み合わせにおいては，トロンビン生成反応の開始因子として内因系凝固反応を惹起する FXIa を用いた測定を実施した。FVIII の濃度により測定に適した凝固開始試薬濃度が異なるため，FVIII の低濃度側（0.01，0.1 IU/mL）及び高濃度側（0.1，1 IU/mL）に分けて測定を実施した。本薬と FVIIa 又は aPCC の組み合わせにおいては，トロンビン生成反応の開始因子として外因系凝固反応を惹起する TF を用いた測定を実施した。

本薬は，FVIII 添加時の Lag time 及び ttPeak を短縮させ，ETP 及び Peak height を変化させないか又は増加させたことから，FVIII と本薬の併用により，トロンビン生成は更に促進することが示された（4.2.1.1-8 Figure 1）。

本薬は，FVIIa 添加時の ETP 及び Peak height を増加させたことから，FVIIa と本薬の併用により，トロンビン生成量は更に増加することが示された。また，本薬は，低濃度側における FVIIa 添加時の Lag time を延長させたことから，FVIIa との併用でトロンビン生成開始時間を延長させる場合があることが示された（4.2.1.1-8 Figure 2）。本薬単独添加によっても Lag time が延長されることから，この延長は本薬の特性が反映されていると考えられる。

本薬は，aPCC 添加時の Lag time を変化させず，ttPeak を短縮させ，ETP 及び Peak height を増加させたことから，aPCC と本薬の併用により，トロンビン生成は更に促進することが示された（4.2.1.1-8 Figure 3）。

### 2.6.2.2.8 酵素アッセイを用いたヒト FIX 及び FX 関連反応に対するエミシズマブの影響

（資料番号4.2.1.1-9）

合成発色基質を用いた酵素アッセイにより，FIX 及び FX 関連反応に対する本薬の影響を検討した。なお，陰性対照物質として本薬と同じ IgG4サブクラスであるナタリズマブを用いた。

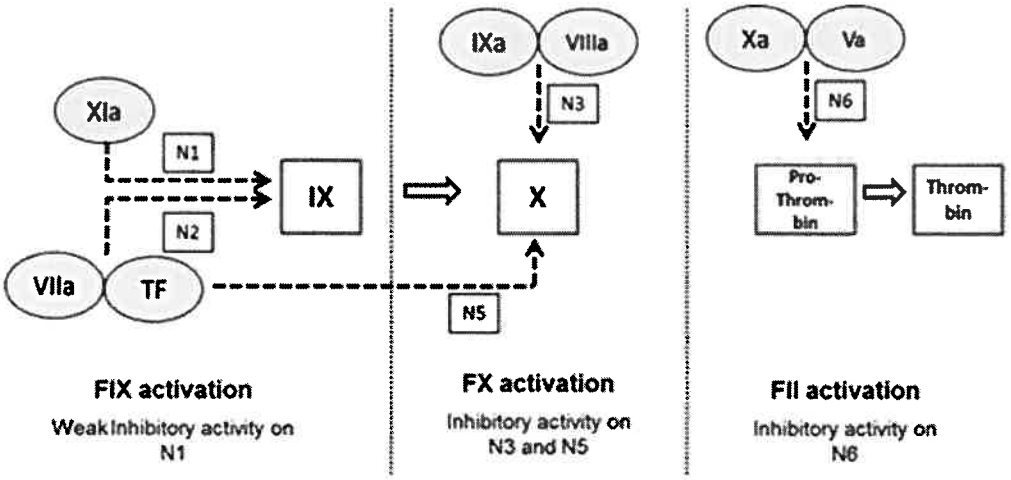
血液凝固における FIX 及び FX が関連した反応として，以下の5つの反応を評価した（図

2.6.2.2.8-1）。各凝固因子はすべてヒト由来のものを使用した。

1) FXIa による FIX 活性化に対する評価系（N1反応と称す，4.2.1.1-9 Figure 1）
2) FVIIa/TF による FIX 活性化に対する評価系（N2反応と称す，4.2.1.1-9 Figure 2）
3) FIXa/FVIIIa による FX 活性化に対する評価系（N3反応と称す，4.2.1.1-9 Figure 3）
4) FVIIa/TF による FX 活性化に対する評価系（N5反応と称す，4.2.1.1-9 Figure 4）
5) FXa/FVa による FII 活性化に対する評価系（N6反応と称す，4.2.1.1-9 Figure 5）

なお，N4反応と称する反応での評価は実施されていない。

**図 2.6.2.2.8-1 酵素アッセイにより本薬の影響を検討した FIX 及び FX 関連反応**




FIX 及び FX が関連する5つ（点線で示す N1，N2，N3，N5及び N6）の反応に関して，活性化を受ける血液凝固因子を四角（□）囲みにて示し，活性化のために必要な血液凝固因子を円（○）囲みで示す。ローマ数字は数字に該当する血液凝固因子を示し，TF は組織因子を示す。

評価した5つの反応の内，3つの反応（N3，N5及び N6）において，本薬の阻害が認められ，1つの反応（N1）において弱いながら阻害がみられた。本試験は，*in vitro* の酵素アッセイであるため，定性的ではあるが，特に FX が関連する凝固反応において，本薬の阻害が示された。

FVIII 欠乏ヒト血漿を用いた TF 惹起トロンビン生成試験において，本薬は，単独で Lag time を延長させたが（2.6.2.2.7），この理由として本薬が上記 N5，N6の関与する外因系凝固反応を阻害した可能性が考えられた。一方で，本薬は同試験において単独で Peak height 及び ETP を増加させたことから，外因系から惹起したトロンビン生成の初期過程では，本薬の外因系反応阻害の影響が Lag time の延長として検出される場合もあるが，その後の内因系凝固反応によるトロンビン生成の増幅過程では，本薬による凝固反応促進活性が検出されると考えられた。

## 2.6.2.2.9 酵素アッセイを用いたカニクイザル FIX 及び FX 関連反応に対するエミシズマブの影響

（資料番号4.2.1.1-10）

合成発色基質を用いた酵素アッセイにより，ヒト凝固因子を用いた場合に（2.6.2.2.8），本薬による阻害が明らかにみられた3つの反応（N3，N5及び N6）に関して，カニクイザルの FIX 及び FX を用いて本薬の影響を検討した。

カニクイザルでの検討では，FIX 及び FX はカニクイザル由来（cyFIX，cyFIXa，cyFX 又は cyFXa）のものを使用し，それ以外の各凝固因子はヒト由来のもの（各因子名に「h」を付けて表記）を使用した。また，対照としてすべてヒト由来の凝固因子を使用した検討も行った。

1) cyFIXa/hFVIIIa による cyFX 活性化に対する評価系（cN3反応と称す，4.2.1.1-10 Figure 1A）

2) hFIXa/hFVIIIa による hFX 活性化に対する評価系（hN3反応と称す，4.2.1.1-10 Figure 1B）
3) hFVIIa/hTF による cyFX 活性化に対する評価系（cN5反応と称す，4.2.1.1-10 Figure 2A）
4) hFVIIa/hTF による hFX 活性化に対する評価系（hN5反応と称す，4.2.1.1-10 Figure 2B）
5) cyFXa/hFVa による hFII 活性化に対する評価系（cN6反応と称す，4.2.1.1-10 Figure 3A）
6) hFXa/hFVa による hFII 活性化に対する評価系（hN6反応と称す，4.2.1.1-10 Figure 3B）

本薬は，ヒトの FIX 及び FX 関連反応で阻害が明らかにみられた3つの反応において，カニクイザルの FIX 及び FX 関連反応も濃度依存的に阻害した。

FIX 及び FX 関連反応に対する本薬の阻害作用は，*in vitro* の酵素アッセイにおける結果であるため，定性的な性質を示すものであるが，出血について慎重に検討する必要があると考えられた。カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において（2.6.6.3），1，6及び30 mg/kg の用量で本薬の間歇皮下投与（週1回）を実施した。その結果，30 mg/kg までの用量で，本薬の凝固阻害作用を示唆する毒性変化は認められなかった。すなわち，血液学的検査における関連項目の異常及び病理学的検査における本薬の薬理作用に関連した出血所見は認められなかった。カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルを用いた *in vivo* 薬効薬理試験においては，1 mg/kg の皮下投与による本薬の出血傾向抑制効果が示唆されている（2.6.2.2.10及び2.6.2.2.13）ことから，間歇皮下投与毒性試験における無毒性量（NOAEL）の30 mg/kg/週以上と比べると，30倍以上の差があった（2.6.6.3）。

### 2.6.2.2.10 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの効果（0.3，1及び3 mg/kg 皮下投与）

（資料番号4.2.1.1-11及び4.2.1.1-12）

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルは，カニクイザルに FVIII に対する中和抗体を投与して後天的な血友病 A 病態を作製し，更に筋肉内穿刺等を施して出血を惹起するモデルである。カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬皮下投与の出血傾向抑制効果を検討した。

雄カニクイザルに抗 FVIII 中和抗体#273（#273）10 mg/kg を静脈内投与し，FVIII 活性を低下させて後天的に血友病 A 病態にした。更に，#273投与約2時間後に麻酔下で筋肉内穿刺等を加えて出血を惹起し，出血に対する本薬及び遺伝子組換えブタ FVIII（recombinant porcine FVIII: rpFVIII）の出血傾向抑制効果を評価した。#273投与日を Day 0とし，Day 3まで，出血に伴う血液ヘモグロビン濃度低下（貧血）及び皮下出血部位体表の暗赤色部（出血痕）面積を測定して出血の指標とした。

陽性対照物質である rpFVIII（1 U/kg）は，Day 0から Day 2まで1日2回静脈内投与（計6回）した。本薬（0.3，1又は3 mg/kg）は，#273投与の4日前（Day −4）に1回皮下投与した。以下の5群を設定した（各群 n = 6，0.3 mg/kg 投与群のみデータ解析は n = 4）。

1）対照群
2）rpFVIII：1 U/kg 投与群
3）本薬：0.3 mg/kg 投与群
4）本薬：1 mg/kg 投与群
5）本薬：3 mg/kg 投与群

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，対照群の Day 0に対する血液ヘモグロビン濃度の相対値は徐々に減少し，Day 3での平均値は54%であった。rpFVIII 投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度相対値の平均値は79%であり，対照群と比べて有意に高かった。本薬投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度相対値の平均値は，1 mg/kg 投与群で74%，3 mg/kg 投与群で80%であり，各用量の平均値を比べると，本薬の用量に依存して高い傾向にあった（図 2.6.2.2.10-1及び表 2.6.2.2.10-1）。

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，対照群の出血痕面積は徐々に増加し，Day 3での平均値は208 $cm^2$であった。rpFVIII 投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は77 $cm^2$であり，対照群と比べて有意に小さかった。本薬投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は，1 mg/kg 投与群で84 $cm^2$，3 mg/kg 投与群で68 $cm^2$であり，1 mg/kg 投与群及び3 mg/kg 投与群では対照群と比べて有意に小さかった（図 2.6.2.2.10-2及び表 2.6.2.2.10-2）。

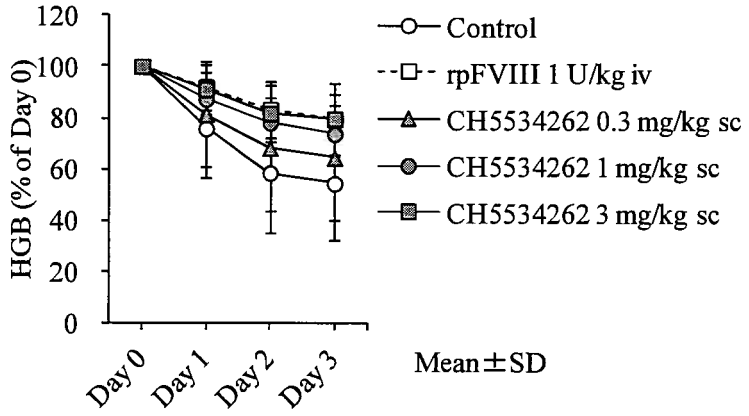
#273投与により，対照群の APTT の平均値は21秒から47秒に延長し，Day 3では38秒であった。rpFVIII 投与群では，対照群と同様に，#273投与により APTT の平均値は23秒から54秒に延長した。rpFVIII の初回投与約10分後に採取したクエン酸血漿の APTT の平均値は，42秒に短縮した。rpFVIII 投与群の Day 1～3の APTT（各日の rpFVIII 投与前）は，対照群とほぼ同じ値であった。本薬投与群では，APTT の延長が本薬の用量に依存して抑制され，本薬 0.3 mg/kg 投与群でも，対照群の APTT より短かった（図 2.6.2.2.10-3A）。

対照群，rpFVIII 投与群及び本薬投与群のいずれの PT も，実験期間中ほぼ一定（9秒前後）であり，#273，rpFVIII 及び本薬の投与により，PT に顕著な変化はみられなかった（図 2.6.2.2.10-3B）。

以上より，本モデルにおいて，出血に伴う血液ヘモグロビン濃度低下が生じ，体表に出血痕が観察された。本薬の皮下投与（0.3，1又は3 mg/kg）により，対照群と比べて，血液ヘモグロビン濃度低下は用量依存的に抑制される傾向を示し，体表にみられる出血痕面積は1及び3 mg/kg の用量で有意に抑制された。これらのことから，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける本薬の出血傾向抑制効果が示された。

また，投与4日後（Day 0）の血漿中本薬濃度は，0.3 mg/kg 投与群で2.01 ± 0.08 μg/mL（平均値 ± 標準偏差），1 mg/kg 投与群で6.04 ± 0.64 μg/mL，3 mg/kg 投与群で16.8 ± 1.6 μg/mL であった。

**図 2.6.2.2.10-1 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける血液ヘモグロビン濃度の相対値に対するエミシズマブの効果（0.3，1及び3 mg/kg 皮下投与）**




平均値 ± 標準偏差（各群 n = 6，本薬 0.3 mg/kg 投与群のみ n = 4）

rpFVIII は，Day 0から Day 2まで1日2回静脈内投与した。本薬は，出血惹起刺激の4日前（Day −4）に1回皮下投与した。

Day 0: #273投与後，かつ出血惹起刺激前

[4.2.1.1-11 Figure 1を改変]

表 2.6.2.2.10-1 Day 3における血液ヘモグロビン濃度の相対値に対するエミシズマブの効果（0.3，1及び3 mg/kg 皮下投与）

| Group | HGB on Day 3 (% of Day 0) |
|---|---|
| Control | 54 ± 22 |
| rpFVIII 1U/kg iv | 79 ± 14 * |
| CH5534262 0.3 mg/kg sc | 64 ± 25 |
| CH5534262 1 mg/kg sc | 74 ± 11 |
| CH5534262 3 mg/kg sc | 80 ± 14 |

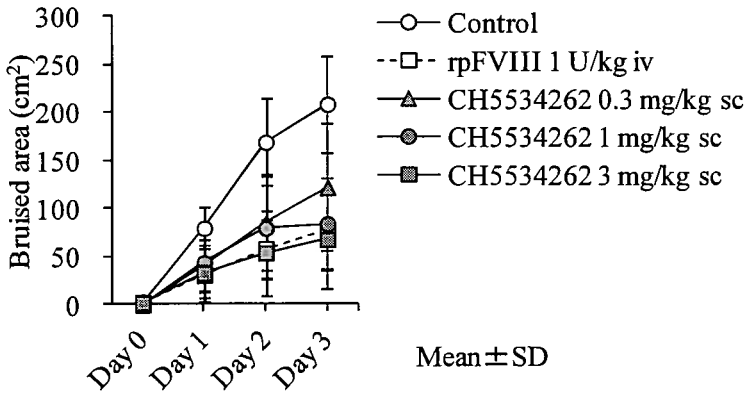
平均値 ± 標準偏差（各群 n = 6，本薬 0.3 mg/kg 投与群のみ n = 4）

*: P < 0.05 vs 対照群（Student's t test）

本薬の0.3 mg/kg 投与群では P = 0.7274，1 mg/kg 投与群では P = 0.1861，3 mg/kg 投与群では P = 0.0652 vs 対照群（Dunnett's multiple comparison test）

[4.2.1.1-11 Table 1を改変]

図 2.6.2.2.10-2 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける体表出血痕面積に対するエミシズマブの効果（0.3，1及び3 mg/kg 皮下投与）




平均値 ± 標準偏差（各群 n = 6，本薬 0.3 mg/kg 投与群のみ n = 4）

rpFVIII は，Day 0から Day 2まで1日2回静脈内投与した。本薬は，出血惹起刺激の4日前（Day −4）に1回皮下投与した。

Day 0: #273投与後，かつ出血惹起刺激前

[4.2.1.1-11 Figure 2を改変]

表 2.6.2.2.10-2 Day 3における体表出血痕面積に対するエミシズマブの効果（0.3，1及び3 mg/kg 皮下投与）

| Group | Bruised area on Day 3 ($cm^2$) | |
|---|---|---|
| Control | 208 ± 50 | |
| rpFVIII 1U/kg iv | 77 ± 43 | *** |
| CH5534262 0.3 mg/kg sc | 122 ± 66 | |
| CH5534262 1 mg/kg sc | 84 ± 47 | ++ |
| CH5534262 3 mg/kg sc | 68 ± 51 | +++ |

平均値 ± 標準偏差（各群 n = 6，本薬 0.3 mg/kg 投与群のみ n = 4）

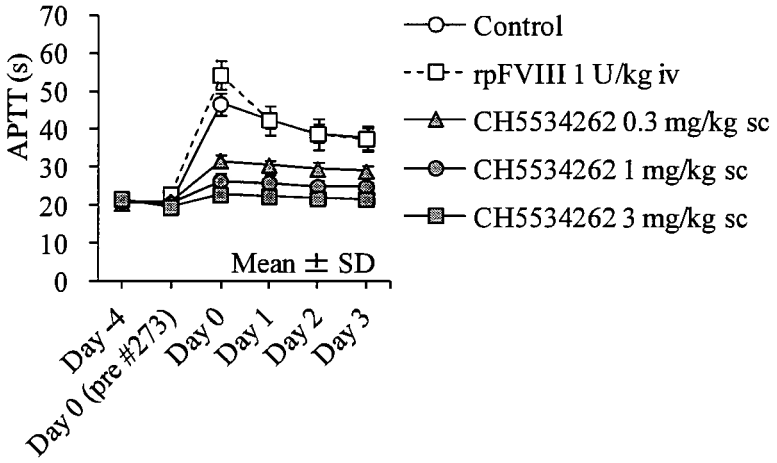
***: P < 0.001 vs 対照群（Student's t test）

++: P < 0.005，+++: P < 0.001，本薬の0.3 mg/kg 投与群では P = 0.0530 vs 対照群（Dunnett's multiple comparison test）

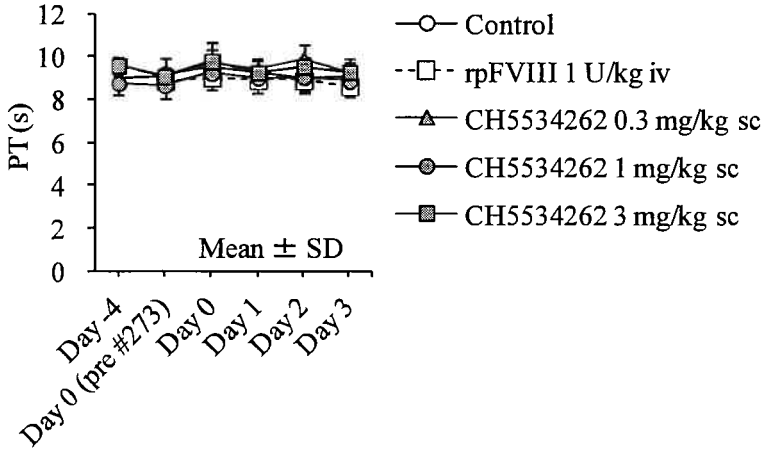
[4.2.1.1-11 Table 2を改変]

図 2.6.2.2.10-3 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける APTT 及び PT の推移（0.3，1及び3 mg/kg 皮下投与）

(A)




(B)




(A) 活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT），(B) プロトロンビン時間（PT）
平均値 ± 標準偏差（各群 n = 6，本薬 0.3 mg/kg 投与群のみ n = 4）
rpFVIII は，Day 0から Day 2まで1日2回静脈内投与した。本薬は，出血惹起刺激の4日前（Day −4）に1回皮下投与した。#273は，Day 0に1回静脈内投与した。
Day −4: 本薬投与前
Day 0 (pre #273): #273投与前
Day 0: #273投与後，かつ rpFVIII 投与前（rpFVIII 投与群）
Day 1 - 3: rpFVIII 投与前（rpFVIII 投与群）
s: 秒

[4.2.1.1-11 Figure 3を改変]

## 2.6.2.2.11 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの効果（10及び50 mg/kg 皮下投与）

（資料番号4.2.1.1-13）

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬の皮下投与（10又は50

mg/kg）による出血傾向抑制効果を検討した。

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルは，本薬の皮下投与（0.3，1又は3 mg/kg）による薬効検討試験（2.6.2.2.10）と同様に作製した。本薬の臨床試験では最大3 mg/kg を週1回反復皮下投与する計画であったため，この最大用量投与時に推定される血漿中濃度範囲での本薬の薬効を検討する目的で，本カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデル試験では10又は50 mg/kg 皮下投与による出血傾向抑制効果を検討した。本試験では，以下の3群を設定した（各群 n = 4）。本薬の溶媒又は本薬は，#273投与の4日前（Day −4）に1回皮下投与した。

1）溶媒投与群
2）本薬：10 mg/kg 投与群
3）本薬：50 mg/kg 投与群

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，溶媒投与群の Day 0に対する血液ヘモグロビン濃度の相対値は徐々に減少し，Day 3の平均値は77%であった。本薬 50 mg/kg 投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度の相対値の平均値は98%であり，溶媒投与群と比べて有意に高かった。本薬 10 mg/kg 投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度の相対値の平均値は90%であり，平均値を比べると溶媒投与群よりも高い傾向にあった（4.2.1.1-13 Figure 1及び Table 1）。

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，溶媒投与群の出血痕面積は徐々に増加し，Day 3の平均値は157 $cm^2$であった。本薬 50 mg/kg 投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は18 $cm^2$であり，溶媒投与群と比べて有意に小さかった。本薬 10 mg/kg 投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は62 $cm^2$であり，平均値を比べると溶媒投与群よりも低い傾向にあった（4.2.1.1-13 Figure 2及び Table 2）。

Day 0の#273投与により，溶媒投与群の APTT の平均値は21秒から47秒に延長したが，本薬 10 mg/kg 投与群では APTT の平均値の延長は18秒から20秒へとわずかであり，本薬 50 mg/kg 投与群では延長はみられなかった（4.2.1.1-13 Figure 3A）。また，溶媒投与群，本薬 10 mg/kg 投与群及び50 mg/kg 投与群のいずれの PT も実験期間中ほぼ一定（9秒前後）であり，#273及び本薬の投与により，PT に顕著な変化はみられなかった（4.2.1.1-13 Figure 3B）。

以上，本モデルにおいて本薬の皮下投与（10及び50 mg/kg）による出血傾向抑制効果が示唆された。投与4日後（Day 0）の血漿中本薬濃度は，10 mg/kg 投与群で75 ± 10 μg/mL（平均値 ± 標準偏差），50 mg/kg 投与群で300 ± 41 μg/mL であり，血友病 A 病態誘発日から最終評価日までの各評価日の血漿中本薬濃度の平均値は，10 mg/kg 投与群で75～89 μg/mL，50 mg/kg 投与群で300～339 μg/mL であった。これらのことから，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，臨床試験の最大用量3 mg/kg 週1回反復皮下投与時に推定される血漿中濃度範囲での本薬の出血傾向抑制効果が示された。

### 2.6.2.2.12 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの効果（静脈内投与）

（資料番号4.2.1.1-14）

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，出血惹起刺激後の本薬静脈内投与により止血効果を検討した。

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルは，本薬皮下投与の試験と同様に作製した（2.6.2.2.10）。rpFVIII（3.4又は10 U/kg）は，出血惹起後（Day 0）に1回，及び Day 1～2に各1日2回の，計5回静脈内投与した。本薬（0.3，1又は3 mg/kg）は，出血惹起後（Day 0）に1回静脈内投与した。以下の5群を設定した（各群 n = 4，対照群のみ n = 6）。ただし，対照群としては全く同じ操作を行うため，動物倫理の観点から動物数を減らす目的で，本試験では対照群を作製せず，別試験（2.6.2.2.10）で作製した対照群の値を引用した。

1）対照群

2）rpFVIII：3.4 U/kg 投与群
3）rpFVIII：10 U/kg 投与群
4）本薬：0.3 mg/kg 投与群
5）本薬：1 mg/kg 投与群
6）本薬：3 mg/kg 投与群

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，対照群の Day 0に対する血液ヘモグロビン濃度の相対値は徐々に減少し，Day 3での平均値は54%であった。rpFVIII 投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度相対値の平均値は，3.4 U/kg 投与群で67%，10 U/kg 投与群で84%であり，10 U/kg 投与群では対照群と比べて有意に高かった。本薬投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度相対値の平均値は，1 mg/kg 投与群で76%，3 mg/kg 投与群で82%であり，各用量の平均値を比べると，本薬の用量に依存して高い傾向にあった（4.2.1.1-14 Figure 1及び Table 1）。

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，対照群の出血痕面積は徐々に増加し，Day 3での平均値は208 $cm^2$であった。rpFVIII 投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は，3.4 U/kg 投与群で142 $cm^2$，10 U/kg 投与群で74 $cm^2$であり，10 U/kg 投与群では対照群と比べて有意に小さかった。本薬投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は，1 mg/kg 投与群で75 $cm^2$，3 mg/kg 投与群で104 $cm^2$であり，1 mg/kg 投与群及び3 mg/kg 投与群では対照群と比べて有意に小さかった（4.2.1.1-14 Figure 2及び Table 2）。

#273投与により，対照群の APTT の平均値は21秒から47秒に延長し，Day 3では38秒であった。同様に，#273投与により，本薬投与群では APTT の平均値が21～22秒から46～48秒に延長し，rpFVIII 投与群では APTT の平均値が21～22秒から46～48秒に延長した。これらの APTT 延長は，その後の本薬又は rpFVIII の投与により用量依存的に抑制された（4.2.1.1-14 Figure 3A）。対照群，本薬投与群及び rpFVIII 投与群のいずれの PT も実験期間中ほぼ一定（9秒前後）であり，#273，本薬又は rpFVIII の投与により，PT に顕著な変化はみられなかった（4.2.1.1-14 Figure 3B）。

以上，出血惹起刺激後の本薬の静脈内投与（0.3，1又は3 mg/kg）により，対照群と比べて，血液ヘモグロビン濃度低下は用量依存的に抑制される傾向を示し，体表にみられる出血痕面積は1及び3 mg/kg の用量で有意に抑制された。これらのことから，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおける本薬の止血効果が示唆された[2)]。

また，投与7～17分後（Day 0）の血漿中本薬濃度は，0.3 mg/kg 投与群で6.6 ± 0.6 μg/mL（平均値 ± 標準偏差），1 mg/kg 投与群で25.7 ± 2.5 μg/mL，3 mg/kg 投与群で60.8 ± 3.3 μg/mL であった。

## 2.6.2.2.13 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおけるエミシズマブの効果

（資料番号4.2.1.1-15）

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおいて，本薬皮下投与の出血傾向抑制効果を検討した。

筋肉穿刺等により出血を惹起するカニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて，本薬が用量依存的な出血傾向抑制効果を示したことから，本薬が有用な血友病 A の治療薬となる可能性が示された。一方，人為的に惹起した出血に対する効果だけでなく，臨床により近い出血状況で本薬の出血傾向抑制効果を検討することは，臨床効果を推定する上で有意義と考えられる。そこで，マウス-カニクイザルキメラ型抗 FVIII 中和抗体#273（cy#273）を用いて，8週間 FVIII 活性を低下させたカニクイザルにおいて，日常行動・操作により生じる出血（自然出血）を評価した。

雄カニクイザルに cy#273を1回あたり10 mg/kg の用量で週1回静脈内投与し，FVIII 活性を低

下させた。溶媒投与群，本薬投与群及びrpFVIII投与群の3群（各群n = 4）を設定した。溶媒投与群，本薬投与群にそれぞれ溶媒，本薬を毎週1回皮下投与し，rpFVIII投与群にはrpFVIIIを週2回静脈内投与した。本薬の投与用量は，初回（Day 0）投与として3.97 mg/kg，2回目（Day 7）以降の投与として1回あたり1 mg/kgとした。rpFVIIIの投与用量は，1回あたり20 U/kgとした。すべての群について，8週間観察した。観察期間中，週2回の採血を行い，血液ヘモグロビン濃度を測定して出血に伴う貧血をモニターするとともに，出血症状（体表の出血痕，血尿，関節内出血による関節障害に伴う跛行）がみられない日数，及び跛行が観察された日数を計測した。8週間の内，出血症状を評価した日数は41日であった。最終日（Day 56）には剖検を実施し，外貌，体腔，全身諸器官・組織の異常を肉眼的に観察し，関節内の出血性変化の有無を計数した。

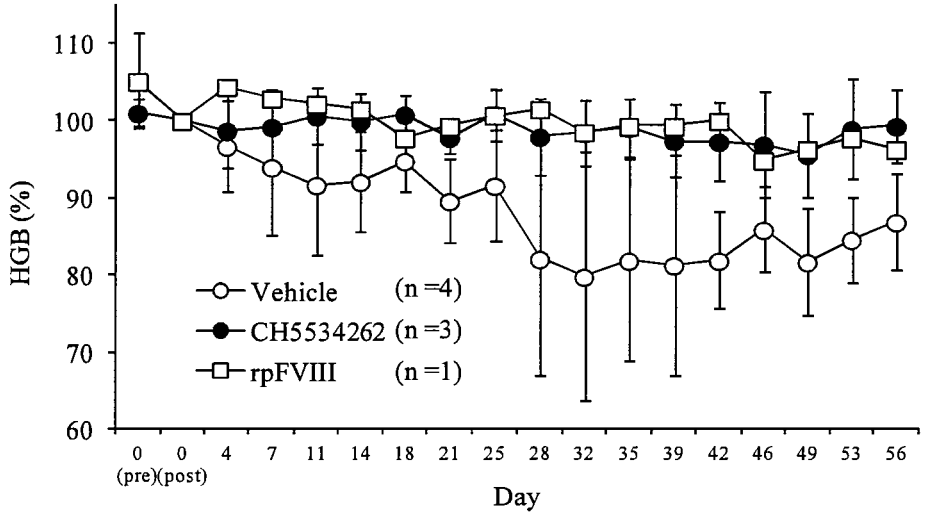
本試験においては，本薬又はrpFVIIIそれぞれの投与量から推定される血漿中濃度若しくは活性から著しく乖離した値を継続的に示した個体は，投与した本薬又はrpFVIIIが，抗薬物抗体（anti-drug antibody）の出現により活性を示さない状態になったと推察されたこと等から，該当個体のデータはすべて不採用とした。本薬投与群の1例と，rpFVIII投与群の3例の合計4例がこれらに該当した。したがって，集計データは，溶媒投与群4例，本薬投与群3例及びrpFVIII投与群1例となった。

溶媒投与群では，血液ヘモグロビン濃度のDay 0に対する相対値は観察期間中に低下する傾向が認められ（図 2.6.2.2.13-1），出血症状（体表の出血痕，血尿，跛行）が観察された。また，Day 56での剖検所見として，暗赤色部（病理組織学的に出血性変化に一致）が，関節（股関節，肘関節，足根関節），骨格筋（下腹部，大腿部），皮下織（背部），膀胱等でみられた（表 2.6.2.2.13-1）。

本薬は，Day 0に対する血液ヘモグロビン濃度相対値の観察期間中の最小値（図 2.6.2.2.13-2），及び出血症状がみられない日数（図 2.6.2.2.13-3）を，溶媒投与群と比較して有意に増加させた。また，本薬は，跛行が観察された日数（図 2.6.2.2.13-4），及びDay 56剖検時に関節内出血が認められた関節数（図 2.6.2.2.13-5）を，溶媒投与群と比較して有意に減少させた。また，本薬投与群では，Day 56での剖検所見として，溶媒投与群で認められたような変化はみられなかった。血漿中本薬濃度は，Day 4からDay 56まで大きな変動はなく，この平均値は30 μg/mLを上回る程度であった（図 2.6.2.2.13-6）。

以上より，カニクイザルFVIII中和血友病A/自然出血モデルにおいて，本薬は，関節内出血を含め血友病Aに特徴的な出血症状に対して抑制効果を示すことが確認された[3)]。

図 2.6.2.2.13-1 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける血液ヘモグロビン濃度相対値の推移



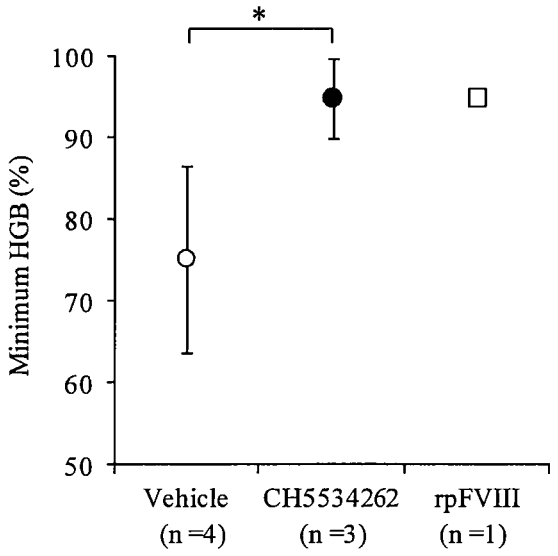

平均値 ± 標準偏差（溶媒投与群 n = 4，本薬投与群 n = 3），rpFVIII 投与群は n = 1

Day 0 (pre)：cy#273投与前

Day 0 (post)：cy#273投与の約2時間後

[4.2.1.1-15 Figure 1を改変]

図 2.6.2.2.13-2 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける血液ヘモグロビン濃度相対値の観察期間中の最小値

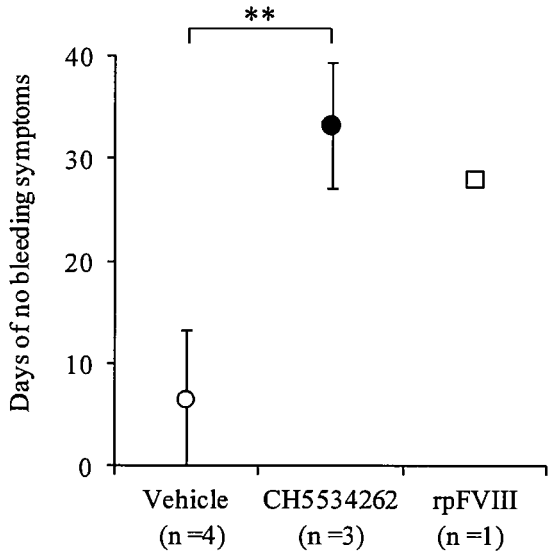



平均値 ± 標準偏差（溶媒投与群 n = 4，本薬投与群 n = 3），rpFVIII 投与群は n = 1

* : $P < 0.05$ vs 溶媒投与群（Student's t test）

[4.2.1.1-15 Figure 2を改変]

図 2.6.2.2.13-3 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける出血症状がみられない日数

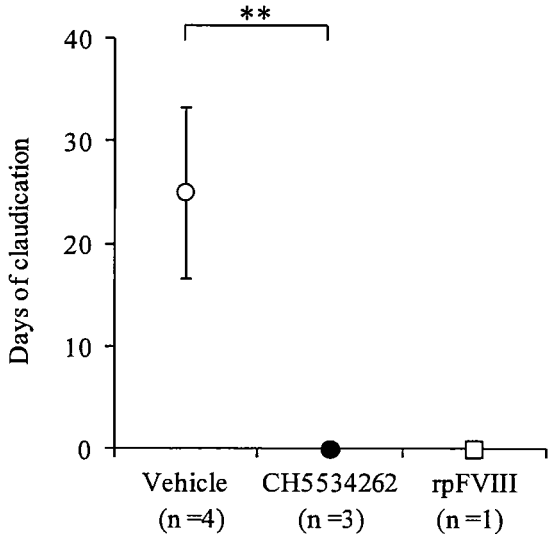



平均値 ± 標準偏差（溶媒投与群 n = 4，本薬投与群 n = 3），rpFVIII 投与群は n = 1

** : P < 0.01 vs 溶媒投与群（Student's t test）

[4.2.1.1-15 Figure 4を改変]

図 2.6.2.2.13-4 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける跛行が観察された日数

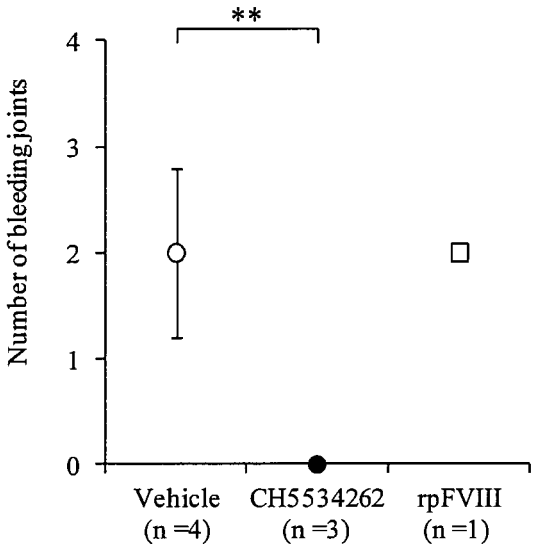



平均値 ± 標準偏差（溶媒投与群 n = 4，本薬投与群 n = 3），rpFVIII 投与群は n = 1

** : P < 0.01 vs 溶媒投与群（Student's t test）

[4.2.1.1-15 Figure 3を改変]

図 2.6.2.2.13-5 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける関節内出血が認められた関節数

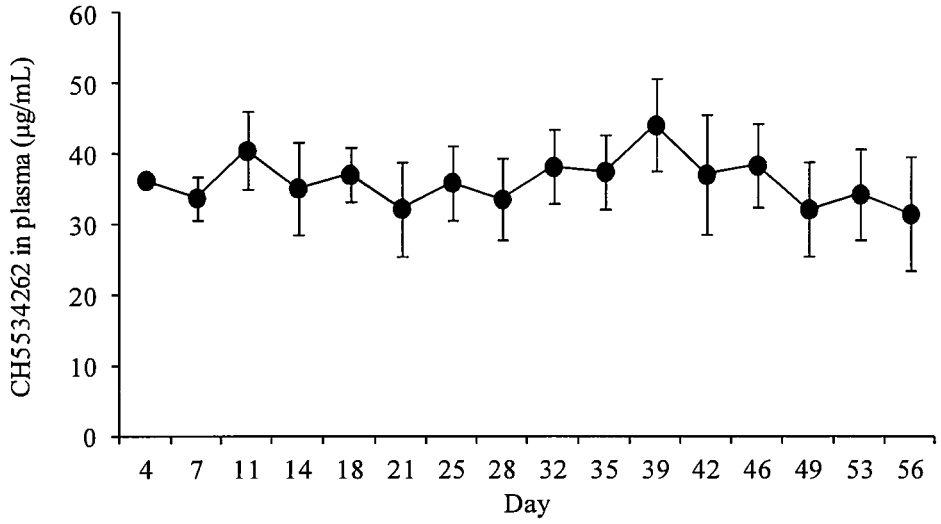



平均値 ± 標準偏差（溶媒投与群 n = 4，本薬投与群 n = 3），rpFVIII 投与群は n = 1

** : P < 0.01 vs 溶媒投与群（Student's t test）

[4.2.1.1-15 Figure 5を改変]

図 2.6.2.2.13-6 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける血漿中本薬濃度の推移




平均値 ± 標準偏差（n = 3）

Day 7，14，21，28，35，42及び49において，採血は本薬投与前に実施

[4.2.1.1-15 Figure 7を改変]

表 2.6.2.2.13-1 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおける剖検所見

| Organs / tissues | | | Vehicle | CH5534262 | rpFVIII |
|---|---|---|---|---|---|
| Findings / sites | | | (n = 4)[a] | (n = 3) | (n = 1) |
| Joint | | | | | |
| Dark red area | Elbow | Left | 1[b] | 0 | 0 |
| | | Right | 1 | 0 | 0 |
| | Hip | Left | 4 | 0 | 0 |
| | | Right | 1 | 0 | 1 |
| | Ankle | Left | 1 | 0 | 1 |
| Skeletal muscle | | | | | |
| Dark red area | Lower abdomen | | 2 | 0 | 0 |
| | Femur | | 1 | 0 | 0 |
| Urinary bladder | | | | | |
| Dark red, wall | | | 1 | 0 | 0 |
| Red area, wall | | | 1 | 0 | 0 |
| Thickening, wall | | | 1 | 0 | 0 |
| Adhesion | | | 1 | 0 | 0 |
| Seminal vesicle | | | | | |
| Dark red, serosa | | | 1 | 0 | 0 |
| Rectum | | | | | |
| Dark red, serosa | | | 1 | 0 | 0 |
| Skin / subcutis | | | | | |
| Dark red area, subcutis | Back | | 1 | 0 | 0 |

[a]Number of animals examined
[b]Number of animals with findings

[4.2.1.1-15 Table 1を改変]

## 2.6.2.2.14 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおけるエミシズマブの影響（200 mg/kg 皮下投与）

（資料番号4.2.1.1-16）

*In vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害（2.6.2.2.8及び2.6.2.2.9）が出血に影響するかを評価するため，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて本薬高用量皮下投与（200 mg/kg）の影響を検討した。

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルは，2.6.2.2.10の試験と同様に作製した。本薬（200 mg/kg）は，#273投与の4日前（Day −4）に1回皮下投与した。対照群（n = 6）及び本薬 200 mg/kg 投与群（n = 4）の2群を設定した。ただし，対照群としては全く同じ操作を行うため，動物倫理の観点から動物数を減らす目的で，本試験では対照群を作製せず，別試験（2.6.2.2.10）で作製した対照群の値を引用した。

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，対照群の Day 0に対する血液ヘモグロビン濃度の相対値は徐々に減少し，Day 3での平均値は54%であった。本薬 200 mg/kg 投与群の Day 3における血液ヘモグロビン濃度相対値の平均値は102%であり，対照群と比べて有意に高かった（4.2.1.1-16 Figure 1及び Table 1）。

#273による FVIII の中和及び穿刺等の出血刺激により，対照群の出血痕面積は徐々に増加し，

Day 3での平均値は208 $cm^2$であった。本薬 200 mg/kg 投与群の Day 3における出血痕面積の平均値は6 $cm^2$であり，対照群と比べて有意に小さかった（4.2.1.1-16 Figure 2及 Table 2）。

本薬 200 mg/kg 投与群では，Day −4の本薬投与により，Day 0の APTT の平均値は，Day −4と比べて3秒短縮した。#273投与により，対照群の APTT の平均値は21秒から47秒に延長し，Day 3では38秒であった（4.2.1.1-16 Figure 3A）。一方，本薬 200 mg/kg 投与群では#273投与による APTT の延長はみられなかった。対照群及び本薬 200 mg/kg 投与群のいずれの PT も，実験期間中ほぼ一定（9秒前後）であり，#273及び本薬の投与により，PT に顕著な変化はみられなかった（4.2.1.1-16 Figure 3B）。

以上より，200 mg/kg の本薬を皮下投与しても出血は増加せず，逆に出血傾向が有意に抑制されたことから，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害は，本モデルにおいて *in vivo* での出血増加をもたらさないことが明らかになった。

また，本薬投与4日後（Day 0）の血漿中濃度は1720 ± 230 μg/mL（平均値 ± 標準偏差），Day 3は1620 ± 100 μg/mL であり，Day 0から Day 3まで，ほぼ横ばいであった。

## 2.6.2.2.15 カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおけるエミシズマブの皮下投与部位出血への影響

（資料番号4.2.1.1-17）

FVIII 中和抗体投与により FVIII 活性を低下させたカニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおいて，FIXa 及び FX に対する二重特異性（bispecific）抗体である本薬，並びに FX に対する monospecific 抗体である CH5534263の皮下投与部位の出血について検討した。また，本薬及び CH5534263の溶媒に関して，arginine（Arg）含有及び Arg 非含有の各溶媒で皮下投与部位出血への影響が異なるかについても検討した。

カニクイザルを用いた4週間間歇皮下投与毒性試験（2.6.6.3.1）において，本薬の全投与群で，外貌からの観察では変化が認められなかったものの，投与部位の皮下織に肉眼的に暗赤色部がみられ，病理組織学的には軽度な出血がみられた。この原因として，投与手技の影響，投与部位局所で高濃度の本薬が血液凝固を阻害する可能性，本薬の不純物として含まれる CH5534263及びその類縁物質の影響，あるいは本薬の溶媒に含まれる Arg の影響が考えられた。そこで，出血傾向を有するカニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルを用いて，本薬，CH5524263及び溶媒（Arg 含有及び非含有）の皮下投与部位への影響を評価した。

雄カニクイザルに#273を静脈内投与（10 mg/kg）し，FVIII 活性を低下させて後天的に血友病 A 病態にした。更に，#273投与約2時間後に麻酔下で背部皮下に本薬又は CH5534263を投与した。皮下投与は1匹あたり8カ所とし，8カ所にそれぞれ異なる投与液を投与した（1匹あたり8種類の投与液，下表）。

| 本薬（n = 4） | |
|---|---|
| Arg 含有溶媒 | Arg 非含有溶媒 |
| 本薬-Arg 含有溶媒1 mg/kg | 本薬-Arg 非含有溶媒1 mg/kg |
| 本薬-Arg 含有溶媒6 mg/kg | 本薬-Arg 非含有溶媒6 mg/kg |
| 本薬-Arg 含有溶媒30 mg/kg | 本薬-Arg 非含有溶媒30 mg/kg |

| CH5534263（n = 2） | |
|---|---|
| Arg 含有溶媒 | Arg 非含有溶媒 |
| CH5534263-Arg 含有溶媒0.06 mg/kg | CH5534263-Arg 非含有溶媒，0.06 mg/kg |
| CH5534263-Arg 含有溶媒0.36 mg/kg | CH5534263-Arg 非含有溶媒，0.36 mg/kg |
| CH5534263-Arg 含有溶媒1.8 mg/kg | CH5534263-Arg 非含有溶媒，1.8 mg/kg |

本薬又は CH5534263の投与3日後に，皮下投与部位に関して，外貌観察及び剖検による皮下織の観察を行い，更に組織標本の病理組織学的検査を行った。

その結果，外貌からの観察では全投与部位で変化が認められなかった。しかし，一部の投与部位の皮下織において，肉眼的に暗赤色部がみられ，病理組織学的には軽微あるいは軽度な出血性変化がみられた。各投与部位皮下織におけるこれらの暗赤色部は，溶媒，本薬及びCH5534263の各投与部位の比較において，その大きさに明らかな差はみられず，発現頻度にも大差はなかった（4.2.1.1-17 Table 1）。また，暗赤色部の程度及び頻度に，本薬及びCH5534263の濃度依存性はみられず，更に，溶媒中の Arg の有無による明らかな影響も認められなかった。以上より，投与部位皮下織における暗赤色部は，注射針の刺入による物理的影響等の投与手技に起因する変化である可能性が考えられた。

また，投与3日後の血漿中本薬濃度は，441 ± 29 μg/mL（平均値 ± 標準偏差），血漿中CH5534263濃度は，33 μg/mL（平均値）であった。

### 2.6.2.2.16 カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおけるエミシズマブの皮下剥離部出血への影響

（資料番号4.2.1.1-18）

本薬を皮下投与（10 mg/kg）して4日目のカニクイザルに FVIII に対する中和抗体を投与して血友病 A 病態にしたのち，皮下剥離により出血を惹起した。この皮下剥離傷害部に本薬（80 mg/mL）を皮下投与して，皮下剥離部出血に対する本薬の影響を評価した。

本薬（118又は120 mg/mL）を血友病 A 病態にしたカニクイザルに皮下投与しても，溶媒投与と比較して投与部位の出血性変化に顕著な差はみられなかった（2.6.2.2.15）。しかしながら，投与部位へ何らかの出血性刺激が加わった際に，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬の凝固阻害作用（2.6.2.2.8及び2.6.2.2.9）が及ぼす影響は不明であった。そこで，カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルを用いて，皮下剥離の傷害を施した部位へ本薬（80 mg/mL）を皮下投与し，高濃度の本薬が出血に及ぼす影響を評価した。

雄カニクイザルに#273を静脈内投与（10 mg/kg）し，FVIII 活性を低下させて後天的に血友病 A 病態にした。#273投与後に，麻酔下で腹部に左右2カ所の皮下剥離を施した（Day 0）。その後速やかに，この皮下剥離部に本薬（80 mg/mL，皮下剥離部1カ所につき2 mL）を皮下投与した（本薬投与群，n = 3）。本薬は，臨床試験での反復皮下投与を想定して，#273投与及び皮下剥離の4日前（Day −4）にも皮下投与（10 mg/kg）を行った。対照として，本薬溶液の代わりに本薬の溶媒を同容量かつ同用法にて皮下（Day −4）及び腹部皮下剥離部（Day 0）に投与した溶媒投与群（n = 3）を設けた。Day 1の皮下剥離部の出血痕面積を出血の評価指標として測定した。

その結果，剥離部ごとの体表出血痕面積（4.2.1.1-18 Figure 1A）は，溶媒投与群と比較して本薬投与群で有意に小さかった。また，個体ごとの2カ所剥離部の平均体表出血痕面積（4.2.1.1-18 Figure 1B）は，溶媒投与群の平均値（16.7 $cm^2$）と比較して本薬投与群の平均値（3.2 $cm^2$）が小さい傾向にあった。

以上より，本モデルにおいて血友病 A の定期投与療法として本薬を反復皮下投与しているときに，投与部位に出血刺激が加わっても，投与した高濃度の本薬が出血を増悪させる可能性は低いことが示された。

また，本薬投与4日後（Day 0）の血漿中濃度は103 ± 10.4 μg/mL（平均値 ± 標準偏差）であり，Day 0の皮下剥離部皮下への投与後，Day 1の血漿中濃度は1170 ± 123 μg/mL であった。

### 2.6.2.2.17 カニクイザル静脈うっ血モデルにおけるエミシズマブの血栓形成への影響

（資料番号4.2.1.1-19）

本薬の凝固反応促進活性が血栓形成リスクを増大させるかを評価するため，カニクイザル静脈うっ血モデルにおいて，本薬の血栓形成への影響を検討し，FVIIa 及び FVIII の血栓形成への影響と比較した。

FVIII 及びバイパス製剤の血液凝固促進は，反面，血栓形成を引き起こす可能性を有している。たとえばバイパス製剤のひとつである FVIIa は，ウサギうっ血モデルにおいて局所的な血栓形成を促進することが報告されている[6]。

麻酔下の雄カニクイザルにおいて，検体静脈内投与後に（対照は投与なしで），1本の静脈につき2カ所を結紮して結紮部位の間にうっ血を起こした。静脈として左右の頸静脈と大腿静脈を使用した。うっ血開始約1.5時間後に，うっ血部位に生じた血栓の重量を測定し，血栓形成に対する検体の影響を評価した。対照（投与なし）と陽性対照物質として設定した FVIIa の評価は同一個体の片側ずつで行った。すなわち，検体投与なしに片側の静脈のうっ血（1回目）を開始し，その後 FVIIa を投与して反対側の静脈のうっ血（2回目）を開始した（下表参照）。本薬と FVIII の評価における投与とうっ血についても，下表に示した。

| 1回目のうっ血（片側） | 2回目のうっ血（1回目の反対側） |
|---|---|
| 対照（投与なし） | FVIIa 120 μg/kg 投与後 |
| 本薬 1 mg/kg 投与後 | 本薬 2 mg/kg 投与後 |
| 1回目の FVIII 25 U/kg 投与後 | 2回目の FVIII 25 U/kg 投与後 |

対照（投与なし）では，うっ血部位に血栓がほとんど観察されないのに対して，陽性対照である FVIIa の静脈内投与では，うっ血部位の血栓重量が有意に増加した。本薬及び FVIII の静脈内投与でもうっ血部位に血栓が生じ，その血栓重量は FVIIa 投与で生じる血栓重量を著しく上回るものではなかった（4.2.1.1-19 Figure 1）。

以上より，本薬が血栓を生じるリスクは，FVIIa 及び FVIII でみられる血栓形成リスクを著しく上回るものではないと考えられた。

また，血漿中本薬濃度は，本薬 1 mg/kg 及び2 mg/kg の静脈内投与直後で，それぞれ23.3 ± 6.3 μg/mL（平均値 ± 標準偏差）及び49.4 ± 9.8 μg/mL であった。

### 2.6.2.2.18 カニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおけるエミシズマブとバイパス製剤併用の血栓形成への影響

（資料番号4.2.1.1-20）

カニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおいて，本薬とバイパス製剤を併用した場合の血栓形成への影響を検討した。

雄カニクイザルに#273を静脈内投与（10 mg/kg）し，FVIII 活性を低下させて後天的に血友病 A 病態にした。血友病 A 病態にした麻酔下のカニクイザルにおいて，検体静脈内投与後に（対照群は投与なしで），1本の静脈につき2カ所を結紮して結紮部位の間にうっ血を起こした。静脈として左右の頸静脈と大腿静脈を使用した。うっ血開始約1.5時間後に，うっ血部位に生じた血栓の重量を測定し，血栓形成に対する検体の影響を評価した。以下の6群を設定した。

1）対照群
2）FVIIa：120 μg/kg 投与群
3）aPCC：100 U/kg 投与群
4）本薬：3 mg/kg 投与群
5）FVIIa＋ 本薬：120 μg/kg＋3 mg/kg 投与群
6）aPCC＋ 本薬：100 U /kg＋3 mg/kg 投与群

対照（投与なし）群及び本薬単独投与群では，すべてのうっ血部位に血栓がみられなかったのに対して，FVIIa 又は aPCC の単独投与群では，うっ血部位に血栓がみられた。この血栓重量は，FVIIa 投与群よりも aPCC 投与群において増加する傾向がみられた（4.2.1.1-20 Figure 1）。

頸静脈と大腿静脈それぞれにおいて，本薬単独投与群では血栓がみられなかったのに対して，本薬と FVIIa 又は aPCC の併用投与群では，うっ血部位に血栓がみられた。この併用時の血栓重量は，aPCC 単独投与群の最大値より増加した例もあったが，それぞれ FVIIa 又は aPCC の単独投与群と比較して，有意な差はみられなかった（4.2.1.1-20 Figure 1A）。

個体ごとの頸静脈と大腿静脈の血栓重量の和においては，本薬と FVIIa の併用投与群で，FVIIa 単独投与群よりも血栓重量が増加する傾向がみられたが，この併用時の血栓重量は aPCC 単独投与群の最大値を上回るものではなかった。本薬と aPCC の併用投与群では，aPCC 単独投与群の最大値よりも血栓重量が増加した個体もあったが，本実験条件では併用による増加は明確ではなかった（4.2.1.1-20 Figure 1B）。

循環血中の血小板数，フィブリノーゲン濃度，フィブリン・フィブリノーゲン分解産物（fibrin and fibrinogen degradation products，FDP）濃度及び D-ダイマー濃度の，うっ血前後の変化を測定した結果，血小板数，フィブリノーゲン濃度及び FDP 濃度は，いずれの群においても，うっ血前後で明らかな差はみられなかった（4.2.1.1-20 Figure 3）。D-ダイマー濃度は，aPCC 単独投与群及び本薬と aPCC の併用投与群においては，全例で，うっ血後にわずかに増加したが，この併用投与群における D-ダイマー濃度の増加と aPCC 単独投与群における増加の間に，明らかな差はみられなかった。それ以外の群では，うっ血前後で D-ダイマー濃度に明らかな差はみられなかった。血小板数，フィブリノーゲン濃度，FDP 濃度及び D-ダイマー濃度の結果から，いずれの群でも，全身の凝固及び線溶の亢進を示唆する顕著な変化はみられなかった。

これらのことから，本薬と FVIIa 又は aPCC を併用した場合に，aPCC でみられる血栓形成リスクを著しく上回る可能性は低いと考えられた。

また，血漿中本薬濃度は，本薬 3 mg/kg 投与，FVIIa 120 μg/kg ＋ 本薬 3 mg/kg 投与及び aPCC 100 U /kg ＋ 本薬 3 mg/kg 投与の各群において，静脈内投与直後で，それぞれ44.6 μg/mL（平均値），41.8 μg/mL 及び48.2 μg/mL であった。

## 2.6.2.3 副次的薬理試験

### 2.6.2.3.1 ヒト及びカニクイザル Fcγ レセプターに対する結合性

（資料番号4.2.1.2-1）

本薬は，定常領域をヒト化改変 IgG4とした bispecific 抗体である。ヒト Fcγ レセプター（hFcγR）及びカニクイザル Fcγ レセプター（cyFcγR）に対する本薬，既売医薬品で定常領域がヒト IgG1のリツキシマブ及びヒト IgG4のナタリズマブの20°C 条件下での結合量を表面プラズモン共鳴により測定した。

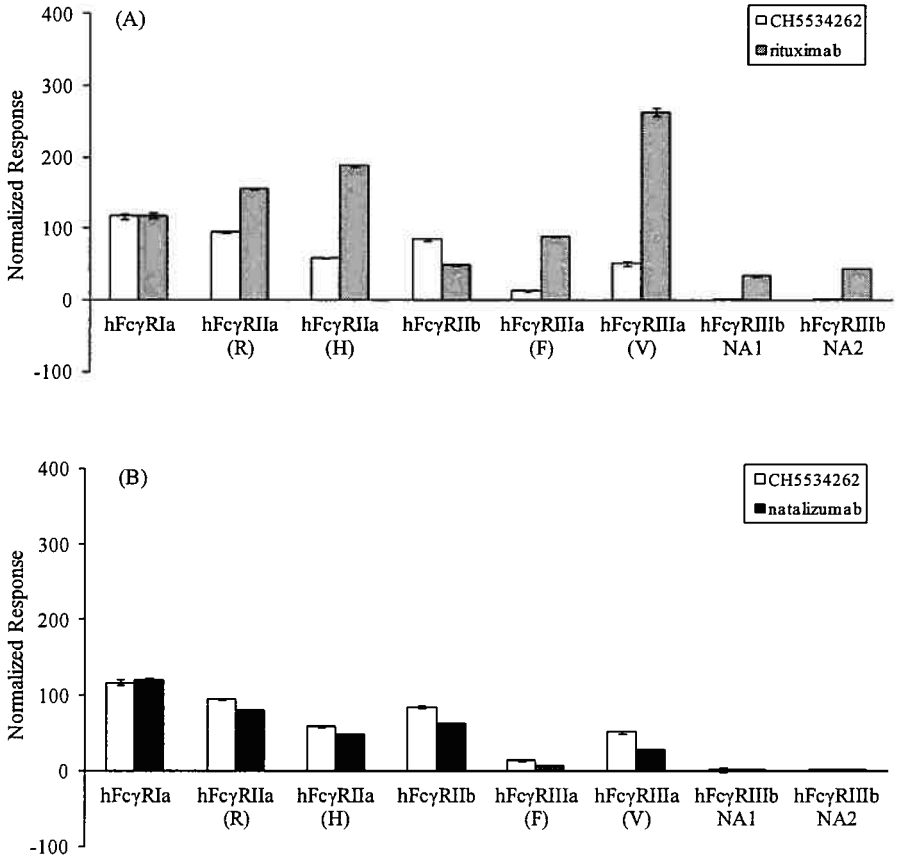
1塩基多型を含む8種類の hFcγR（Ia，IIa，IIb，IIIa，IIIb）に対する本薬の結合量は，リツキシマブとの比較において，hFcγRIIb に対しては若干増加していたが，他の hFcγR に対しては

同等又は減少していた（図 2.6.2.3.1-1A）。また，これらの hFcγR に対する本薬の結合量は，ナタリズマブと比較して同等又は若干増加していた（図 2.6.2.3.1-1B）。

1塩基多型を含む7種類の cyFcγR（Ia，IIa，IIb，IIIa）すべてに対して本薬は結合した。これらの cyFcγR に対する本薬の結合量は，リツキシマブとの比較において，cyFcγRIIa3を除く cyFcγR に対して同等又は減少していた（図 2.6.2.3.1-2A）。cyFcγRIIa3に対する本薬の結合量は，リツキシマブの結合量に比べて若干増加していた。また，これらの cyFcγR に対する本薬の結合量は，ナタリズマブと比較して同等又は若干増加していた（図 2.6.2.3.1-2B）。

以上，hFcγR 及び cyFcγR に対して，本薬はリツキシマブ及びナタリズマブと比べて，結合量が極端に増加していないことが明らかとなった。また，本薬の定常領域がカニクイザルへ交差することが明らかとなった。

**図 2.6.2.3.1-1 ヒト FcγR に対するエミシズマブ，リツキシマブ及びナタリズマブの結合**




平均値 ± 標準偏差（n＝3），3回の独立した実験の結果から算出した。

hFcγRIa: human Fc gamma receptor Ia

hFcγRIIa(R): human Fc gamma receptor IIa_167Arg

hFcγRIIa(H): human Fc gamma receptor IIa_167His

hFcγRIIb: human Fc gamma receptor IIb

hFcγRIIIa(F): human Fc gamma receptor IIIa_176Phe

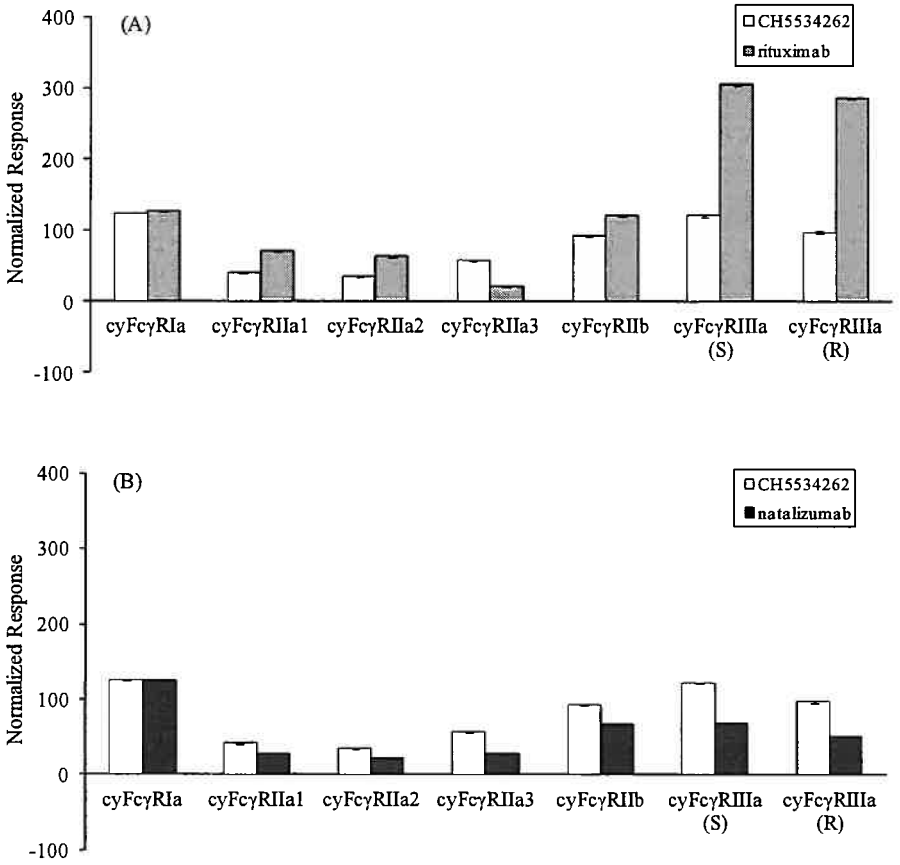
hFcγRIIIa(V): human Fc gamma receptor IIIa_176Val

hFcγRIIIb NA1: human Fc gamma receptor IIIb_neutrophil antigen 1

hFcγRIIIb NA2: human Fc gamma receptor IIIb_neutrophil antigen 2

[4.2.1.2-1 Figure 1を改変]

図 2.6.2.3.1-2 カニクイザル FcγR に対するエミシズマブ，リツキシマブ及びナタリズマブの結合




平均値 ± 標準偏差（n＝3），3回の独立した実験の結果から算出した。

cyFcγRIa: cynomolgus Fc gamma receptor Ia

cyFcγRIIa1: cynomolgus Fc gamma receptor IIa_1

cyFcγRIIa2: cynomolgus Fc gamma receptor IIa_2

cyFcγRIIa3: cynomolgus Fc gamma receptor IIa_3

cyFcγRIIb: cynomolgus Fc gamma receptor IIb

cyFcγRIIIa(S): cynomolgus Fc gamma receptor IIIa_42Ser

cyFcγRIIIa(R): cynomolgus Fc gamma receptor IIIa_42Arg

[4.2.1.2-1 Figure 2を改変]

## 2.6.2.3.2 ヒト及びカニクイザル胎児性 Fc レセプターに対する結合性

（資料番号4.2.1.2-2）

表面プラズモン共鳴を用いて，ヒト胎児性 Fc レセプター（hFcRn）及びカニクイザル胎児性 Fc レセプター（cyFcRn）に対する本薬の結合量を測定し，ナタリズマブを対照物質として，FcRn の結合性の変化について検討した。

pH 7.4では，hFcRn 及び cyFcRn のいずれも，6 μmol/L までの濃度範囲において，本薬又はナタリズマブにほとんど結合しなかった。pH 6.0では，本薬及びナタリズマブの hFcRn に対する結合の $K_D$ 値は，それぞれ3.1～3.6 μmol/L と2.4～2.5 μmol/L であった。また，本薬及びナタリズマブの cyFcRn に対する結合の $K_D$ 値は，それぞれ2.8～3.1 μmol/L と2.1～2.3 μmol/L であった（4.2.1.2-2 Table 2）。

以上の *in vitro* 結合試験の結果から，本薬は，hFcRn及びcyFcRnに対しては，ナタリズマブと同等の親和性及びpH 依存性の結合能を示すことが確認された。本薬とFcRnとの間の正常な結合相互作用は，IgG4の特徴的な性質である長い血漿中半減期へ反映されており，合致した結果となっている（2.6.4及び2.6.5参照）。

### 2.6.2.3.3 ヒト補体C1qに対する結合性

（資料番号4.2.1.2-3）

ヒト補体C1のサブユニットC1qに対する本薬の結合性をELISA法により評価した。ヒト補体C1qに対して，定常領域が改変IgG4である本薬は，IgG4であるナタリズマブとほぼ同程度の結合性を示し，また，IgG1であるリツキシマブと比べると，その結合性は顕著に弱かった（4.2.1.2-3 Figure 1）。

したがって，ヒトC1qとの結合の観点において，本薬が定常領域を介したエフェクター作用を発現するリスクは低いと考えられた。

## 2.6.2.4 安全性薬理試験

本薬がバイオテクノロジー応用医薬品であることから，ICH S6(R1)ガイドライン「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」及びICH M3(R2)ガイドライン「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」を参考に，また，動物実験の3R（代替法の利用／使用動物数の削減／苦痛の軽減）の原則に従って，カニクイザルを用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）の中で中枢神経系，呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響を評価した。その結果，一般状態観察，神経行動学的機能観察（13週間皮下投与試験でのみ実施），心電図検査及び病理学的検査（中枢神経系，呼吸器系及び心血管系に関連する器官・組織の剖検及び組織学的検査）において，皮下投与による30 mg/kgまでの用量で本薬投与に関連した毒性は認められなかった。また，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4）における一般状態観察，心電図検査及び病理学的検査により，中枢神経系，呼吸器系及び心血管系に及ぼす影響を評価した結果，静脈内投与による100 mg/kgまでの用量で，本薬に関連した毒性は認められなかった。

本剤に含まれる新添加物L-アスパラギン酸の中枢神経系，呼吸器系及び心血管系への影響について，本薬のカニクイザルを用いた13週間皮下投与試験（2.6.6.3.2）及び26週間皮下投与試験（2.6.6.3.3）の対照群における一般状態観察，神経行動学的機能観察（13週間皮下投与試験でのみ実施），心電図検査及び病理学的検査により評価した結果，溶媒（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成でありL-アスパラギン酸を含む）の皮下投与に関連した毒性は認められなかった。また，カニクイザルを用いた4週間静脈内投与試験（2.6.6.3.4）の対照群における一般状態観察，心電図検査及び病理学的検査により評価した結果，溶媒（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成でありL-アスパラギン酸を含む）の静脈内投与に関連した毒性は認められなかった。

## 2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

本薬とFVIII又はバイパス製剤を組み合わせて添加したFVIII欠乏ヒト血漿のトロンビン生成試験を実施し，FVIII及びバイパス製剤の作用に対する本薬の影響を検討した（2.6.2.2.7）。また，カニクイザル静脈うっ血モデルにおいて本薬と内在性FVIIIが共存した場合の血栓形成への影響を検討し（2.6.2.2.17），カニクイザルFVIII中和血友病A/静脈うっ血モデルにおいて本薬とバイパス製剤を併用した場合の血栓形成への影響を検討した（2.6.2.2.18）。これらは，本薬とFVIII又はバイパス製剤との相互作用を検討した試験ではあるが，効力を裏付ける試験でもあるため，詳細は効力を裏付ける試験の項にまとめて記載した。

## 2.6.2.6 考察及び結論

非臨床薬効薬理試験の結果から，本薬は，数 μmol/L 程度の親和性にて FIXa 及び FX と結合し，FIXa による FX の活性化を促進する作用，すなわち FVIII の機能を代替する補因子活性を有することが示された[1)]。FVIII 機能代替作用として，本薬は，FVIII 欠乏ヒト血漿において濃度依存的な APTT 短縮及びトロンビン生成増加を示し，血漿凝固を促進した。また，FVIII インヒビター保有の FVIII 欠乏ヒト血漿においても，同様に血漿凝固促進作用を示した[2)]。更に，本薬は，複数のカニクイザル FVIII 中和血友病 A 出血モデルにおいて，予防的投与による出血傾向抑制性作用及び出血時投与による止血作用を示した。カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいては，本薬の皮下投与及び静脈内投与は，出血に伴う血液ヘモグロビン値の低下を抑制する傾向を示し，体表にみられる出血痕面積を有意に抑制した[2)]。カニクイザル FVIII 中和血友病 A/自然出血モデルにおいては，本薬の週1回反復皮下投与は，関節内出血をはじめとする血友病 A に特徴的な出血症状の発現を抑制した[3)]。以上より，本薬は，FVIII 機能代替作用を有し，現行の血友病 A インヒビターの標準療法[4)]に比べて投与負担の少ない低頻度の皮下投与で出血傾向抑制作用を示すことから，血友病 A インヒビター患者の現行療法では達成されていない有効な定期投与療法を提供し得るものと考えられる[1)-5)]。これらの動物モデルで有意な作用がみられた本薬の血漿中濃度（2.6.2.2.12及び2.6.2.2.13）は，血友病 A 患者を対象とした臨床試験（BH29884試験及び BH29992試験）においてエミシズマブ皮下注製剤を3 mg/kg の用量で週1回4週間反復皮下投与（負荷投与）し，その後1.5 mg/kg の用量で週1回反復皮下投与（維持投与）した際の定常状態における本薬の血漿中濃度（2.7.2.3.1.4）とほぼ一致していた。

*In vitro* 酵素アッセイ（2.6.2.2.8及び2.6.2.2.9）でみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害が出血に影響するかを評価するため，カニクイザル FVIII 中和血友病 A/穿刺出血モデルにおいて本薬の高用量（200 mg/kg）皮下投与の影響を検討したところ，本薬の血漿中高濃度（出血モデル作製時の血漿中濃度は Day 0で1720 ± 230 μg/mL，Day 3で1620 ± 100 μg/mL）存在下で出血傷害を惹起しても出血は増加せず，逆に出血傾向が有意に抑制された。また，カニクイザル FVIII 中和血友病 A モデルにおいて皮下剥離傷害部に本薬を局所皮下投与したところ，傷害部位が一時的に本薬の高濃度（投与液濃度の80 mg/mL）へ曝露されても出血の悪化は認められず，逆に出血傾向が抑制された。したがって，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬による FIX 及び FX 関連反応阻害作用は，これらの試験において *in vivo* での出血増加をもたらさないことが明らかとなった。これまでのカニクイザルを用いた薬効薬理，薬物動態及び毒性に関するいずれの非臨床試験においても，*in vivo* における出血傾向の亢進は認められていないことから，*in vitro* 酵素アッセイでみられた本薬の FIX 及び FX 関連反応阻害は，*in vivo* では反映されない *in vitro* の系で阻害活性が強調されて観察された結果と考えられた。

本薬は，FVIII 欠乏ヒト血漿を用いたトロンビン生成試験において，FVIII 又はバイパス製剤との併用でトロンビン生成を更に促進させた。本薬の凝固促進活性が血栓形成リスクを増大させるかを評価するため，カニクイザル静脈うっ血モデル及びカニクイザル FVIII 中和血友病 A/静脈うっ血モデルにおいて，本薬の血栓形成への影響を検討し，FVIII 及びバイパス製剤の血栓形成への影響と比較した。これら試験において，本薬で誘導された血栓形成は，FVIII 及びバイパス製剤で認められた血栓形成を著しく上回ることはなく，更に本薬は，単独投与時と比べてバイパス製剤との併用投与時でも aPCC 単独でみられる血栓形成リスクを著しく上回る可能性は低いと考えられた。本薬は，FVIII を代替する補因子機能を有するが，バイパス製剤のように直接的な凝固惹起のプロテアーゼ活性[6)]を持たないことから，また，その活性発現のために FIXa や活性化リン脂質を必要とし，生体内では止血凝固反応の場で，すなわち活性化血小板膜上で[7)]，集積する FIXa や FX に結合して働くと考えられることから，血液中で自ら血栓形成を惹起する可能性は低いと考えられるが，本薬とバイパス製剤の併用に関して，特に aPCC を集中的に使用した臨床試験症例の中で血栓性の副作用が出現した例があったことから

（2.5.5.3.6.3），添付文書の使用上の注意の項において注意喚起を行う。

FIXa 及び FX に対する本薬の推定結合親和性が，それぞれ数 μmol/L 程度の親和性の $K_D$ 値であることは，本薬の薬効薬理特性を考察する上で重要と考えられる。FVIII は A3-C1-C2の各ドメインから成る L 鎖及び A1-A2-B の各ドメインから成る H 鎖から構成されるヘテロダイマー構造を取り[8]，トロンビンによる酵素的切断を受け活性化され，A1，A2及び A3-C1-C2から成るヘテロトリマー構造の FVIIIa に変換される[9]。FVIIIa の FIXa に対する結合親和性は，L 鎖の FIXa への高親和性結合（非平衡条件下の $K_D$ 値 =14.8 nmol/L[10]及び平衡条件下の $K_D$ 値 =3.6 nmol/L[11]），C2ドメインの FIXa への sub-μmol/L レベルの $K_D$ 値を示す中程度親和性結合（$K_D$ 値 = 108 nmol/L）[12]，A2ドメインの FIXa への高親和性結合（$K_D$ 値 = 3.9 nmol/L）[11]及び A2ドメインの FIXa プロテアーゼドメインへの sub-μmol/L レベルの $K_D$ 値を示す中程度親和性結合（$K_D$ 値 = 300 nmol/L）[13]など複数が報告されている。一方，FVIIIa の FX に対する結合親和性は，L 鎖の FX への sub-μmol/L レベルの $K_D$ 値を示す中程度親和性結合（$K_D$ 値 = 165及び370 nmol/L）[14]及び A1ドメインの FX プロテアーゼドメインへの μmol/L レベルの $K_D$ 値を示す低親和性結合（$K_D$ 値 = 1000～3000 nmol/L）[15]など複数が報告されている。本薬の FIXa 及び FX に対する数 μmol/L 程度の $K_D$ 値の結合親和性は，FVIIIa と FIXa 間の結合親和性と比較してより弱く，また FVIIIa と FX 間の結合親和性と比較してより弱いあるいはほぼ同等と推定される。FVIIIa 及び本薬のいずれにおいても FXa に対する結合親和性は同様に弱く，この特性は，生成した FXa が速やかに解離して下流の凝固反応を効率的に活性化すること，更には，FXa と離れた FVIIIa 又は本薬が繰り返し新たな FX と結合して効率的に FXa 産生反応を回すことに寄与している可能性がある。また，標的抗原との低結合親和性は，本薬の *in vitro* における FIX 及び FX 関連反応阻害作用が *in vivo* において出血等の症状として現れない理由のひとつであり，更に，本薬の血漿中半減期が長いにもかかわらず本薬投与後に *in vivo* において標的抗原の血漿中濃度上昇がみられない理由と考えられる。低結合親和性による標的抗原との結合・解離が，本薬の薬効薬理作用が生理的に適切なバランスで発揮されるために重要であると考察される。

本薬は改変 IgG4抗体であるが，IgG4抗体はエフェクター機能に乏しいため，結合しても副次的な IgG エフェクター機能を惹起しない適切な IgG サブクラスである[16]。本薬の Fcγ を介する相互作用を考察するため，ヒト及びカニクイザルの様々な Fcγ レセプター（hFcγR 及び cyFcγR）に対する本薬の結合性を検討した。本薬は，hFcγR 及び cyFcγR に対して，ナタリズマブ（IgG4サブクラスの治療用抗体）と同等の結合性を示した。更に，本薬のヒト補体 C1q に対する結合性を検討したところ，本薬の結合性は，ナタリズマブと同程度であり，リツキシマブ（IgG1サブクラスの治療用抗体）に比べて，顕著に弱いことが明らかとなった。以上より，Fcγ レセプター及び C1q との結合の観点において，本薬が定常領域を介したエフェクター作用を発現するリスクは低いと考えられた。また同様に，本薬は，ヒト及びカニクイザルの胎児性 Fc レセプター（hFcRn 及び cyFcRn）に対して，ナタリズマブと同等の親和性及び pH 依存性の結合能を示すことが確認された。本薬と FcRn との間の正常な結合相互作用は，IgG4の特徴的な性質である長い血漿中半減期へ反映されており，合致した結果となっている。

安全性薬理試験について，本薬投与が中枢神経系，呼吸器系及び心血管系へ影響を及ぼす可能性は，カニクイザルを用いた皮下及び静脈内投与による反復投与毒性試験の結果から，低いと考えられた。本剤に含まれる新添加物である L-アスパラギン酸が，中枢神経系，呼吸器系及び心血管系へ影響を及ぼす可能性は，カニクイザルを用いた皮下及び静脈内投与による反復投与毒性試験において溶媒（臨床用製剤に含まれる添加剤と同一組成であり L-アスパラギン酸を含む）を投与した対照群の結果から，低いと考えられた。

## 2.6.2.7 図表

図表は本文中に挿入した。

## 2.6.2.8 参考文献


1) Sampei Z, Igawa T, Soeda T, Okuyama-Nishida Y, Moriyama C, Wakabayashi T, et al. Identification and multidimensional optimization of an asymmetric bispecific IgG antibody mimicking the function of factor VIII cofactor activity. PLoS One 2013;8(2):e57479.
2) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody (ACE910): hemostatic potency against ongoing bleeds in a hemophilia A model and the possibility of routine supplementation. J Thromb Haemost 2014;12(2):206-13.
3) Muto A, Yoshihashi K, Takeda M, Kitazawa T, Soeda T, Igawa T, et al. Anti-factor IXa/X bispecific antibody ACE910 prevents joint bleeds in a long-term primate model of acquired hemophilia A. Blood 2014;124(20):3165-71.
4) 「インヒビター保有先天性血友病患者に対する止血治療ガイドライン：2013 年改訂版」の 2015 年補遺版. 日本血栓止血学会 2015
5) Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, Muto A, Kojima T, Soeda T, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. Nat Med 2012;18(10):1570-4.
6) Diness V, Bregengaard C, Erhardtsen E, Hedner U. Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) in a rabbit stasis model. Thromb Res 1992;67(2):233-41.
7) Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. Blood 1990;76(1):1-16.
8) Fay PJ, Anderson MT, Chavin SI, Marder VJ. The size of human factor VIII heterodimers and the effects produced by thrombin. Biochim Biophys Acta 1986;871(3):268-78.
9) Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. J Biol Chem 1991;266(14):8957-62.
10) Lenting PJ, Donath MJ, van Mourik JA, Mertens K. Identification of a binding site for blood coagulation factor IXa on the light chain of human factor VIII. J Biol Chem 1994;269(10):7150-5.
11) Griffiths AE, Rydkin I, Fay PJ. Factor VIIIa A2 subunit shows a high affinity interaction with factor IXa: contribution of A2 subunit residues 707-714 to the interaction with factor IXa. J Biol Chem 2013;288:15057-64.
12) Soeda T, Nogami K, Nishiya K, Takeyama M, Ogiwara K, Sakata Y, et al. The factor VIIIa C2 domain (residues 2228-2240) interacts with the factor IXa Gla domain in the factor Xase complex. J Biol Chem 2009;284:3379-88.
13) Fay PJ, Koshibu K. The A2 subunit of factor VIIIa modulates the active site of factor IXa. J Biol Chem 1998;273(30):19049-54.
14) Takeyama M, Wakabayashi H, Fay PJ. Factor VIII light chain contains a binding site for factor X that contributes to the catalytic efficiency of factor Xase. Biochemistry 2012;51:820-8.
15) Lapan KA, Fay PJ. Localization of a factor X interactive site in the A1 subunit of factor VIIIa. J Biol Chem 1997;272(4):2082-8.
16) Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Frontiers in Immunology 2014;5:1-17.

# ヘムライブラ皮下注30 mg
# ヘムライブラ皮下注60 mg
# ヘムライブラ皮下注90 mg
# ヘムライブラ皮下注105 mg
# ヘムライブラ皮下注150 mg
# （エミシズマブ（遺伝子組換え））

**[インヒビターを保有する先天性血友病 A]**

第2部　（モジュール2）：CTD の概要（サマリー）

## 2.6.3 薬理試験概要表

中外製薬株式会社

略語一覧

| 略語 | 英名 | 和名 |
|---|---|---|
| aPCC | activated prothrombin complex concentrate | 活性型プロトロンビン複合体製剤 |
| APTT | activated partial thromboplastin time | 活性化部分トロンボプラスチン時間 |
| cyFcγR | cynomolgus monkey Fcγ receptor | カニクイザル Fcγ レセプター |
| cyFcRn | cynomolgus monkey neonatal Fc receptor | カニクイザル胎児性 Fc レセプター |
| cyFIX | cynomolgus monkey factor IX | カニクイザル血液凝固第 IX 因子 |
| cyFX | cynomolgus monkey factor X | カニクイザル血液凝固第 X 因子 |
| ELISA | enzyme linked immunosorbent assay | 酵素免疫測定法 |
| ETP | endogenous thrombin potential | 内因性トロンビン産生能，内因性トロンビンポテンシャル，総トロンビン生成量 |
| FIX | factor IX | 血液凝固第 IX 因子 |
| FIXa | activated factor IX | 活性型血液凝固第 IX 因子 |
| FVIIa | activated factor VII | 活性型血液凝固第 VII 因子 |
| FVIII | factor VIII | 血液凝固第 VIII 因子 |
| FVIIIa | activated factor VIII | 活性型血液凝固第 VIII 因子 |
| FX | factor X | 血液凝固第 X 因子 |
| FXa | activated factor X | 活性型血液凝固第 X 因子 |
| FXIa | activated factor XI | 活性型血液凝固第 XI 因子 |
| hFcγR | human Fc receptor | ヒト Fcγ レセプター |
| hFcRn | human neonatal Fc receptor | ヒト胎児性 Fc レセプター |
| hFIX | human factor IX | ヒト血液凝固第 IX 因子 |
| hFIXa | human activated factor IX | ヒト活性型血液凝固第 IX 因子 |
| hFX | human factor X | ヒト血液凝固第 X 因子 |
| hFXa | human activated factor X | ヒト活性型血液凝固第 X 因子 |
| IgG | immunoglobulin G | 免疫グロブリン G |
| IV | intravenous | 静脈内投与 |
| $K_D$ | disassociation constant | 解離定数 |
| NA | not applicable | 該当なし |
| rpFVIII | recombinant porcine factor VIII | 遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子 |
| SC | subcutaneous | 皮下投与 |
| ttPeak | time to peak | 最大トロンビン生成量に至るまでの時間 |

# 目次

頁
2.6.3 薬理試験概要表 ..... 4
2.6.3.1 薬理試験一覧表 ..... 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 ..... 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 ..... 14
2.6.3.4 安全性薬理試験 ..... 15
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 ..... 15

## 2.6.3 薬理試験概要表

### 2.6.3.1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1-1 薬理試験一覧表

Test Article: emicizumab

| Type of Study | Test System/Species | Test Method and Material | Test Facility | Study No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Primary Pharmacology | | | | | |
| Binding to FIX and FX | human, cynomolgus monkey | surface plasmon resonance | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0180 | 4.2.1.1-1 |
| Antigen binding activity of emicizumab to FIX and FX | human | surface plasmon resonance | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0041S | 4.2.1.1-2 |
| Effect of emicizumab on activation of FX by FIXa | human | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0144 | 4.2.1.1-3 |
| Effect of emicizumab on activation of FX by FIXa in non-human species | cynomolgus monkey, rat, and mouse | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0120 | 4.2.1.1-4 |
| Effect of emicizumab on APTT in hemophilia A plasma | human | APTT in FVIII-deficient human plasma | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0139 | 4.2.1.1-5 |
| Effect of emicizumab on FXIa-induced thrombin generation in hemophilia A plasma | human | thrombin generation in FVIII-deficient human plasma | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0143 | 4.2.1.1-6 |
| Pharmacological effect of emicizumab on FXIa-induced thrombin generation in FVIII-neutralized cynomolgus monkey and human plasma | human, cynomolgus monkey | thrombin generation in FVIII-neutralized cynomolgus monkey and human plasma | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0204 | 4.2.1.1-7 |
| Effect of emicizumab on the actions of FVIII and bypassing agents, as indicated by thrombin generation in hemophilia A plasma | human | thrombin generation in FVIII-deficient human plasma | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0198 | 4.2.1.1-8 |

| Type of Study | Test System/Species | Test Method and Material | Test Facility | Study No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Effect of emicizumab on FIX and FX-related reactions | human | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate/ human-derived coagulation factors | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0164 | 4.2.1.1-9 |
| Effect of emicizumab on cynomolgus monkey FIX and FX-related reactions | human, cynomolgus monkey | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate/ cynomolgus monkey- and human-derived coagulation factors | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0165 | 4.2.1.1-10 |
| Effect of SC administration of 0.3, 1, and 3 mg/kg emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd [redacted] | PHM[redacted]-0118<br>PHM[redacted]-0158 | 4.2.1.1-11<br>4.2.1.1-12 |
| Effect of SC administration of 10 and 50 mg/kg emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0112 | 4.2.1.1-13 |
| Effect of IV administration of emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-5054 | 4.2.1.1-14 |
| Effect of repeated SC administration of emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ spontaneous bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ spontaneous bleeding model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0049 | 4.2.1.1-15 |
| Effect of SC administration of 200 mg/kg emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0041 | 4.2.1.1-16 |

| Type of Study | Test System/Species | Test Method and Material | Test Facility | Study No. | Location in CTD |
|---|---|---|---|---|---|
| Effect of SC administration of emicizumab and CH5534263 on bleeding at the SC injection site in a cynomolgus monkey hemophilia A model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0083 | 4.2.1.1-17 |
| Effect of SC administration of emicizumab into the SC detachment injury site in a cynomolgus monkey hemophilia A/ SC detachment injury model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII- neutralized hemophilia A/ SC detachment injury model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0063 | 4.2.1.1-18 |
| Effect of emicizumab on thrombus formation in a cynomolgus monkey venous stasis model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey venous stasis model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0008 | 4.2.1.1-19 |
| Effect of emicizumab and concomitant use of bypassing agents on thrombus formation in a cynomolgus monkey hemophilia A/ venous stasis model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ venous stasis model | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0023 | 4.2.1.1-20 |
| Secondary Pharmacology | | | | | |
| Binding to Fcγ receptors | human, cynomolgus monkey | surface plasmon resonance | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0177 | 4.2.1.2-1 |
| Binding to FcRn | human, cynomolgus monkey | surface plasmon resonance | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0081 | 4.2.1.2-2 |
| Binding to C1q | human | ELISA | Chugai Pharmaceutical Co. Ltd | PHM[redacted]-0061 | 4.2.1.2-3 |

## 2.6.3.2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2-1　効力を裏付ける試験（*in vitro* 薬効薬理試験）

Test Article: emicizumab

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/ Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Binding to FIX and FX | human, cynomolgus monkey | surface plasmon resonance | emicizumab | NA | emicizumab was confirmed to have binding activity for hFIX, hFX, hFIXa, hFXa, cyFIX and cyFX. | 4.2.1.1-1 PHM[redacted]-0180 |
| Antigen binding activity of emicizumab to FIX and FX | human | surface plasmon resonance | Qhomo that has the variable region of emicizumab that recognizes hFIX and hFIXa; Jhomo that has the variable region of emicizumab that recognizes hFX and hFXa | NA | It was suggested that emicizumab has a bispecific target binding affinity ($K_D$) in the low μmol/L concentration range of $1.6 \times 10^{-6}$ and $1.5 \times 10^{-6}$ mol/L to hFIX and hFIXa, respectively and $1.8 \times 10^{-6}$ and $9.8 \times 10^{-7}$ mol/L to hFX and hFXa. | 4.2.1.1-2 PHM[redacted]-0041S |
| Effect of emicizumab on activation of FX by FIXa | human | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate | emicizumab; FVIIIa | NA | emicizumab produced a concentration-dependent increase in absorbance only in the presence of hFIXa, and thus promoted activation of hFX. | 4.2.1.1-3 PHM[redacted]-0144 |
| Effect of emicizumab on activation of FX by FIXa in non-human species | cynomolgus monkey, rat, and mouse | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate | emicizumab; FVIIIa | NA | emicizumab cross-reacted in cynomolgus monkey but not in rat or mouse. | 4.2.1.1-4 PHM[redacted]-0120 |
| Effect of emicizumab on APTT in hemophilia A plasma | human | APTT in FVIII-deficient human plasma | emicizumab; FVIII | NA | emicizumab concentration-dependently shortened APTT in FVIII-deficient human plasma, thereby showing plasma procoagulant activity. The minimum effective concentration of emicizumab in this test was 0.01 μg/mL. | 4.2.1.1-5 PHM[redacted]-0139 |

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/ Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of emicizumab on FXIa-induced thrombin generation in hemophilia A plasma | human | thrombin generation in FVIII-deficient human plasma | emicizumab;<br>FVIII | NA | emicizumab concentration-dependently improved the parameters (i.e., lag time, peak height, ttPeak, and ETP) calculated from the timewise changes in thrombin generation triggered by FXIa in FVIII-deficient human plasma, and promoted thrombin generation. | 4.2.1.1-6<br>PHM[redacted]-0143 |
| Pharmacological effect of emicizumab on FXIa-induced thrombin generation in FVIII-neutralized cynomolgus monkey and human plasma | human, cynomolgus monkey | thrombin generation in FVIII-neutralized cynomolgus monkey and human plasma | emicizumab;<br>rpFVIII | NA | The geometric means of the equivalent concentration of emicizumab corresponding to porcine FVIII activity of 0.01 U/mL in thrombin generation were 4.81 μg/mL and 2.52 μg/mL in cynomolgus monkey plasma and human plasma, respectively. The geometric means of the equivalent concentration of emicizumab corresponding to porcine FVIII activity of 0.05 U/mL in thrombin generation were 67.1 μg/mL and 27.0 μg/mL in cynomolgus monkey plasma and human plasma, respectively. These results showed that pharmacological effect of emicizumab between cynomolgus monkey and human was roughly comparable in thrombin generation. | 4.2.1.1-7<br>PHM[redacted]-0204 |
| Effect of emicizumab on the actions of FVIII and bypassing agents, as indicated by thrombin generation in hemophilia A plasma | human | thrombin generation in FVIII-deficient human plasma | emicizumab;<br>FVIII;<br>FVIIa;<br>aPCC | NA | In combination with either FVIII or aPCC, emicizumab further enhanced thrombin generation. Furthermore, because emicizumab prolonged the lag time after addition of low-concentration FVIIa, it may also delay the starting time of thrombin generation when used concomitantly with FVIIa. On the other hand, emicizumab increased the peak height and ETP after addition of FVIIa, showing that coadministration of FVIIa and emicizumab further increased thrombin generation. | 4.2.1.1-8<br>PHM[redacted]-0198 |
| Effect of emicizumab on FIX and FX-related reactions | human | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate/ human-derived coagulation factors | emicizumab | NA | emicizumab demonstrated inhibitory activity in three (N3, N5 and N6) of the five reactions evaluated, and only weak inhibition in one reaction (N1). | 4.2.1.1-9<br>PHM[redacted]-0164 |

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/ Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of emicizumab on cynomolgus monkey FIX and FX-related reactions | human, cynomolgus monkey | enzyme assays using a synthetic chromogenic substrate/ cynomolgus monkey- and human-derived coagulation factors | emicizumab | NA | In the three reactions in which emicizumab had a clear inhibitory effect on human FIX and FX-related reactions, it also concentration-dependently inhibited the reactions involving cynomolgus monkey FIX and FX. | 4.2.1.1-10 PHM[redacted]-0165 |

NA: not applicable

## 表 2.6.3.2-2 効力を裏付ける試験（*in vivo*薬効薬理試験）

Test Article: emicizumab

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of SC administration of 0.3, 1, and 3 mg/kg emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | rpFVIII: IV twice daily doses on Days 0-2 (total of 6 doses);<br>emicizumab: SC single dose | Control: n=6 (M/F: 6/0);<br>rpFVIII 1 U/kg: n=6 (M/F: 6/0);<br>emicizumab 0.3 mg/kg: n=6 (M/F: 6/0);<br>emicizumab 1 mg/kg: n=6 (M/F: 6/0);<br>emicizumab 3 mg/kg: n=6 (M/F: 6/0) | In a cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/needle-induced bleeding model, decreased blood hemoglobin concentration developed in association with bleeding, and bruising was seen on the skin surface. SC administration of 0.3, 1, or 3 mg/kg of emicizumab showed a tendency to dose-dependently inhibit this decrease in blood hemoglobin concentration relative to that in the control group, and significantly inhibited the area of bruising on the skin surface at doses of 1 and 3 mg/kg. | 4.2.1.1-11<br>4.2.1.1-12<br>PHM[redacted]-0118<br>PHM[redacted]-0158 |
| Effect of SC administration of 10 and 50 mg/kg emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | emicizumab: SC single dose | emicizumab 10 mg/kg: n=4 (M/F: 4/0);<br>emicizumab 50 mg/kg: n=4 (M/F: 4/0) | SC administration of 50 mg/kg of emicizumab significantly inhibited the decrease in blood hemoglobin concentration and inhibited the skin surface bruising area compared to in the vehicle group. The tendency of emicizumab to inhibit these bleeding symptoms was also seen after a SC dose of 10 mg/kg. | 4.2.1.1-13<br>PHM[redacted]-0112 |

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of IV administration of emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | rpFVIII: IV single dose on Day 0 and IV twice daily doses on Days 1-2 (total of 5 doses);<br>emicizumab: IV single dose | Control: n=6 (M/F: 6/0; data from the other study);<br>rpFVIII 3.4 U/kg: n=4 (M/F: 4/0);<br>rpFVIII 10 U/kg: n=4 (M/F: 4/0);<br>emicizumab 0.3 mg/kg: n=4 (M/F: 4/0);<br>emicizumab 1 mg/kg: n=4 (M/F: 4/0);<br>emicizumab 3 mg/kg: n=4 (M/F: 4/0) | IV administration of 0.3, 1, or 3 mg/kg of emicizumab after induction of bleeding showed a tendency to dose-dependently inhibit the decrease in blood hemoglobin concentration, as compared with the control group, and the area of bruising on the skin surface was significantly inhibited at doses of 1 and 3 mg/kg. | 4.2.1.1-14<br>PHM[redacted]-5054 |
| Effect of repeated SC administration of emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ spontaneous bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ spontaneous bleeding model | emicizumab: starting SC dose of 3.97 mg/kg on Day 0, then from Day 7 onwards as a repeated SC doses of 1 mg/kg/week (total of 7 doses) for 8 weeks;<br>rpFVIII: IV doses of 20 U/kg twice weekly for 8 weeks | Control vehicle: n=4 (M/F: 4/0);<br>emicizumab 3.97 mg/kg on Day 0 and 1 mg/kg/week from Day 7: n=4 (M/F: 4/0);<br>rpFVIII 20 U/kg twice weekly: n=4 (M/F: 4/0) | Compared with the vehicle control group, administration of emicizumab on Day 0 as a single SC starting dose of 3.97 mg/kg then from Day 7 onward as a repeated SC dose of 1 mg/kg/week (total 7 doses) yielded a significant increase in the minimum blood hemoglobin concentrations during the observation period, and in the number of days on which any bleeding symptoms (i.e., bruising on the skin surface, hematuria, and claudication associated with arthropathy due to intra-articular bleeding) were not seen. emicizumab also significantly decreased the number of days on which claudication was observed and the number of joints in which intra-articular bleeding was seen at necropsy on Day 56, when compared with the vehicle control group. | 4.2.1.1-15<br>PHM[redacted]-0049 |
| Effect of SC administration of 200 mg/kg emicizumab in a cynomolgus monkey hemophilia A/ needle-induced bleeding model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ needle-induced bleeding model | emicizumab: SC single dose | Control: n=6 (M/F: 6/0; data from the other study);<br>emicizumab 200 mg/kg: n=4 (M/F: 4/0) | SC administration of 200 mg/kg of emicizumab did not increase bleeding rather caused a significant reduction in bleeding tendency. This demonstrated that the inhibitory profile of emicizumab on reactions involving FIX and FX that was seen in the *in vitro* enzymatic assays does not trigger increased bleeding *in vivo*. | 4.2.1.1-16<br>PHM[redacted]-0041 |

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of SC administration of emicizumab and CH5534263 on bleeding at the SC injection site in a cynomolgus monkey hemophilia A model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A model | emicizumab: SC single dose;<br>CH5534263-diminished R3 drug substance (emicizumab): SC single dose;<br>CH5534263: SC single dose | emicizumab (with arginine buffer and non-arginine buffer) 1 mg/kg,<br>6 mg/kg, 30 mg/kg: n=2 (M/F: 2/0);<br>CH5534263-diminished R3 drug substance (emicizumab) (with arginine buffer and with non-arginine buffer) 1 mg/kg, 6 mg/kg, 30 mg/kg: n=2 (M/F: 2/0);<br>CH5534263 (with arginine buffer and non-arginine buffer) 0.06 mg/kg, 0.36 mg/kg, 1.8 mg/kg: n=2 (M/F: 2/0) | Observations of external appearance revealed no changes at any of the injection sites. A macroscopic dark red area was seen in the subcutis at some injection sites, and histopathological examinations revealed minimal or slight hemorrhagic changes. Comparisons of the injection sites in the vehicle, emicizumab, and CH5534263 groups showed no major differences in size, nor any substantial differences in the frequency of occurrence of these dark red colored areas in the subcutis at the injection sites. No concentration dependency was observed in the degree or frequency of dark red areas for either emicizumab or CH5534263. | 4.2.1.1-17<br>PHM[redacted]-0083 |
| Effect of SC administration of emicizumab into the SC detachment injury site in a cynomolgus monkey hemophilia A/ SC detachment injury model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ SC detachment injury model | emicizumab: SC dose of 10 mg/kg 4 days prior to SC detachment injury, then SC dose of 80 mg/mL into the detachment injury site on Day 0 | Control vehicle: n=3 (M/F: 3/0);<br>emicizumab10 mg/kg (4 days prior to SC detachment injury), 80 mg/mL (detachment injury site on Day 0): n=3 (M/F: 3/0) | The area of skin surface bruising at each detachment site was significantly reduced in the emicizumab group compared to in the vehicle group. The average bruised area of the two detachment sites on each animal also tended to be smaller in the emicizumab group than in the vehicle group. | 4.2.1.1-18<br>PHM[redacted]0063 |
| Effect of emicizumab on thrombus formation in a cynomolgus monkey venous stasis model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey venous stasis model | FVIIa: IV single dose;<br>emicizumab: IV two doses;<br>FVIII: IV two doses | Control no dose (first stasis): n=5 (M/F: 5/0);<br>FVIIa 120 μg/kg (second stasis): n=5 (M/F: 5/0);<br>emicizumab 1 mg/kg (first stasis), 2 mg/kg (second stasis): n=4 (M/F: 4/0);<br>FVIII 25 U/kg (first stasis, second stasis): n=4 (M/F: 4/0) | In the (untreated) control group, almost no thrombus formation was observed at the site of stasis but in the positive control group receiving FVIIa, the thrombus weight at the site of stasis increased significantly. Thrombi also formed at the stasis site in the groups receiving emicizumab or FVIII, but the thrombus weights in these groups were not markedly higher than those in the FVIIa group. | 4.2.1.1-19<br>PHM[redacted]-0008 |

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/Dosage | Key Results | Location in CTD/Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Effect of emicizumab and concomitant use of bypassing agents on thrombus formation in a cynomolgus monkey hemophilia A/ venous stasis model | cynomolgus monkey | cynomolgus monkey FVIII-neutralized hemophilia A/ venous stasis model | FVIIa: IV single dose;<br>aPCC: IV single dose;<br>emicizumab: IV single dose;<br>FVIIa + emicizumab: IV single dose;<br>aPCC + emicizumab: IV single dose | Control: n=2 (M/F: 2/0);<br>FVIIa 120 μg/kg: n=2 (M/F: 2/0);<br>aPCC 100 U/kg: n=2 (M/F: 2/0);<br>emicizumab 3 mg/kg: n=3 (M/F: 3/0);<br>FVIIa + emicizumab: n=2 (M/F: 2/0);<br>aPCC + emicizumab: n=2 (M/F: 2/0) | In the control group and the emicizumab-only group, no thrombi were seen at any stasis site, but in the FVIIa and aPCC-only groups, thrombi were seen at the stasis sites. Thrombus weight showed a tendency to be higher in the aPCC group than in the FVIIa group. In the groups receiving emicizumab plus FVIIa or aPCC, thrombi were observed at the stasis sites, and while the thrombus weight in these coadministration groups was higher than the maximum weight in the aPCC-only group in some vessels, it was not significantly different from that in the aPCC-only group. | 4.2.1.1-20<br>PHM[redacted]-0023 |

## 2.6.3.3　副次的薬理試験

### 表 2.6.3.3-1　副次的薬理試験

Test Article: emicizumab

| Type of Study | Test System /Species | Test Method | Compound /Administration | Group/Dosage | Key Results | Location in CTD /Study No. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Binding to Fcγ receptors | human, cynomolgus monkey | surface plasmon resonance | emicizumab; rituximab; natalizumab | NA | The binding of emicizumab to hFcγR and cyFcγR was not markedly greater than that of rituximab and natalizumab. The study findings also showed that the constant region of emicizumab cross-reacted in cynomolgus monkey. | 4.2.1.2-1 PHM[redacted]-0177 |
| Binding to FcRn | human, cynomolgus monkey | surface plasmon resonanc | emicizumab; natalizumab | NA | Affinities and pH-dependent binding to hFcRn and cyFcRn did not greatly differ from those of natalizumab. | 4.2.1.2-2 PHM[redacted]-0081 |
| Binding to C1q | human | ELISA | emicizumab; rituximab; natalizumab | NA | The binding activity of emicizumab to human C1q protein was comparable to that of natalizumab, and that the C1q binding activity of emicizumab and natalizumab was markedly weaker than that of rituximab. | 4.2.1.2-3 PHM[redacted]-0061 |

### 2.6.3.4 安全性薬理試験

2.4.3.3，2.6.2.4及び2.6.6.1項を参照。

### 2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.2.7，2.6.2.2.17及び2.6.2.2.18項を参照。