ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.4 非臨床試験の概括評価

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 4
表目次 5
略語一覧 6
2.4.1 非臨床試験の概要 9
2.4.1.1 ノナコグ ベータ ペゴル分子 9
2.4.1.2 非臨床試験プログラム 11
2.4.1.3 非臨床試験における動物種 11
2.4.1.4 規制当局との協議 11
2.4.1.5 臨床適応 11
2.4.2 薬理試験 13
2.4.2.1 血液凝固 13
2.4.2.2 効力を裏付ける試験 14
2.4.2.2.1 *In vitro* での効力を裏付ける試験 14
2.4.2.2.2 *In vivo* での効力を裏付ける試験 16
2.4.2.3 副次的薬理試験 18
2.4.2.3.1 血漿及び全血を用いた測定法での活性 18
2.4.2.4 安全性薬理試験 19
2.4.3 薬物動態試験 20
2.4.3.1 分析法 20
2.4.3.2 吸収／PK 20
2.4.3.2.1 効力を裏付ける PK 試験 20
2.4.3.2.2 トキシコキネティクス 22
2.4.3.2.3 3 種類の第 3 相臨床試験用ロットを比較するマウスにおける PK 試験 22
2.4.3.2.4 重要な非臨床安全性試験と臨床試験結果の PK の動物種間比較 23
2.4.3.2.5 分布、排泄及び代謝試験のための放射能標識トレーサー 25
2.4.3.2.5.1 総放射能データに基づく推定 PK 26
2.4.3.3 分布 27
2.4.3.4 代謝 29
2.4.3.5 排泄 30
2.4.3.6 薬物動態学的相互作用 30
2.4.4 毒性試験 31

2.4.4.1 単回投与毒性 32
2.4.4.2 反復投与毒性 32
2.4.4.2.1 重要でない反復投与毒性試験（GLP 非適用）－重要な毒性試験（GLP 適用）における投与期間の最適性及び反復投与毒性の検討における Rowett ヌードラット使用可能性の評価 32
2.4.4.2.2 重要な反復投与毒性 33
2.4.4.3 遺伝毒性 35
2.4.4.4 がん原性 36
2.4.4.4.1 血液凝固第 IX 因子 36
2.4.4.4.2 ポリエチレングリコール（PEG） 36
2.4.4.4.3 ノナコグ ベータ ペゴルの反復投与毒性試験 36
2.4.4.4.4 文献検索 37
2.4.4.5 授受胎能、生殖発生毒性 37
2.4.4.6 幼若動物を用いた試験 38
2.4.4.7 局所刺激性 38
2.4.4.8 その他の毒性試験 38
2.4.4.8.1 比較免疫原性 38
2.4.4.8.2 40 kDa PEG の毒性試験 39
2.4.4.8.3 PEG 及び脈絡叢 39
2.4.4.9 添加物 42
2.4.4.10 設定規格の非臨床的妥当性 42
2.4.4.11 容器施栓系からの溶出物（leachable）の毒性学的評価 45
2.4.5 総合的考察及び結論 47
2.4.5.1 ノナコグ ベータ ペゴル及び rFIX における PK/PD の比較 47
2.4.5.2 PK 47
2.4.5.3 毒性 48
2.4.5.4 結論 49
参考文献 50

図目次

ページ

図 2.4-1　ノナコグ ベータ ペゴルの一次構造、赤矢印は活性化ペプチド上の 2 ヵ所の PEG 化可能な N-結合型糖鎖の部位（Asn157 及び Asn167）を示す....10
図 2.4-2　ノナコグ ベータ ペゴルの活性化....10
図 2.4-3　細胞における血液凝固様式....14
図 2.4-4　BeneFIX®又は N9 由来の rFIX と比較したノナコグ ベータ ペゴルの活性化と機能の特性....15
図 2.4-5　ノナコグ ベータ ペゴルの BeneFIX®及び N9 と比較した内皮細胞との結合親和性....16
図 2.4-6　F9-KO マウス尾出血モデルでのノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の効果持続時間....17
図 2.4-7　血友病 B 患者全血中におけるノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性比較....19
図 2.4-8　F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の PK....21
図 2.4-9　F9-KO マウスにおける 3 種類の第 3 相臨床試験用ロットのノナコグ ベータ ペゴル（1.5 mg/kg）静脈内ボーラス投与後の PK....23
図 2.4-10　ラット、サル及びヒト血友病 B 患者におけるノナコグ ベータ ペゴルの定常状態（SS）での静脈内投与用量に対する $AUC_{(0-t)}$....25
図 2.4-11　体内分布、排泄及び代謝試験に用いた放射能標識トレーサーの標識位置....26
図 2.4-12　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル（赤）及び[^{3}H-PEG]（青）の血漿中プロファイル....27
図 2.4-13　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg（PEG として約 0.6 mg/kg）の単回静脈内ボーラス投与後の選択組織における濃度対時間プロファイル（試験番号 214076）....29
図 2.4-14　PT 時間の濃度依存的増加....35
図 2.4-15　非臨床試験における PEG 用量（μg/週）と空胞形成の関連性....41

表目次

ページ

表 2.4-1　F9-KO マウス、血友病 B イヌ及びミニブタにおけるノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の単回静脈内投与後の PK パラメータ 20
表 2.4-2　男性ヒト、雄性ラット及びサルにおける反復静脈内投与後の定常状態でのノナコグ ベータ ペゴルの C_{max}、$AUC_{(0-t)}$及び $t_{1/2}$ 24
表 2.4-3　40 IU/kg（$AUC_{(0-t)}$）又は 100 IU/kg（C_{max}）の動物用量とヒト用量での曝露量比 24
表 2.4-4　ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の組織分布試験の概要 28
表 2.4-5　投与後 12 週での推定排泄回収率（%） 30
表 2.4-6　毒性試験の概略 31
表 2.4-7　ノナコグ ベータ ペゴル製剤の組成 42
表 2.4-8　原薬（DS）及び製剤（DP）の EOSL 規格値、予防治療での推奨用量（40 IU/kg）及び重篤な出血治療での用量（80 IU/kg）における不純物含量を EOSL 規格値とした場合の非臨床試験ロットでの最高不純物含量に対する比 44
表 2.4-9　30℃までの温度で 36 ヵ月間保存したプレフィルド型シリンジのヒスチジン溶液からの溶出物（leachable）の最大臨床曝露量 46
表 2.4-10　5℃で 24 ヵ月又は 5℃で 18 ヵ月に続き 30℃で 6 ヵ月保存した 12 mL のクロロブチルゴム製ストッパー付き[redacted]ガラスバイアルからの溶出物（leachable）の最大臨床曝露量 46

略語一覧

aPTT	:	Activated Partial Thromboplastin Time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
ASN	:	Asparagine（アスパラギン）
ASp	:	Aspartic acid（アスパラギン酸）
AT	:	Antithrombin III（アンチトロンビン III）
AUC	:	Area under the activity versus time curve（活性－時間曲線下面積）
$AUC_{(0-\infty)}$	:	AUC from zero hours to infinity（投与開始時から投与後無限大の AUC）
$AUC_{(0-t)}$	:	AUC from zero to time（投与開始時から投与後任意時間 t の AUC）
$AUC_{(0-96h)}$	:	AUC from zero hours to 96h（投与開始時から投与後 96 時間の AUC）
AUC_{tau}	:	AUC within the dosing interval（1 投与間隔の AUC）
BLA	:	Biologic Licence Application（生物学的製剤承認申請）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human use（ヒト用医薬品委員会）
CL	:	Clearance（クリアランス）
C_{max}	:	Peak activity（最高血中濃度）
CMP-NAN	:	Cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid disodium salt（シチジン-5'-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸二ナトリウム塩)
CNS	:	Central nervous system（中枢神経系）
CSF	:	Cerebrospinal fluid（脳脊髄液）
C57BL	:	C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice（C57 ブラック、バックグラウンド系統として遺伝子改変マウスの作製に広く使用される一般的な近交系実験用マウス）
DNA	:	Deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DP	:	Drug Product（製剤）
DS	:	Drug Substance（原薬）
ECG	:	Electrocardiogram（心電図）
EGF	:	Epidermal Growth Factor（上皮成長因子）
ELISA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicine Agency（欧州医薬品庁）
EOSL	:	End of Shelf Life（申請有効期間内）
EU	:	European Union（欧州連合）
Eq.	:	Equivalents（等価量）
F	:	Female（雌）
F1	:	A factor to account for extrapolation between species（種間での外挿係数）
F2	:	A factor of 10 to account for variability between individuals（個体間の変動を考慮した係数）
F3	:	A variable factor to account for toxicity studies of short-term exposure（毒性試験の期間が短い場合に適用する変数）
F4	:	A factor that may be applied in cases of severe toxicity, e.g., non-genotoxic carcinogenicity, neurotoxicity or teratogenicity（重篤な毒性、例えば、遺伝毒性を伴わない発がん性、神経毒性又は催奇形性の場合に適応される係数）
F5	:	A variable factor that may be applied if the no-effect level was not established（無毒性量が得られていない場合に適用する変数）
FDA	:	Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
FHD	:	First Human Dose（ヒト初回投与）
FIX	:	Coagulation Factor FIX（血液凝固第 IX 因子）
FIX-KO	:	Coagulation Factor FIX-Knock out（血液凝固第 IX 因子ノックアウト）
FIXa	:	Activated Coagulation Factor FIX（活性型血液凝固第 IX 因子）

FV	:	Coagulation Factor V（血液凝固第 V 因子）
FVa	:	Activated Coagulation Factor V（活性型血液凝固第 V 因子）
FVII	:	Coagulation Factor FVII（血液凝固第 VII 因子）
FVIIa	:	Activated Coagulation Factor FVII（活性型血液凝固第 VII 因子）
FVIIa-TF	:	Activated Coagulation Factor FVII - tissue factor（活性型血液凝固第 VII 因子-組織因子）
FVIII	:	Coagulation Factor FVIII（血液凝固第 VIII 因子）
FVIIIa	:	Activated Coagulation Factor FVIII（活性型血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	Coagulation Factor X（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	Activated Coagulation Factor X（活性型血液凝固第 X 因子）
FXI	:	Coagulation Factor XI（血液凝固第 XI 因子）
FXIa	:	Activated Coagulation Factor XI（活性型血液凝固第 XI 因子）
F9-KO	:	Coagulation factor IX Knock out（血液凝固第 IX 因子ノックアウト）
Gla (domain)	:	Gamma-carboxylated (domain)（γ-カルボキシル化（ドメイン））
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性試験の実施の基準）
h(rs)	:	Hour(s)（時間）
HCP	:	Host cell protein（宿主細胞タンパク質）
HE	:	Hematoxylin and eosin（ヘマトキシリン・エオジン）
HMWP	:	High Molecular Weight Protein（高分子タンパク質）
ICH	:	International Conference on Harmonisation（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IgG	:	Immunoglobulin（免疫グロブリン）
IHC	:	Immunohistochemical（免疫組織化学的検査）
INN	:	International Nonproprietary Name（国際一般名）
IU	:	International Unit（国際単位）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
kDa	:	KiloDalton（キロダルトン）
KO	:	Knock Out（ノックアウト）
LLOQ	:	Lower Limit Of Quantification（定量下限値）
LOCI	:	Luminescent Oxygen Channelling Immunoassay（LOCI 法）
LoQ	:	Limit of Quantification（定量限界）
LSC	:	liquid Scintillation counting（液体シンチレーション計数法）
M	:	Male（雄）
MTG	:	Maximum thrombus generation（最高血栓形成（速度））
NA	:	Not applicable（適応なし）
NaCl	:	Sodium Chloride（塩化ナトリウム）
Nc	:	Not calculated（計算せず）
NOAEL	:	No Observed Adverse Effect Level（無毒性量）
N9	:	Recombinant FIX produced as intermediate for nonacog beta pegol（ノナコグ ベータ ペゴルの中間体として製造された遺伝子組換え FIX）
N9-GP	:	ノナコグ ベータ ペゴル
PD	:	Pharmacodynamic(s)（薬力学）
PDE	:	Permissible daily exposure（許容 1 日曝露量）
PDCO	:	Paediatric Committee（小児委員会）
pdFIX	:	Plasma Derived FIX（血漿由来の FIX）
PEG	:	Polyethylene glycol polymer（ポリエチレングリコール）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PK	:	Pharmacokinetic(s)（薬物動態）
PLT	:	Platelet counts（血小板数）

PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan（医薬品医療機器総合機構）
Pos	:	Positive（陽性）
PSC	:	Cytidine-5'-monophospho-2''-yl-(N-(N-(2,3-bis)-methyl-poly(oxyethylen)-oxy)-propyloxycarbonyl)-glycinyl)-D-neuraminic acid disodium salt（シチジン-5'-モノホスホ-2''-イル-(N-(N-(2,3-ビス)-メチル-ポリ(オキシエチレン)-オキシ)-プロピルオキシカルボニル)-グリシニル)-D-ノイラミン酸二ナトリウム塩）
PT	:	Prothrombin Time（プロトロンビン時間）
q.s.	:	Quantum satis (sufficient amount)（十分量）
QWBA	:	Quantitative whole body autoradiography（定量的全身オートラジオグラフィ）
R-time	:	Clot time（凝固時間）
rER	:	Rough endoplasmatic reticulum（粗面小胞体）
rFIX	:	Recombinant Coagulation Factor IX（遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFIXa	:	Activated Recombinant Coagulation Factor IX（活性型遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFVIIa	:	Recombinant Activated Coagulation Factor VII（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
SD	:	Standard Deviation（標準偏差）
SD	:	Single Dose（単回投与）
SEM	:	Standard Error of Means（標準誤差）
SS	:	Steady State（定常状態）
SWP	:	Scientific Working Party（科学的ワーキング・パーティー）
TTC	:	Threshold of Toxicological Concern（毒性学的懸念の閾値）
TEG	:	Thromboelastography（トロンボエラストグラフィー法）
TF	:	Tissue Factor（組織因子）
TFPI	:	Tissue Factor Pathway Inhibitor（組織因子経路インヒビター）
TGA	:	Thrombin Generation Assay（トロンビン生成測定法）
TK	:	Toxicokinetics（トキシコキネティクス）
$t_{1/2}$	:	terminal half-life（消失半減期）
t_{max}	:	time at which the highest concentration occurs（最高血中濃度到達時間）
TNF-α	:	Tumor Necrosis Factor alpha（腫瘍壊死因子 α）
Tyr	:	Tyrosine（チロシン）
U	:	Unit（単位）
US	:	United States（米国）
VEGF	:	Vascular endothelial growth factor（血管内皮細胞増殖因子）
WBCT	:	Whole Blood Clotting Time（全血凝固時間）
WK	:	Week（週）
^{14}C	:	Radiocarbon/Carbon-14（放射性炭素/炭素-14）
^{3}H	:	Tritium/hydrogen-3（トリチウム/水素-3）
40K PEG	:	40 kilo dalton polyethylene glycol （40 キロダルトンポリエチレングリコール）
40 kDa PEG	:	40 kilo dalton polyethylene glycol （40 キロダルトンポリエチレングリコール）

2.4.1　非臨床試験の概要

2.4.1.1　ノナコグ ベータ ペゴル分子

ノボ ノルディスクは PEG 化遺伝子組換えヒト FIX 因子（rFIX）製剤、一般名ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）（以下ノナコグ ベータ ペゴル）［国際一般名（INN）；nonacog beta pegol］を開発した。ノナコグ ベータ ペゴルの一次構造を図 2.4-1 に示す。この分子は、γ-カルボキシグルタミン酸ドメイン（Gla ドメイン）、2 つの上皮成長因子（EGF）様ドメイン、活性化ペプチド（活性化が起きるとノナコグ ベータ ペゴルから開裂する）及びセリンプロテアーゼドメインで構成されている。ノナコグ ベータ ペゴルの中間体として製造された rFIX を本文書では N9 と呼び、その分子量は約 56 kDa である。

N9 の PEG 化は酵素を用いて行われ、N9 の N-結合型糖鎖の末端シアル酸が、グリシンを介して 40 kDa の分枝型ポリエチレングリコール（PEG）を結合させた別のシアル酸に置換する。N9 には N-結合型糖鎖、すなわち PEG 化可能部位は 2 ヵ所あり、どちらも活性化ペプチド上にある（Asn157 及び Asn167）。ノナコグ ベータ ペゴルは大部分（約 80%）がモノ PEG 化体である。ノナコグ ベータ ペゴルのモノ PEG 化体の PEG 化部位は、Asn157 及び Asn167 で、ほぼ等分に分布している。ノナコグ ベータ ペゴルの非 PEG 化体、モノ PEG 化体及び *目的物質A の量は、規格で管理される。モノ PEG 化体及び *目的物質A の PK プロファイルは個別には検討していない。非臨床及び臨床薬物動態（PK）試験により、ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 分布プロファイルが示され、その中には非 PEG 化体、モノ PEG 化体及び*目的物質A がすべて含まれている。ノナコグ ベータ ペゴルの平均分子量は 98 kDa である。

ノナコグ ベータ ペゴルは、他の FIX 製剤よりも半減期（$t_{1/2}$）を長くし、全般的に PK プロファイルを改善することで、治療の有用性を高め、治療の負担を軽減することを目的として開発された。ノナコグ ベータ ペゴルは $t_{1/2}$ が長く、FIX 活性が高値で持続されるため、血友病 B 患者の予防治療の改善、出血治療の簡素化、及び周術期における止血管理の簡素化をもたらすことが期待される。

患者において、ノナコグ ベータ ペゴルはその生理活性物質 FVIIa 及び FXIa によって損傷部位で活性化型 rFIX（rFIXa）に転換される。この過程で、PEG 化された活性化ペプチド（図 2.4-1、赤字部分）が遊離する（図 2.4-2）。したがって、活性化されるとノナコグ ベータ ペゴルは内因性 FIXa と同一の作用機序を持ち、同一の制御機構の対象となる。活性化後は、活性化ペプチドに生物学的役割はなく、タンパク質分解を受け、リンカーに結合した PEG は血中に残る。

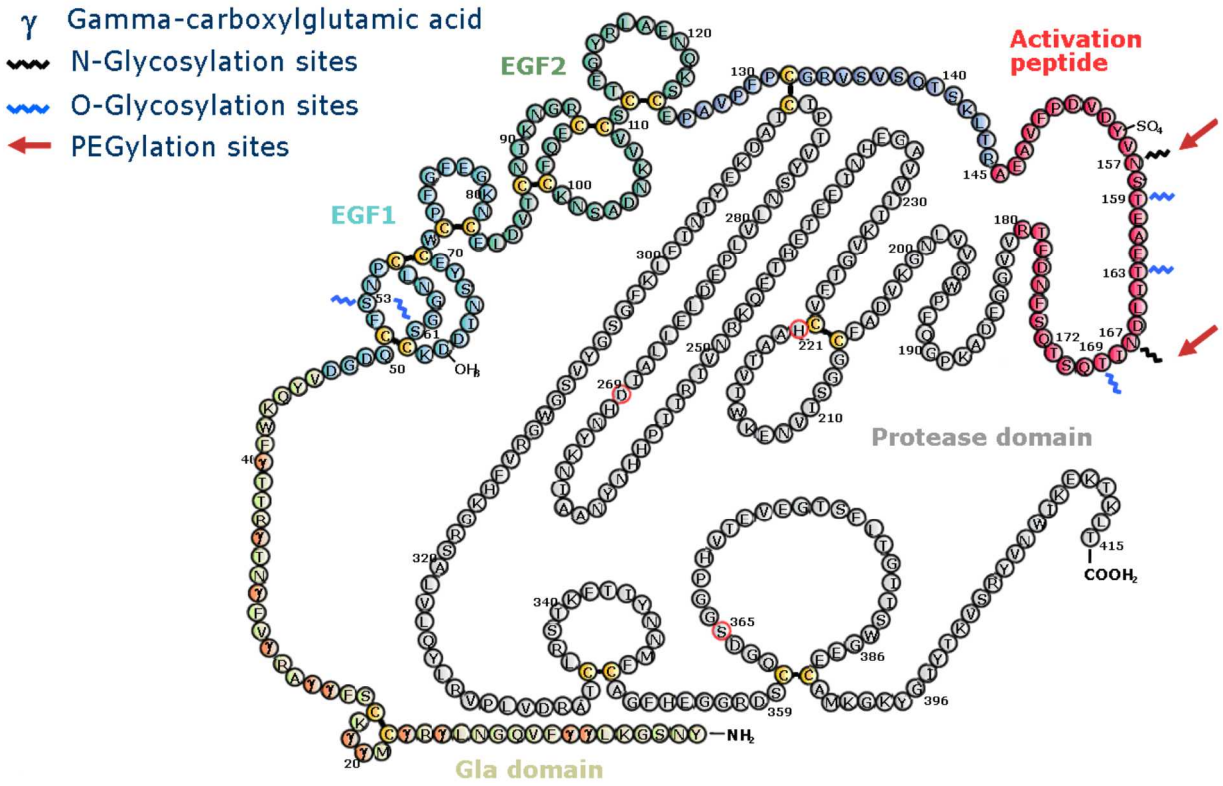


図 2.4-1　　ノナコグ ベータ ペゴルの一次構造、赤矢印は活性化ペプチド上の 2 ヵ所の PEG 化可能な N-結合型糖鎖の部位（Asn157 及び Asn167）を示す

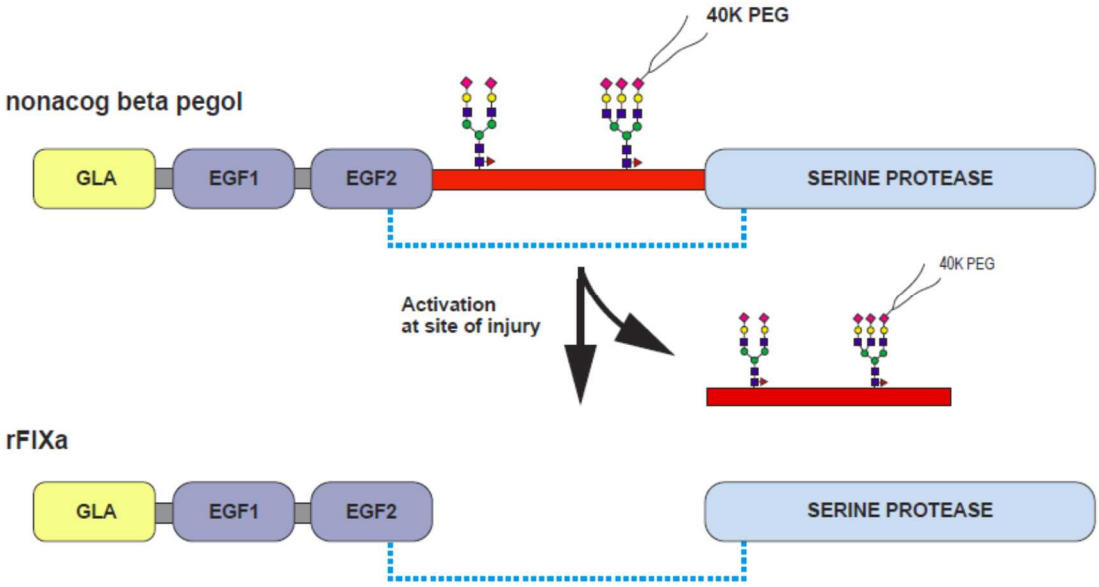


図 2.4-2　　ノナコグ ベータ ペゴルの活性化

2.4.1.2 非臨床試験プログラム

ノナコグ ベータ ペゴルの非臨床安全性プログラムは、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）の、ICH S6(R1)ガイドライン[1]、ICH M3(R2)ガイドライン[2]、欧州医薬品庁（EMA）のヒト用医薬品委員会（CHMP）- Safety Working Party（SWP）の”recommendation to the Paediatric Committee (PDCO) for use of PEGylated drugs in children”[3]に従って策定した。ノナコグ ベータ ペゴルの非臨床試験には効力を裏付ける試験、安全性薬理試験、薬物動態・代謝・分布・排泄試験、毒性試験及びその他の試験が含まれている。重要な *in vivo* 安全性試験は、ラットにおいて 26 週間まで、カニクイザルにおいて 4 週間まで実施した。遺伝毒性及びがん原性試験は、ノナコグ ベータ ペゴル分子の特質を考慮すると意味のあるものとは考えられなかったため実施しなかった。適用患者集団は主として男性であることから生殖発生毒性試験は実施しなかった。局所刺激性は、Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験ならびにウサギにおける局所刺激性試験において評価された。非臨床試験の投与経路は臨床適用経路と同じ静脈内とした。重要な *in vivo* 試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）に準拠して実施した。

2.4.1.3 非臨床試験における動物種

種々の動物モデルを薬力学試験、PK 試験及び毒性試験に用いた。サル、イヌ、ウサギ、マウス、血液凝固第 IX 因子ノックアウトマウス（F9-KO マウス）は薬理学的反応性を有し、rFIX を活性化することが示された。ラットは rFIX を活性化することはできないが、活性型である rFIXa はラットにおいて作用を発揮する。効力を裏付ける試験では、血友病 B 動物モデルとして F9-KO マウス及び血友病 B イヌを用いた。毒性試験は、正常な血液凝固能を有するラット及びカニクイザルを用いて実施した。ラットは、rFIXa、全長分子及び PEG の毒性を評価するために用いられた。PK 試験は効力を裏付ける試験及び毒性試験とほぼ同様の動物種及び動物モデルを用いて実施した。ノナコグ ベータ ペゴルは出血時にのみ活性化されると考えられることから、正常な血液凝固能を有する動物を使用することは妥当と考えられる。

2.4.1.4 規制当局との協議

開発期間中、規制当局との相談を実施し、米国、欧州連合、日本及びカナダの保健関係当局の助言を求めた。

2.4.1.5 臨床適応

予定しているノナコグ ベータ ペゴルの効能及び効果は、血液凝固第 IX 因子欠乏患者における出血傾向の抑制である。

ノナコグ ベータ ペゴルは全年齢層に対して使用可能である。

予定投与経路は静注である。定期補充療法での推奨用量は 40 IU/kg 週 1 回投与である。出血時治療での推奨用量は、軽度又は中等度の出血に対しては 40 IU/kg、重度の出血に対しては 80 IU/kg である。推奨される術前負荷用量は、小手術では 40 IU/kg、大手術では 80 IU/kg で、術後に必要に応じて 40 IU/kg を追加する。

2.4.2　薬理試験

2.4.2.1　　血液凝固

止血の目標は、血管壁の傷害又は断裂部位を被覆するために血小板とフィブリン血栓を形成することである。止血効果は開始期、増幅期及び伝播期といった 3 つの相を経て進行する[4]（図 2.4-3）。

組織因子（TF）発現細胞が傷害部位で血液に曝露され、FVIIa 及び FVII と結合することにより血液凝固プロセスが開始する。TF/FVIIa 複合体が形成され血液凝固第 X 因子（FX）及び FIX の活性化を触媒する。活性型血液凝固第 X 因子（FXa）が生成され、補因子である活性型血液凝固第 V 因子（FVa）との相互作用により少量のトロンビンが生成する。一方で、FIXa は開始期においては明確な役割を有さず、活性化血小板表面に拡散する。TF 発現細胞上で生成された少量のトロンビンが、補因子（FV 及び FVIII）、血液凝固第 XI 因子（FXI）及び血小板を活性化することにより、凝固促進反応が増幅する。

少量の FXa が産生されると、組織因子経路インヒビター（TFPI）により開始期は終了する。活性化血小板は効果的な止血に必要とされるトロンビンバーストのための表面を提供する。血小板が活性化されると、FVa 及び FVIIIa が血小板表面に急速に局在化し、FVIIa/TF 複合体に触媒され生成した FIXa が液相を通して拡散し活性化血小板表面に結合する。同様に、FXI も血小板表面に結合し、少量のトロンビンにより活性化される。血小板に結合した FXIa はさらに FIX を活性化し FIXa が生成される。血小板上にテナーゼ（FIXa/FVIIIa）複合体が形成されると、血漿中の FX が活性化され血小板表面で FXa が生成される。生成された FXa は FVa と共に、安定したフィブリン血栓を形成するために必要なトロンビンバーストを促進する。

血友病 B 患者では、安定した止血栓形成に必要な、活性化血小板上のトロンビンバーストは、FIX の欠乏により減弱している。したがって、易溶解性で血小板凝集による一時血栓を安定化させられない僅かな量の脆弱なフィブリン繊維が形成されるのみである。

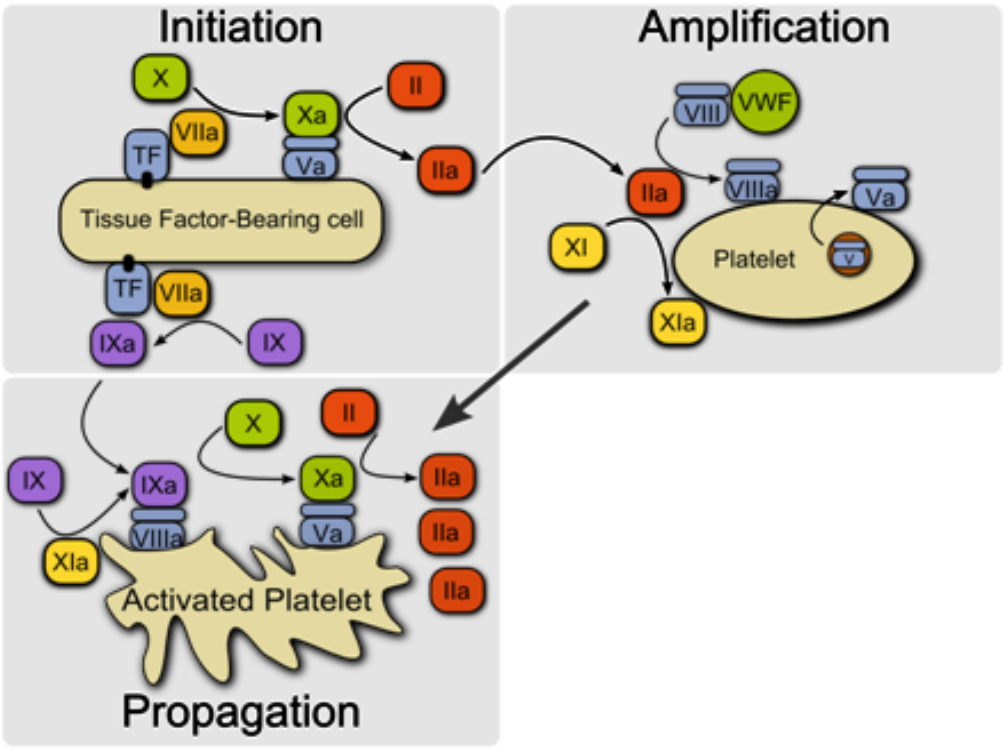


図 2.4-3　　細胞における血液凝固様式
Monroe and Hoffman[4] より改変

2.4.2.2　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験での焦点は、rFIX と比較してノナコグ ベータ ペゴルが同等の薬力学的特性と長い効果持続時間を有することを示すことであり、rFIX（BeneFIX®又は N9）との比較を組み入れた。効力を裏付ける試験に関するデータの大部分は Østergaard ら（2011）[5]により公表されている。

2.4.2.2.1　*In vitro* での効力を裏付ける試験

In vitro で、ノナコグ ベータ ペゴルは生理活性物質 FXIa 及び TF/FVIIa 複合体で活性化されることが示された。FXIa によるノナコグ ベータ ペゴルの活性化は、2 種類の rFIX 分子（BeneFIX®及び N9）の活性化速度はほぼ同等であった（図 2.4-4 の A）。一方、TF/FVIIa 複合体による活性化速度は、2 種類の rFIX 分子（BeneFIX®及び N9）よりも約 50%低かった（図 2.4-4 の B）。しかしながら、活性化されると、ノナコグ ベータ ペゴルの薬力学的特性は、FVIIIa への結合及び FX の活性化能に関して rFIXa と差異は認められなかった（図 2.4-4 の C 及び D）。TF/FVIIa 複合体による FIX 活性化の影響の重要性は不明であるが、血液凝固反応を促進するのに十分な量の FIXa がノナコグ ベータ ペゴルから産生されていた。なお、血友病 B 患者の全血と薬効薬理試験に用いた動物の全血の間で明確な差異は認められなかった。

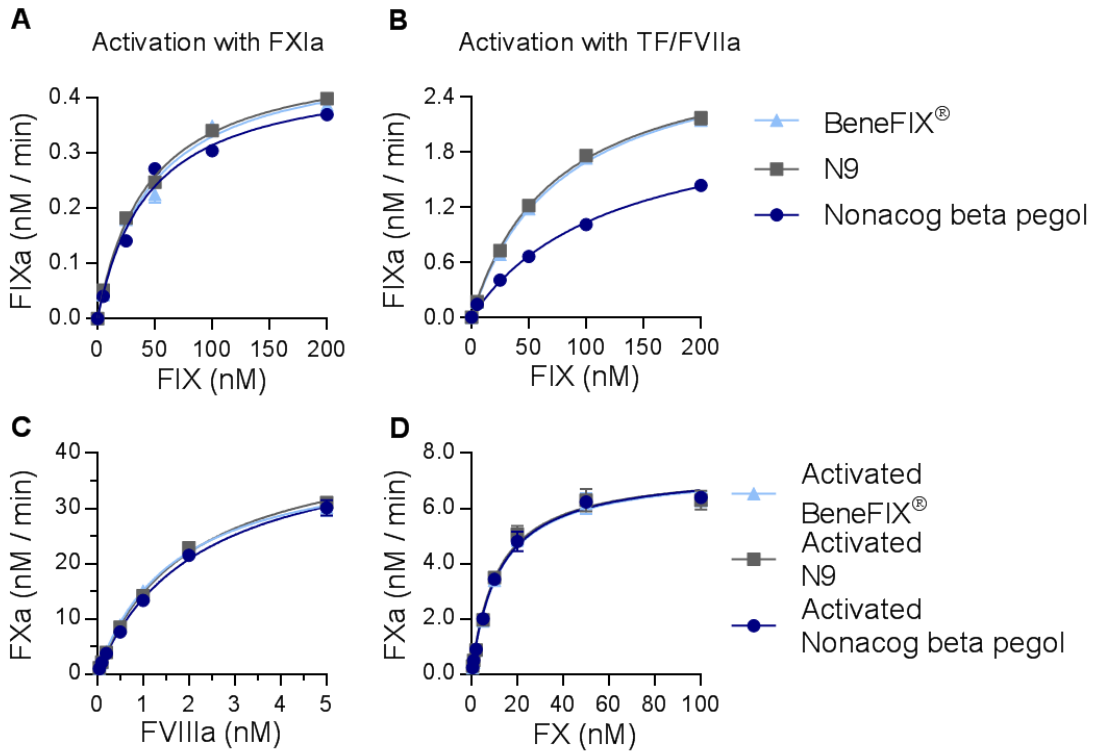


図 2.4-4　BeneFIX®又は N9 由来の rFIX と比較したノナコグ ベータ ペゴルの活性化と機能の特性

(A) Activation with FXIa of nonacog beta pegol, BeneFIX®, or N9 (un-PEGylated rFIX intermediate); B) Activation with TF/FVIIa of nonacog beta pegol, BeneFIX®, or N9, C) Binding of FVIIIa to 0.1 nM activated nonacog beta pegol, BeneFIX®, or N9 and rate of FXa generation; D) Kinetics of FX activation by 20 pM activated nonacog beta pegol, BeneFIX®, or N9 in the presence of saturating levels of FVIII. Note that some of the curves were superimposable. Mean ± SEM generated from three individual experiments.

FIX での報告と同様に[6, 7]、ノナコグ ベータ ペゴルは内皮細胞に結合するが、その親和性は各種 rFIX よりも 20 倍低いことが示された（図 2.4-5）。*In vitro* におけるノナコグ ベータ ペゴルの内皮細胞への結合が弱かった理由として、PEG 化が細胞表面への結合を弱めている可能性が考えられる。また、これはタンパク質部分を検出する生体試料中薬物濃度分析法に基づいて PK を比較した場合に、ノナコグ ベータ ペゴルと rFIX との間で認められる PK 特性の差（血漿への回収率の増加、分布容積の減少）に寄与している可能性がある。このことは、PEG 化がノナコグ ベータ ペゴルの *in vitro* における薬力学的特性にある程度影響することを示している。

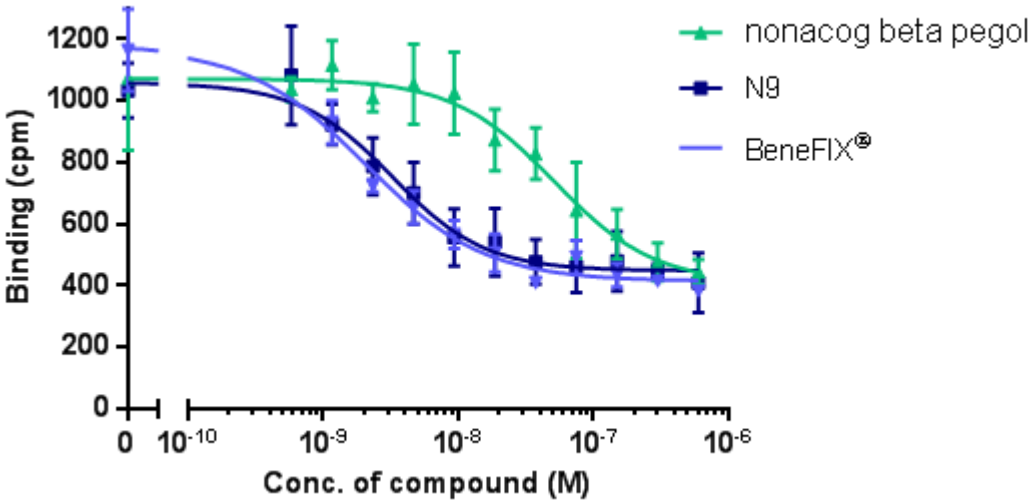


図 2.4-5　　ノナコグ ベータ ペゴルの BeneFIX®及び N9 と比較した内皮細胞との結合親和性

HUVEC cells were incubated with 1 nM ^{125}I-BeneFIX together with non-labelled BeneFIX®, N9 or nonacog beta pegol (0.6-600 nM). The amount of binding was measured and IC50 determined. The graphs illustrate the average ± SD from one representative experiment made in fourfold determinations.

2.4.2.2.2　*In vivo* での効力を裏付ける試験

In vivo での効力を裏付ける試験は一般に認められている 2 種類の血友病 B 動物モデル（F9-KO マウス及び血友病 B イヌ）で実施された。

BeneFIX®と比較したノナコグ ベータ ペゴルの *in vivo* における急性効果及び効果の持続性に関して、F9-KO マウスの 3 種類の異なる損傷モデル（尾出血モデル、塩化鉄損傷モデル、針穿刺膝損傷モデル）により評価した。投与後急性期には BeneFIX®とノナコグ ベータ ペゴルで同等の効果が認められたが、効果持続時間はノナコグ ベータ ペゴルの方が長かった。一例として、尾出血モデルにおける効果持続時間の成績を図 2.4-6 に示す。

尾出血モデルでは、ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の投与後急性期（5 分）及び 5 日目までの各時点で、尾先端切断後 30 分間の出血量と出血時間が記録され、用量反応及び効果持続時間が測定された。出血時間及び出血量を図 2.4-6 に示す。ノナコグ ベータ ペゴルでは、BeneFIX®と比較して、長時間にわたり出血時間の短縮及び出血量の減少が示された。

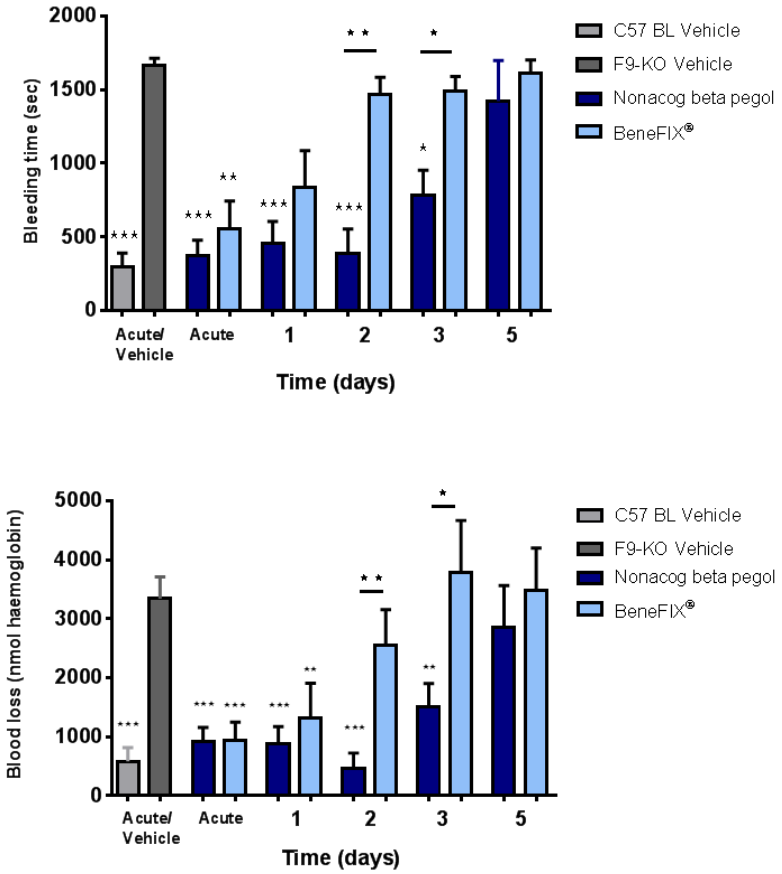


図 2.4-6　　F9-KO マウス尾出血モデルでのノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の効果持続時間

Bleeding time (upper graph) and blood loss (lower graph) were determined 5 min (acute), 1, 2, 3 and 5 days after dosing 0.75 mg/kg nonacog beta pegol or BeneFIX®. Bleeding time and blood loss were recorded for 30 min after 4 mm cut of the tail. F9-KO mice and C57BL mice were administered vehicle representing haemophilia B or a normal haemostatic condition, respectively. Bar graphs with means + SEM (n=8-16). $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**) and $p<0.001$ (***) compared to F9-KO vehicle or between nonacog beta pegol and BeneFIX® at the different days.

針穿刺膝損傷モデルでは、針穿孔膝損傷により膝出血が誘発されると F9-KO マウスでは滑膜及び骨軟骨に変化が生じヒト血友病で認められる変化を模したものとなる。本動物モデルで、250 IU/kg のノナコグ ベータ ペゴルの単回投与は、同用量である 250 IU/kg の BeneFIX®の単回投与と比較して、滑膜の創傷治癒を有意に改善したことが示された。

血友病 B イヌでは、0.4 mg/kg のノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の単回静脈内投与後のトロンボエラストグラフィー法（TEG）及び全血凝固時間（WBCT）を評価した。*In vivo* での $t_{1/2}$ の延長と一致して、ノナコグ ベータ ペゴルの単回投与は、BeneFIX®の単回投与と比較し、TEG と WBCT の両方を指標とした時に効果持続時間の有意な延長が認められた。

結論として、ノナコグ ベータ ペゴルは急性期において BeneFIX®と同等の *in vivo* 反応を示したが、BeneFIX®と比較し、効果持続時間の延長が検討したすべての *in vivo* 動物モデルで認められた。

2.4.2.3 副次的薬理試験

2.4.2.3.1 血漿及び全血を用いた測定法での活性

凝固一段法は、FIX 製品の力価の測定法として欧州薬局方に収載されている。また、凝固一段法は血友病 B 患者の第 IX 因子濃度をモニターするために広く利用されている。本測定法には、技術的設定に応じて、各種の活性部分トロンボプラスチン時間（aPTT）試薬が用いられていると考えられる。rFIX の PEG 化は使用される aPTT 試薬によっては測定に異なる影響を与える。すなわち、ノナコグ ベータ ペゴルは非 PEG 化 rFIX と比較して、凝固時間が延長又は短縮する可能性がある。作用機序試験から、aPTT 試薬を含むシリカへの PEG を介した吸着がノナコグ ベータ ペゴルの早期活性化の原因であり、過大評価をもたらすことが示されたが、過小評価の原因はいまだに不明である。ノナコグ ベータ ペゴルの機能活性を正確に反映する aPTT 試薬を選択するため、追加的に生物学的試験を行い、既承認の製品との比較が必要であった。BeneFIX®がこれらの試験での対照として選択された。TEG（例を図 2.4-7 に示す）、トロンビン生成測定法（TGA）及び発色性合成基質法が実施され、いずれの方法もノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性が同等であることを示した。異なる aPTT 試薬を検討した結果、SyntAFax は PEG の影響がなく、ノナコグ ベータ ペゴルと非 PEG 化 rFIX が同等の活性を示した。したがって、非臨床試験に用いる aPTT 試薬として SyntAFax を選択した。

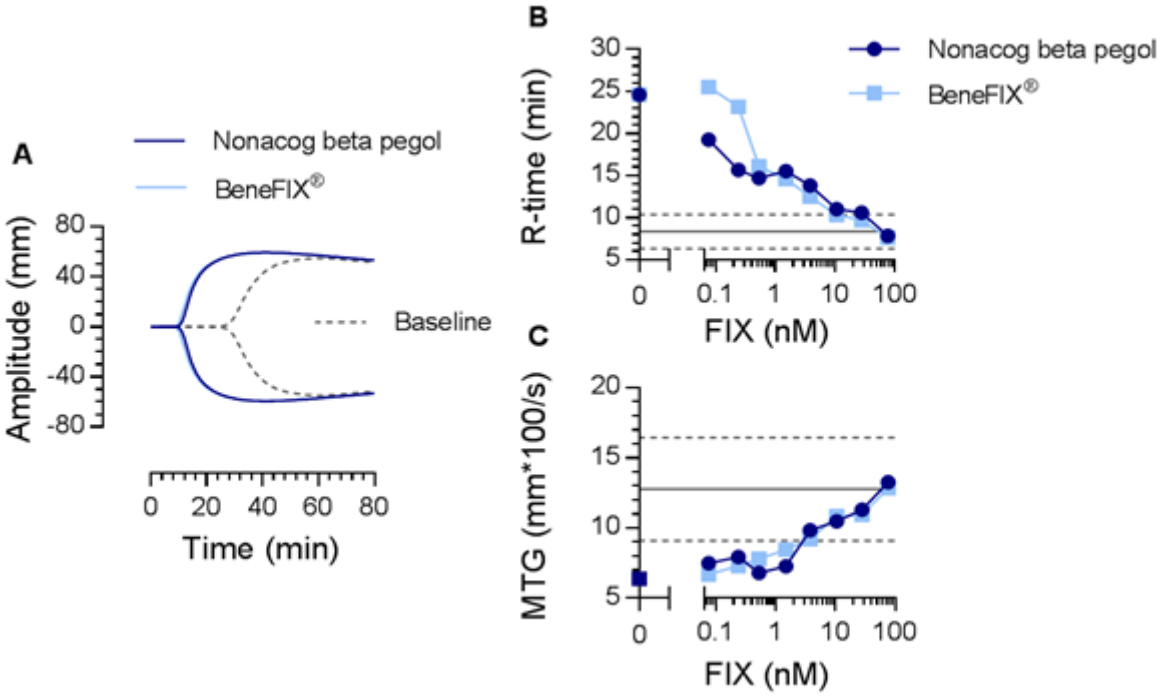


図 2.4-7　　血友病 B 患者全血中におけるノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性比較

A) TEG traces of whole blood from a severe haemophilia B patient before (stippled line) and after addition of 28 nM nonacog beta pegol (dark blue line) or BeneFIX® (light blue line). The TEG traces were superimposable. Clot formation was initiated by addition of kaolin. (B) Clot time (R-time) and (C) Maximum thrombus generation (MTG) values are shown as a function of added nonacog beta pegol or BeneFIX® in blood from the same patient. The normal range ±2 SD are indicated by horizontal lines.

2.4.2.4　　安全性薬理試験

350、1300 又は 3750 IU/kg のノナコグ ベータ ペゴルの週 1 回投与による雄性カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験において、安全性薬理評価項目［血圧（カフ）、心電図（ECG、四肢誘導）、呼吸数（目視評価）及び直腸温の測定、神経学的／CNS 評価項目の観察及び尿検査］を組み込んだ。安全性薬理評価項目は、投与前及び投与後 1～3 時間に評価した。投与に関連する所見は、高用量群（3750 IU/kg）で見られた軽度かつ一過性の全身の震え（body tremors）のみであった。全身の震えは、初回又は 2 回目の投与時での神経学的評価又は臨床観察でのみ認められ、3 回目以降の投与では認められなかった。NOAEL（1300 IU/kg）では、安全性薬理パラメータに及ぼす影響は認められなかった。

2.4.3 薬物動態試験

2.4.3.1 分析法

凝固一段法、発色性合成基質法、酵素免疫吸着測定法（ELISA）又は Luminescent Oxygen Channelling Immunoassay（LOCI）法による抗原（ag）濃度の測定など、ノナコグ ベータ ペゴルの PK を評価するためのさまざまな生体試料中薬物濃度測定法が開発されてきた。凝固活性測定法における変動を最小限に抑えるため、凝固一段法が用いられたすべての非臨床試験での aPTT 試薬として SynthAFax を使用した。これらの生体試料中薬物濃度分析法に共通することは、それらが FIX 活性（凝固）、FIX 抗原（LOCI／ELISA）あるいは全長分子（FIX と PEG 双方を捕捉するサンドイッチ ELISA 法）を測定するため、分子のタンパク質部分を検出することである。毒性試験を支持するため、結合抗体及び中和抗体を検出する分析法が開発された。

2.4.3.2 吸収／PK

2.4.3.2.1 効力を裏付ける PK 試験

In vivo での効力を裏付けるために PK を評価し、F9-KO マウス及び血友病 B イヌにおいてノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®を比較した。第 2 の非げっ歯類動物種としてミニブタを含めた。ノナコグ ベータ ペゴルは 1 相性の消失パターンを示し、ELISA と凝固活性測定法による血漿中 PK プロファイルは類似していた。タンパク質として同用量（mg/kg）を単回静脈内投与後、BeneFIX®と比較し、ノナコグ ベータ ペゴルでは $t_{1/2}$ が約 2～6 倍長く、クリアランス（CL）が約 1/7～1/20 に低下し、C_{max} が約 1～2 倍高かった。これらの PK データは、F9-KO マウス（図 2.4-6 及び図 2.4-8）及び血友病 B イヌにおける薬効薬理試験において、効果持続時間が BeneFIX®よりもノナコグ ベータ ペゴルの方が長かったことと一致している。詳細については表 2.4-1 を参照のこと。

表 2.4-1 F9-KO マウス、血友病 B イヌ及びミニブタにおけるノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の単回静脈内投与後の PK パラメータ

Species (Sex)	Dose	Assay	C_{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	Vz (mL/kg)	$t_{1/2}$ (h)
Nonacog beta pegol						
Mouse, F9-KO (M/F)	1.5 mg/kg	ELISA	15500	3.6	214	41
	1.5 mg/kg	Clot	9913	4.8	479	67
Haemophilia B dog (F)	0.4 mg/kg	Clot	6321	0.62	101	113
Minipig (M)	0.2 mg/kg	ELISA	1993	1.7	188	76

Species (Sex)	Dose	Assay	C_{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	Vz (mL/kg)	$t_{1/2}$ (h)
BeneFIX®						
Mouse, F9-KO (M/F)	1.5 mg/kg	ELISA	8777	36	873	17
	1.5 mg/kg	Clot	7044	50	401	5.5
Haemophilia B dog (F)	0.4 mg/kg	Clot	3434	13	329	18
Minipig (M)	0.2 mg/kg	ELISA	1850	12	260	16

F9-KO mouse: Study ID LEEH080102; Haemophilia B Dog: Study ID MIE080701; minipig: Study ID LEEH080502. M: male; F: female. Clot= one-stage clotting assay. The animals were dosed in mg/kg, for conversion to IU/kg the following conversions can be used: 1 mg nonacog beta pegol= 152 IU, 1 mg of BeneFIX® = ~ 240 IU.

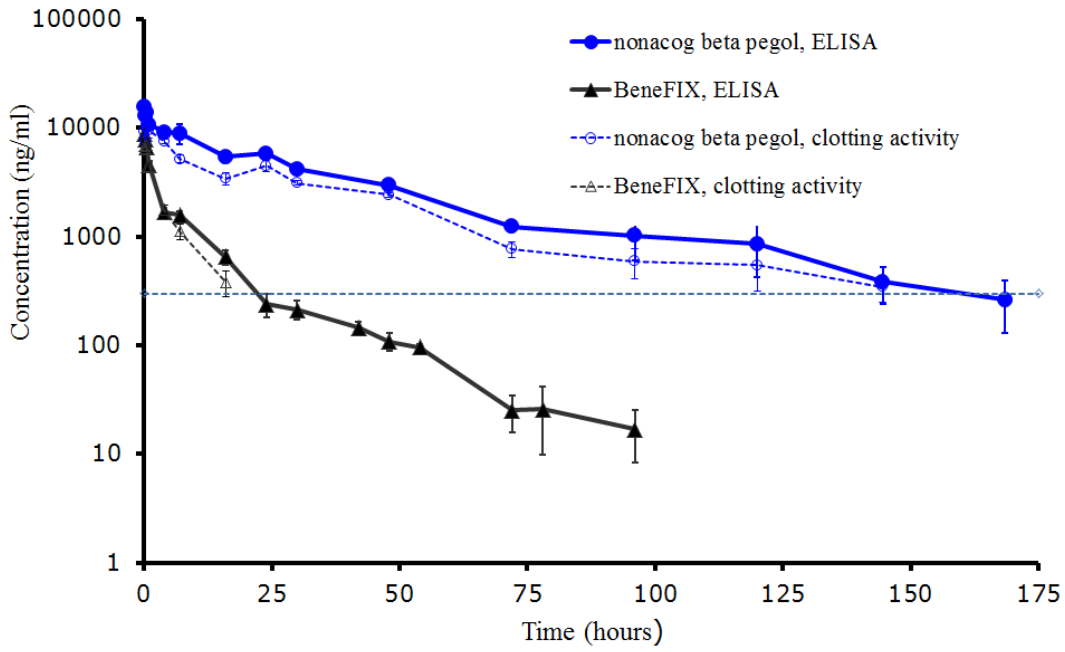


図 2.4-8 F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の PK

PK profiles determined by ELISA (full lines) and clotting activity (dotted lines) after i.v. administration of 1.5 mg/kg of nonacog beta pegol (blue dots) or BeneFIX® (black triangles) to F9 KO mice. Data are shown as mean ± SD (n=3). One-stage clotting assay quantitation limit of approximately 300 ng/mL, shown in figure as a horizontal dotted line

2.4.3.2.2　トキシコキネティクス

Rowett ヌードラット及びカニクイザルを用いた単回及び反復投与毒性試験の一部として、PK／トキシコキネティクスを評価した。Rowett ヌードラット及びカニクイザルにノナコグ ベータ ペゴルを単回静脈内投与後、曝露量は用量比例的に増加した（用量範囲：Rowett ヌードラットで 40～1200 IU/kg 及びカニクイザルで 350～3750 IU/kg）。

Rowett ヌードラットでは、曝露のわずかな性差の兆候が認められ、$AUC_{(0\text{-}96hr)}$は一般に雌ラットで 20～40%低かったが、C_{max} に関して雌雄差は認められなかった。Rowett ヌードラットにおけるノナコグ ベータ ペゴルの $t_{1/2}$ は、単回静脈内投与後で 26～27 時間、反復投与後で 12～39 時間であった（LOCI 法）。Rowett ヌードラットでは、26 週間の全投与期間にわたって曝露が観察され、曝露量の減少及び抗薬物抗体の形成は認められなかった。Rowett ヌードラットでは、推定 $t_{1/2}$ 及び投与間隔（5 日間）から予測されたように、第 1 週と第 26 週間の累積は低かった（<1.4 倍）。

カニクイザルにおける単回静脈内投与後、ノナコグ ベータ ペゴルの $t_{1/2}$ は、40～69 時間（凝固活性測定に基づく）及び 33～166 時間（ELISA に基づく）であった。カニクイザルにおいて、週 1 回の反復投与で 4 週まで曝露量が追跡でき、3 週間投与後の累積係数は 0.9～3 倍であった（ELISA で測定した血漿中濃度及び FIX 凝固活性測定に基づく）。サルでは、反復投与後 $t_{1/2}$ が減少する傾向がみられ、大部分のサルで 5 回以上の投与後、抗薬物抗体の形成と並行して、曝露量の減少が観察された。

2.4.3.2.3　3 種類の第 3 相臨床試験用ロットを比較するマウスにおける PK 試験

2 種類の製造工程を用いて生産された 3 ロットのノナコグ ベータ ペゴルの PK を比較検討するため、F9-KO マウスにおいて、最初の第 3 相臨床試験ロットに用いられた工程（ロット番号：DLDP001 及び CLDP010）と、それ以降の第 3 相臨床試験（NN7999-3774）及び市販予定品に用いられた商業用工程（ロット番号：CR40375）を用いて PK 試験を行った。F9-KO マウスでの単回投与 PK 試験において、異なる 3 ロットの PK プロファイルは同等であった（図 2.4-9）。

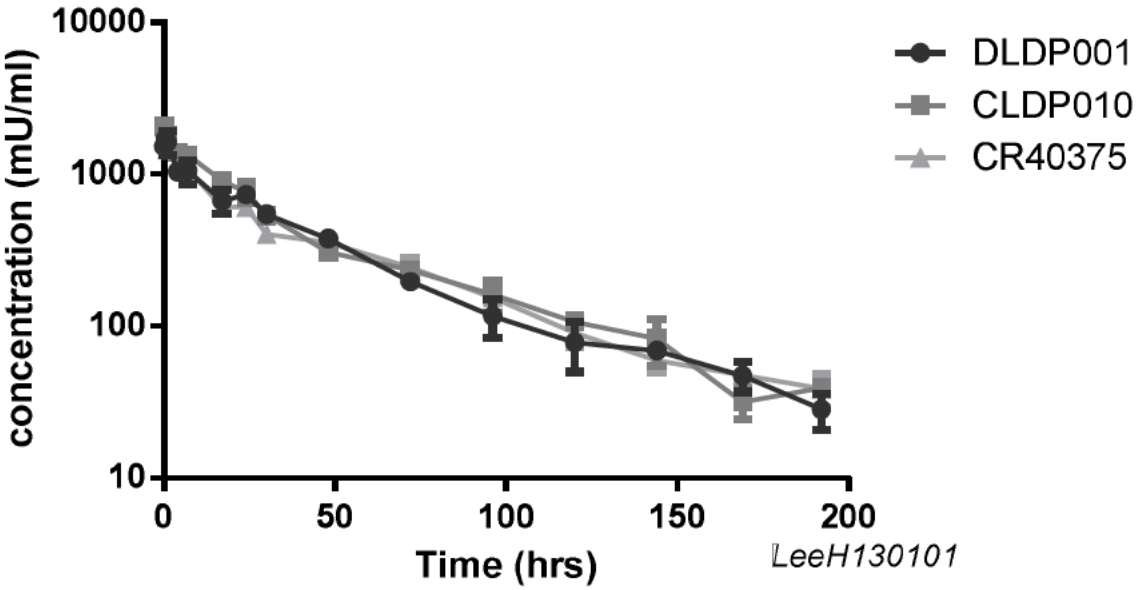


図 2.4-9　　F9-KO マウスにおける 3 種類の第 3 相臨床試験用ロットのノナコグ ベータ ペゴル（1.5 mg/kg）静脈内ボーラス投与後の PK

Study: LEEH130101. Batches: DLDP001 (circle, black), CLDP010 (square, gray) and CR40375 (triangle, light gray, commercial batch). Semilogarithmic plot of the FIX activity values (in mIU/mL) based on the two-stage chromogenic assay . Results are shown as mean ± SD; n = 3 per time point; mice were sampled accordingly to a sparse schedule; with 3 mice per time, 3 samples per mouse.

2.4.3.2.4　重要な非臨床安全性試験と臨床試験結果の PK の動物種間比較

表 2.4-2 に、Rowett ヌードラット及びカニクイザルを用いた重要な毒性試験で得られた反復投与時の曝露パラメータを示し、第 3 相臨床試験における曝露と比較した。比較のため選択したパラメータは C_{max}、$AUC_{(0-t)}$及び $t_{1/2}$ であり、表 2.4-3 に動物からヒトへの曝露量比を示す。

表 2.4-2　　男性ヒト、雄性ラット及びサルにおける反復静脈内投与後の定常状態でのノナコグ ベータ ペゴルの C_{max}、$AUC_{(0-t)}$及び $t_{1/2}$

Species	**Dose (IU/kg)**	**C_{max} (IU/mL)**	**$AUC_{(0-t)}$ (hr x IU/mL)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Human	10	NR	26.48	109
NN7999-3747	40	NR	93.19	112
Rat, Rowett Nude[1]	40	0.588	22.5	30
212513	150	2.61	81.5	39
26 week repeat dose (every fifth day dosing)	600	8.50	261	35
	1200	16.0	508	NR
Rat normalised to 40 IU/kg		**0.60**	**20**	
Monkey, cynomolgus	350[2]	8.83	517	31-60
208260	1300[2]	34.77	1850	20-45
4 week repeat dose (weekly dosing)	3750[2]	78.13	5895	8-64
	350[3]	9.42	483	26-279
	1300[3]	35.17	2221	24-219
	3750[3]	95.59	6985	19-72
Monkey normalised to 40 IU/kg (Day 22)		**0.97**	**60**	

NR: not reported. **Assay:** Human and monkey: one-stage clotting assay, rat: LOCI. **1**: Rat data were converted for this table from ng/mL to IU/mL by using a conversion factor of 152 IU/mg. **2**: Day 22, n=3-7. **3**: Day 29, n=1-4. $AUC_{(0-t)}$: $AUC_{(0-96hr)}$ for rat, and $AUC_{(0-168hr)}$ for monkey and human NN7999-3747. Dosing interval: 0-120 hours for rat (last sample taken at 96 hours) and 0-168 hours for monkey and human.

表 2.4-3　　40 IU/kg（$AUC_{(0-t)}$）又は 100 IU/kg（C_{max}）の動物用量とヒト用量での曝露量比

Species	**Sex**	**Dose (IU/kg)**	**Phase**	**C_{max} Ratio[1]**	**AUC_{0-t} Ratio[2]**
Rat, Rowett Nude 212513, 26 week repeat dose (every fifth day dosing)	M	40	SS	0.46	0.24
	M	150	SS	2.0	0.87
	M	600	SS	6.6	2.8
	M	1200 (NOAEL)	SS	12	5.4
Monkey, cynomolgus 208260, 4 week repeat dose (weekly dosing)	M	350	SS[3]	6.9	5.5
	M	1300 (NOAEL)	SS[3]	27	20
	M	3750	SS[3]	61	63
	M	350	SS[4]	7.4	5.2
	M	1300 (NOAEL)	SS[4]	27	24
	M	3750	SS[4]	75	75

SS: steady state. Values represent ratios between animals and patients. **1**: C_{max} exposure ratios are calculated by dividing C_{max} in animals by C_{max} determined at dose level 100 IU/kg in the clinical phase 1 trial, NN7999-3639, i.e. 1.28 IU/mL. C_{max} was not determined in the phase 3 trial, NN7999-3747. **2**: $AUC_{(0-t)}$ exposure ratios are calculated by dividing $AUC_{(0-t)}$ in animals by $AUC_{(0-t)}$ in the clinical trial NN7999-3747 at 40 IU/kg i.e. 93.19 (hr x IU)/mL. **3**: SS day 22, n=3-7. **4:** SS day 29, n=1-4**.** $AUC_{(0-t)}$: $AUC_{(0-96hr)}$ for rat and $AUC_{(0-168hr)}$ for monkey and human. Dosing interval: 0-120 hours for rat (but last sample taken at 96 hours) and 0-168 hours for monkey and human.

$AUC_{(0-t)}$は、40 IU/kg の推奨予防臨床用量と比較して、ラットの最高用量で 5 倍、サルの最高用量では最大 75 倍高かった。データは、ラットを除き（LOCI 法、IU/mL に変換、1 mg =152 IU）、凝固一段法によるデータに基づく。

図 2.4-10 に、定常状態でのノナコグ ベータ ペゴル反復静脈内投与後の投与量に対する曝露量（$AUC_{(0-t)}$）について、重要な非臨床試験と第 3 相臨床試験とを比較した結果を示す。

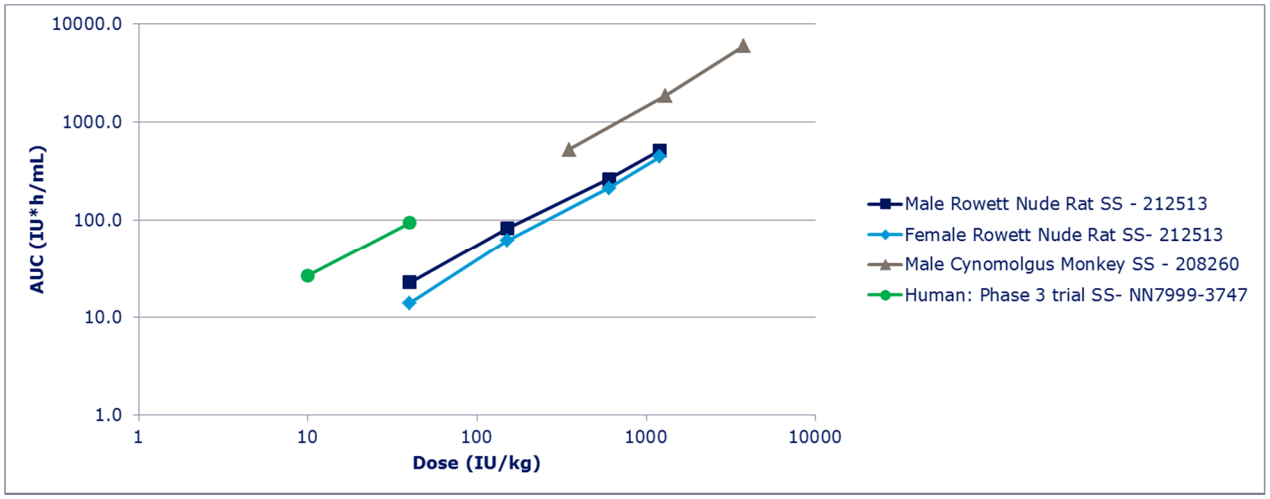


図 2.4-10　　ラット、サル及びヒト血友病 B 患者におけるノナコグ ベータ ペゴルの定常状態（SS）での静脈内投与用量に対する $AUC_{(0-t)}$

Dosing interval (tau): 0-120 hours for rat (but last sample taken at 96 hours) and 0 -168 hours for monkey and human. For human and monkey, AUC_{tau} is shown, except for rat where $AUC_{(0-96h)}$ is shown. Data are one-stage clotting activity data except for rat (LOCI converted to IU/mL). Monkey data are from Day 22.

2.4.3.2.5　　分布、排泄及び代謝試験のための放射能標識トレーサー

3 種類の放射能標識トレーサー、すなわち分子のタンパク質部分（活性化ペプチド）のトリチウム（[^{3}H]）標識体及び PEG 部分の[^{3}H]標識体、ならびに PEG とタンパク質部分間のリンカー（グリシン）の炭素 14（[^{14}C]）標識体を用いた（図 2.4-11）。

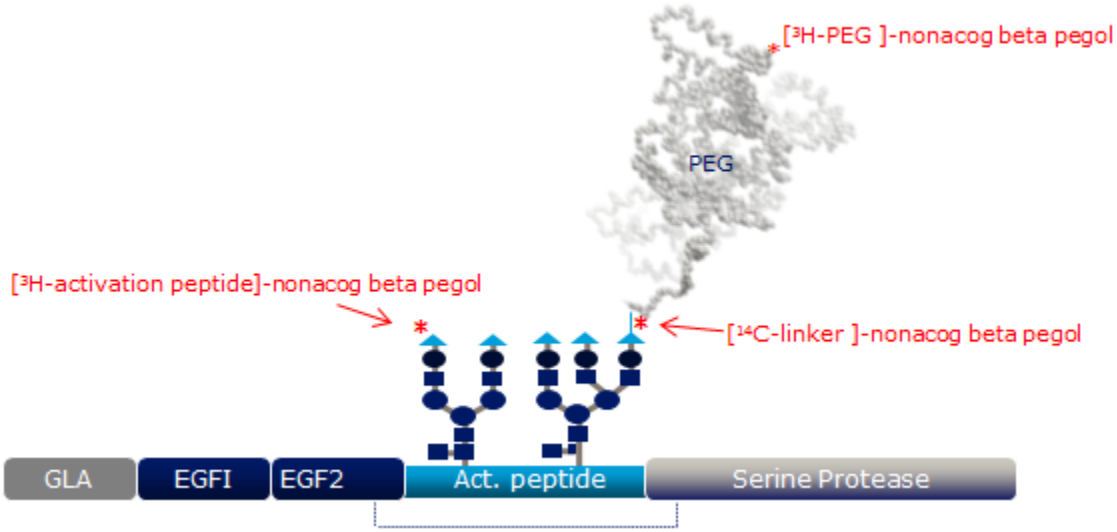


図 2.4-11　　体内分布、排泄及び代謝試験に用いた放射能標識トレーサーの標識位置

PEG 部分の[^{3}H]標識トレーサーの *in vivo* 安定性ならびに *in vivo* 活性を検討し、このトレーサーは安定で、試験目的に適っていることが判明した。[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは、ほぼ完全な *in vitro* rFIX 活性を保持していた。

2.4.3.2.5.1　　総放射能データに基づく推定 PK

全体として、さまざまな放射能標識トレーサーを用いた F9-KO マウス及びラットにおける試験から推定された PK で、[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーは、主にタンパク質の生体内運命に従うことが示され、$t_{1/2}$ は約 60 時間であった。これは、F9-KO マウスにおいてノナコグ ベータ ペゴルを用いて認められた結果と同様であった（表 2.4-1）。[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル又は[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルに基づく総放射能の PK は、血漿への分布、それに続く末梢コンパートメントへの分布及び消失前の血漿への再分布という 2 相性の消失パターンを示した。第 1 相は消失が比較的速やかであり（$t_{1/2}$ が約 2～3 日）、第 2 相はゆるやかであった（$t_{1/2}$ が約 15～18 日）。[^{3}H-PEG]及び[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルでは同様の血漿中プロファイルが認められたことから、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーは PEG の生体内運命／CL に従うことを示している（図 2.4-12）。トレーサーの放射能標識部位がリンカー（^{14}C）であるか PEG（^{3}H）であるかに関わらず、同様の消失パターンが認められたことから、リンカーは PEG 部分に留まることを示している。

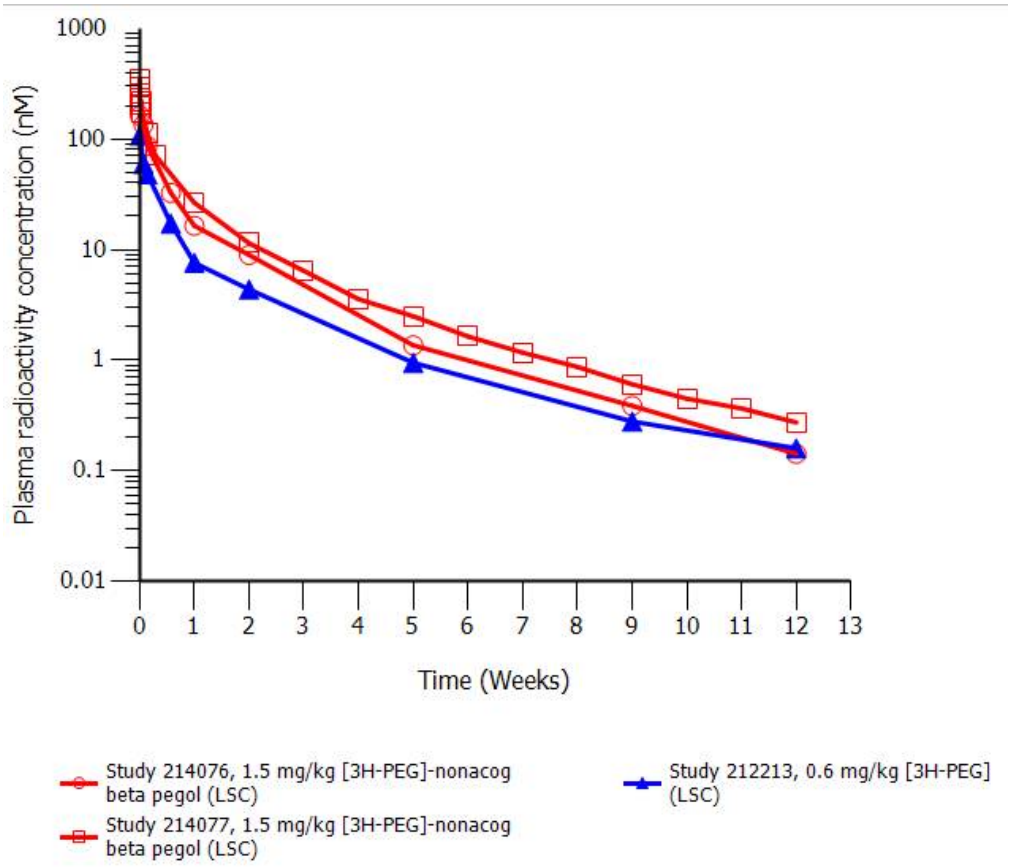


図 2.4-12　　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル（赤）及び[^{3}H-PEG]（青）の血漿中プロファイル
LSC: liquid scintillation counting.

2.4.3.3　　分布

複数のタンパク質（活性化ペプチド）又は PEG 部分を ^{3}H で標識したノナコグベータペゴルの静脈内投与時における F9-KO マウス及びラットを用いる組織分布試験を実施した。タンパク質標識体は投与後 2 週まで、PEG 標識体は投与後 12 週まで追跡した。さらに、^{3}H で標識した 40 kDa PEG（[^{3}H]-PEG）を用いて 40 kDa PEG 単体の組織分布も検討し、同様に投与後 12 週まで追跡した（表 2.4-4）。

表 2.4-4　　ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の組織分布試験の概要

Compound	Duration of study (weeks)	Species	Study ID
[^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol	2	F9 KO mice	210169
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	12	F9 KO mice	212166
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	12	rat	214076
[^{3}H-PEG]	12	rat	212213

すべてのトレーサー及び化合物に関して、放射能は広範に分布し、放射能濃度は血流量の多い組織／臓器で最も高く、CNS（脳及び脊髄）で最も低かった（図 2.4-13）。一般に、放射能濃度は全血中よりも血漿中で高いことから、ノナコグ ベータ ペゴルは細胞部分よりも血液（血漿）の水性相に大きな親和性を有することを示唆している。選択した組織（肝臓、腎臓、脾臓、脳、精巣、心臓、副腎及び骨髄）への顕微鏡レベルでの分布を評価するため、これらの試験ではミクロオートラジオグラフィも実施した。全体として、ミクロオートラジオグラフィ試験によって、定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験の結果が確認され、同一の組織において放射能が検出された。

[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル（マウス及びラット）及び[^{3}H-PEG]（ラット）の双方に関して、PEG 関連放射能は腎臓及び肝臓を介して消失することが明らかになった。ミクロオートラジオグラフィ試験によって、肝細胞及びクッパー細胞への放射能の取り込みが明らかにされ、この結果は、糞中への肝細胞及び／又はクッパー細胞を介した胆汁中排泄という他の研究者による観察結果と一致している[8, 9, 10, 11, 12]。細網内皮系への取り込み及び再分布は、他の研究者によって報告された PEG 化分子の静脈内投与後の結果と類似する。PEG 分子量が大きくなるとリンパ系への再分布が増加するという関係性が報告されている。以上から、ノナコグ ベータ ペゴルの分布は、他の 40 kDa 分子で報告されている分布と類似である[13, 14, 15, 16, 17]。

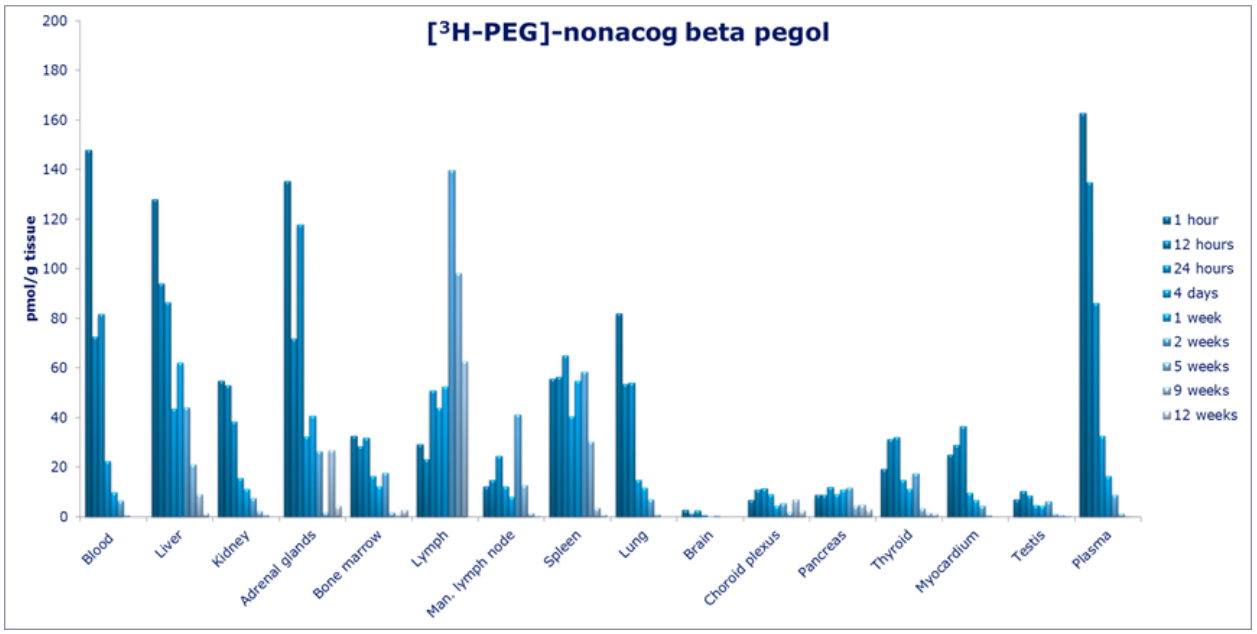


図 2.4-13　　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg（PEG として約 0.6 mg/kg）の単回静脈内ボーラス投与後の選択組織における濃度対時間プロファイル（試験番号 214076）

[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{3}H-PEG]投与後、最終時点（投与後 12 週）で、ほとんどの組織において低濃度の放射能が認められたが、排泄されずに残存する放射能が特定の組織／臓器に限局することはなかった。

2.4.3.4　　代謝

循環血中に存在する放射性成分又は経時的に排泄される放射性成分を評価するため、F9-KO マウス及びラットにおける排泄試験から選択した血漿、尿及び糞試料中の放射性代謝物プロファイルを、HPLC 及びゲル電気泳動によって分析した。ノナコグ ベータ ペゴルに関しては[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを、PEG に関しては[^{3}H-PEG]トレーサーを用いた。

マウス及びラットで得られたデータから、ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質部分が経時的に分解され、40 kDa PEG が体内を循環することが判明し、40 kDa 以下の PEG が尿及び糞中に排泄されることが判明した。血漿中ではトリチウム水は検出されないかごく少量であり、一方、尿及び糞中ではトリチウム水は経時的に増加した。この結果から、トレーサーは、循環血中では安定であり、腎臓及び肝臓、あるいは尿糞中で分解されると解される。

2.4.3.5 排泄

F9-KO マウス及びラットに放射能標識（^{3}H 又は ^{14}C）ノナコグ ベータ ペゴルを単回静脈内投与し、投与後の PEG 関連放射能の排泄を検討した。動物福祉の点（代謝ケージへの収容）から、同一個体の排泄を 12 週間にわたって完全に追跡することはできなかった。そのため、排泄回収率は測定時点間の補間を利用した推定値であり、これにより 3 試験間でみられた結果が変動した可能性がある。PEG 部分は尿（およそ 42～56%）及び糞中（28～50%）に排泄され、また、投与後 12 週間で 5～11%の放射能が残屍中に認められた（表 2.4-5）。

表 2.4-5 投与後 12 週での推定排泄回収率（%）

	[^{3}H]nonacog beta pegol F9-KO (Study ID 212160)	**[^{3}H]nonacog beta pegol Rats** (Study ID 214077)	**[^{14}C]nonacog beta pegol Rats** (Study ID 213466)
Urine + cage wash	42	44	56
Faeces	50	28	49
Carcass	11	5	7
Total	103	77	112

2.4.3.6 薬物動態学的相互作用

ヒト凝固第 IX 因子に特異的な薬物動態学的相互作用が認められておらず、また予測されていないことから、非臨床薬物相互作用試験は実施しなかった。ノナコグ ベータ ペゴルは薬物代謝 CYP450 酵素による代謝を受けず、血漿タンパク質（アルブミン、α1 酸性糖タンパク質など）に結合しないと考えられる。タンパク質／ペプチドに結合した PEG に関連する薬物相互作用の文献報告はないため、PEG に起因する薬物相互作用が起こることは予測されない。

2.4.4 毒性試験

ノナコグ ベータ ペゴルの承認申請のために実施した毒性試験の概略を表 2.4-6 に示す。概して、ノナコグ ベータ ペゴルは、ラットにおける 2000 IU/kg までの単回投与、Rowett ヌードラットにおける 1200 IU/kg/5 日までの 26 週間反復投与及びカニクイザルにおける 1300 IU/kg/週までの 4 週間投与に対し、良好な忍容性を示した。これらの用量は無毒性量（NOAEL）であった。標準的な毒性評価項目に加え、EMA の 40 kDa PEG 化薬物の小児適用の評価法に関する指針 [3] に沿って、反復投与毒性試験では脳脈絡叢上皮細胞の検査を追加した。

表 2.4-6 毒性試験の概略

Discipline	Type of study	Route of administration	Species	Study ID
Species selection	Species cross reactivity of 40 kDa PEG rFIX in plasma (non-GLP)	-	Mouse, F9-KO mouse, rat, rabbit, monkey	HeBa080802
Single dose toxicity	Single dose (GLP)	i.v.	Rat	210259
Repeat dose studies–non-pivotal	6 weeks (non-GLP)	i.v.	Rowett nude rat	212143
	13 weeks (non-GLP)	i.v.	Cynomolgus monkey	208405
Repeat dose toxicity-Pivotal	26 weeks (GLP)	i.v.	Rowett nude rat	212513
	4 weeks (GLP)	i.v.	Cynomolgus monkey	208260
Genotoxicity	Not performed, justification provided in 2.4.4.3			
Carcinogenicity	Not performed, justification provided in 2.4.4.4			
Reproductive and developmental toxicity studies	Not performed, justification provided in 2.4.4.5			
Juvenile toxicity	Not performed, justification provided in 2.4.4.6			
Local tolerance	Local tolerance – rabbit ear (GLP)	i.v.; i.a.; perivenous	Rabbit	210439
	Local tolerance assessed in 26 weeks pivotal repeat dose toxicity study (GLP)	i.v.	Rowett nude rat	212513
	Local tolerance assessed in 4 week pivotal repeat dose toxicity study (GLP)	i.v.	Cynomolgus monkey	208260
Other toxicity	Comparative immunogenicity	i.v.	Rat	209353
	2- and 6 week repeat dose toxicity study of 40 kDa PEG (GLP)	i.v.	Rat	209294
	2-, 6- and 13 week repeat dose toxicity study of 40 kDa PEG (GLP)	i.v.	Cynomolgus monkey	209215

2.4.4.1 単回投与毒性

第 1 相臨床試験から第 3 相臨床試験における製法変更を支持するため、さらに rFIXa の規格限度値に関する安全性評価を行うため、ラットにおける単回投与毒性試験を実施した。各製造ロットの 200、1000 及び 2000 IU/kg をラットに単回静脈内投与した。第 1 相臨床試験の使用ロット（rFIXa 含量 0.03%）及び第 3 相臨床試験の使用ロット（rFIXa 含量 0.12%）の最高用量 2000 IU/kg までの投与において有害所見はみられなかった。第 1 相臨床試験及び第 3 相臨床試験の使用ロットに関し最高用量 2000 IU/kg の投与で有害所見がみられなかったことから、本試験における NOAEL は 2000 IU/kg であると推定した。

2.4.4.2 反復投与毒性

2.4.4.2.1 重要でない反復投与毒性試験（GLP 非適用）ー重要な毒性試験（GLP 適用）における投与期間の最適性及び反復投与毒性の検討における Rowett ヌードラット使用可能性の評価

FIX は大きな分子サイズであること、ヒト FIX は非臨床試験の動物種においては外来異物であることから、非臨床試験に用いる正常な動物種では中和抗体が形成することが予期される。したがって、中和抗体の形成は毒性をマスクする可能性があること、また、内因性 FIX と交叉反応する抗薬物抗体形成に関連して本質から外れた毒性を引き起こす可能性があることから、非臨床試験の動物種における中和抗体の形成時期は、反復投与毒性試験の試験期間を設定するのに重要である。

カニクイザルでは、中和抗体の形成時期と、それに関連して反復投与毒性試験の最適な投与期間及び長期間反復投与の可能性について評価することを目的として、GLP 非適用下で 13 週間反復投与免疫原性試験を実施した。8 頭のカニクイザルに 200 IU/kg/週を 13 週間静脈内投与した後、5 週間休薬した。5 回以上の反復投与で抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体が形成され、曝露に対する強い影響がみられた。抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体は 5 回投与後 6/8 頭に認められ、このうち 4 頭に後天性血友病様変化が認められた。残り 2 頭に抗薬物抗体形成はみられず、13 週間にわたり曝露された。病理組織学的検査で投与に関連する所見は認められなかった。特に、これまで 40 kDa PEG 結合タンパク質の蓄積標的組織とされている脈絡叢 [3] で空胞形成は認められなかった。さらに、免疫組織化学的（IHC）染色でも脈絡叢上皮細胞で PEG は検出されなかった。この試験から、重要な毒性試験の最適な投与期間は 4 週間であることが裏付けられ、また、正常サルにおける低用量でのノナコグ ベータ ペゴルの慢性毒性試験を実施する意義はないものと結論した。

Rowett ヌードラットは、開発後期に、ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分に関係する慢性毒性をさらに評価するために導入した。この補足的アプローチは、PEG 化タンパク質の長期間投与安全性に関連する潜在的懸念 [3] を検討するために実行した。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており、T 細胞依存性の抗体反応を起こさない。したがって、Rowett ヌードラットでは中和性抗薬物抗体を形成することなく長期投与が可能であると考えられた。Rowett ヌードラットへのノナコグ ベータ ペゴルの 40 又

は 1200 IU/kg を週 2 回の静脈内投与による 6 週間投与 PK／免疫原性予備試験により、慢性毒性評価のための動物モデルとして使用可能であることが確認された。病理組織学的検査では投与に関連する組織の空胞形成は認められなかった。6 週間曝露したが、抗薬物抗体は形成しなかった。脈絡叢を含む脳組織に対し PEG の存在を検出するため IHC 染色を施した。1200 IU/kg では、大半の雌雄の脈絡叢上皮細胞の細胞質内に PEG が検出された。PEG の存在は病理学的変化に関係しなかった。少数の雌では脈絡叢の結合組織において弱い PEG 染色性がみられた。他の脳構造には陽性を示す PEG 染色性は認められず、40 IU/kg では PEG は検出されなかった。

2.4.4.2.2　重要な反復投与毒性

雌雄 Rowett ヌードラットへノナコグ ベータ ペゴルの 40～1200 IU/kg を 5 日に 1 回の静脈内投与による 26 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）を実施した。本試験では対照群及び高用量（1200 IU/kg）群のみに 26 週間の回復期間を設けた。ノナコグ ベータ ペゴルは 5 日に 1 回 40～1200 IU/kg 投与の用量範囲で良好な忍容性を示し、投与に関連する所見はみられなかった。本試験では 14 匹の死亡がみられ、その内訳は、対照群 6 匹、低用量（40 IU/kg）群 2 匹、中間の高用量（600 IU/kg）群 3 匹及び高用量（1200 IU/kg）群 3 匹であった。死亡動物の病理組織学的所見から、免疫不全動物モデルにおける特異的な感染プロセスが原因であり、用量相関性も認められなかったことから、死亡はノナコグ ベータ ペゴル投与に関連するものではないと考えられた。抗薬物抗体の形成はなく、動物は投与期間中試験物質に曝露された。病理組織学的検査で投与に関連する所見は認められなかった。ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分が脳及び脈絡叢で検出されるかどうかを検討するため、左右側脳室の組織標本を作製し、IHC 染色を施して定性的に PEG を検出した。40～1200 IU/kg の全用量で 26 週間投与後、脈絡叢の結合組織及び上皮細胞の細胞質内に IHC 染色で PEG が確認された。回復期間を設けた唯一の投与群であり、26 週間投与後の回復群である 1200 IU/kg でも、IHC により脈絡叢上皮細胞に PEG の存在が確認された。この場合でも、PEG の存在が病理学的変化に何ら関連は認められなかった。対照動物及び高用量投与動物の脈絡叢に対する透過型電子顕微鏡による観察から、高用量投与動物の脈絡叢上皮細胞の小胞（リソソーム）に PEG が存在することが示された。粗面小胞体及びポリソームを含む細胞の微細構造全体に影響は認められなかったことから、リソソームに蓄積された PEG が細胞機能に影響を及ぼすことはないと考えられた。特に、標準的な顕微鏡的検査ではいずれの用量群においても細胞内空胞形成の形跡は認められなかったことから、PEG の存在は有害性変化ではないと考えられた。以上より、投与に関連する有害所見はみられなかったことから、NOAEL は 5 日に 1 回投与による 1200 IU/kg であると考えられた。

重要な試験であるカニクイザル 4 週間反復投与毒性試験では、ノナコグ ベータ ペゴルの 350、1300 及び 3750 IU/kg を週 1 回静脈内投与した。血友病 B は圧倒的に男性に多い疾患であることから、カニクイザルの反復投与毒性試験では雄のみを用いた。動物数は各群で 8 頭とした。投与に関連する唯一

の所見として、高用量（3750 IU/kg）群における軽度かつ一過性の全身の震えが一般状態観察及び神経学的評価中にみられ、さらに、投与期間中、rFIX に対する中和抗体が形成し、rFIX との交叉反応を起こしたことによる後天性血友病様変化が期間中にみられた。全身の震えは高用量（3750 IU/kg/週）群で 1 回又は 2 回みられたのみであり、4 回目の投与以降は認められなかった。後天性血友病様変化は中用量群（1300 IU/kg）群の 1/8 頭及び高用量（3750 IU/kg）群の 6/8 頭にみられた。後天性血友病様変化を示した個体では aPTT の延長がみられ、一般状態の変化、肉眼的又は顕微鏡的な変化の兆候、ならびに、頭部／脚の損傷又は腫脹、脚の肥厚・赤色化／皮膚・頭部の皮下、筋肉／皮膚／皮下／脳の出血のうち、それらの 1 つ又は複数の変化が認められた。その他に、病理組織学的に投与に関連する所見はなく、空胞形成を認める組織はみられなかった。PEG の存在を検出するため脳組織に IHC 染色を施した。脈絡叢の結合組織及び上皮細胞の細胞質内に PEG が検出された。加えて、3 用量すべてで脳血管内の血液中に PEG が見出された。その他の脳構造では陽性を示す PEG 染色性は認められなかった。いずれの用量群においても細胞内に空胞形成は認められなかった。この他に投与に関連する有害所見は認められなかったこと、また、ノナコグ ベータ ペゴルの高用量では全身の震えがみられたことに基づき、NOAEL は週 1 回投与による 1300 IU/kg であると考えられた。

Rowett ヌードラット及びカニクイザルともに投与量に関連する PT の延長がみられた。休薬期間中に採取した試料では完全にベースライン値に回復していた。PT の延長は血漿中の高 FIX 濃度に起因する測定法上のアーチファクトであり、FX による TF/FVIIa 複合体の活性化に関して rFIX は基質として競合的に作用するという仮説が考えられる。本仮説について、正常ヒト血漿に BeneFIX®又はノナコグ ベータ ペゴルを添加して PT を測定する *in vitro* 試験を実施した。その結果、BeneFIX®又はノナコグ ベータ ペゴルはともに、正常ヒト血漿又は FIX 欠乏血漿に添加すると、濃度依存的に PT を延長させることが示された（図 2.4-14）。

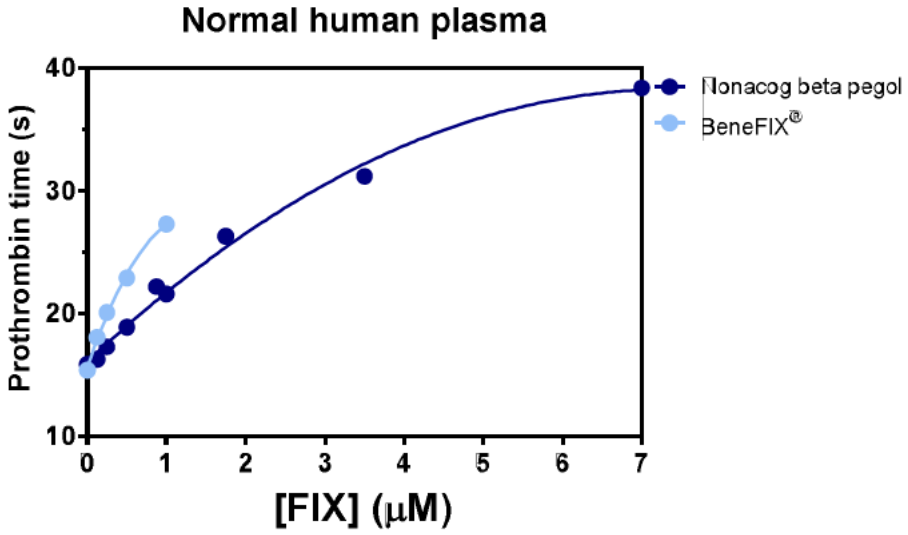


図 2.4-14　　PT 時間の濃度依存的増加

Normal human plasma was spiked with increasing concentrations of either BeneFIX® or nonacog beta pegol

カニクイザル及び Rowett ヌードラットで認められた投与に関連する PT の延長は、これらの毒性試験で到達した非常に高い血漿中 FIX 濃度に起因したものであると結論された。したがって、この所見は高濃度 FIX による測定法上の干渉が関係したものと考えられ、投与計画における臨床的関連性を有さないと考えられた。臨床試験において少数の症例で PT 延長がみられたが、一定の傾向は認められなかった。

2.4.4.3　　遺伝毒性

rFIX、40 kDa PEG 又はリンカーには懸念は認められないことから、ICH S6(R1)に照らし、ノナコグ ベータ ペゴルの遺伝毒性試験は実施しなかった。

ノナコグ ベータ ペゴルの遺伝子組換え FIX 部分は巨大タンパク質であり、DNA 又は他の染色体物質と直接的に相互作用することは考え難い[18]。血友病 B 患者に対し 1997 年から使用されている BeneFIX®では、変異原性又は細胞増殖能を示唆する作用機序データはみられていない。BeneFIX®では、Ames 試験による変異原性誘発能、及びヒト末梢血リンパ球を用いた染色体試験による rFIX の染色体異常誘発能が評価された。血液凝固第 IX 因子の正常循環血中濃度よりも 63～100 倍高い濃度でも変異原性又は染色体異常を示す兆候は認められなかった[19, 20, 21]。

種々の市販製品において、5～40 kDa PEG の変異原性又は染色体異常誘発能が評価されている。これらの市販製品又は PEG に変異原性又は染色体異常有誘発性の兆候は認められなかった [17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]。

ノナコグ ベータ ペゴルではシアル酸にリンカーであるグリシンを介して分岐した 40 kDa PEG が附加されている。グリシン及びシアル酸は天然の内因性構造であることから、変異原性を有することは考えられない [18]。リンカー（グリシン）、シアル酸及び PEG 成分に関し、同一のリンカー及び PEG 成分を有する eptacog alfa pegol（活性型）が Ames 試験で検討されており、陰性の結果であった[34]。リンカーであるグリシンについて Derek 解析を行ったが、危険性は警告されなかった[35]。

2.4.4.4 がん原性

2.4.4.4.1 血液凝固第 IX 因子

1997 年から血友病 B 患者に使用されている BeneFIX®に関し、その変異原性及び細胞増殖能を示唆する作用機序データはみられない。rFIX が内因性 FIX と異なる生物学的特性を持つことを示唆する *in vitro* 又は *in vivo* の証拠は認められていない。さらに、ノナコグ ベータ ペゴルは慢性的欠乏患者の補充療法での適用を目的としており、予防に適用される 40 IU/kg の週 1 回投与時の血漿中活性レベルは生理的な正常範囲内（50～150%）か、それよりもわずかに低くなる。

2.4.4.4.2 ポリエチレングリコール（PEG）

多数の PEG 化製剤の製造が承認されているが、承認された製品の大半で *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験が実施されており、すべて陰性の結果であった [17, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33]。Omontys®（40 kDa PEG 赤血球生成促進剤）について実施したがん原性試験では、がん原性陰性の結果であった [17, 33]。Somavert®（5 kDa PEG ヒト成長ホルモンアナログ、pegvisomant）では、2 年間の連日皮下投与後、注射部位に腫瘍が認められたが、局所刺激性により生じたものと考えられた [25]。これらの試験結果から、5～40 kDa PEG は変異原性又はがん原性リスクを有さないことを示している。

2.4.4.4.3 ノナコグ ベータ ペゴルの反復投与毒性試験

適切な動物モデルにおける標準的な反復投与毒性試験は、増加するがん原性リスクの兆候を見出す上で有用である[36, 37]。器官重量の増加、組織過形成、細胞増殖、免疫抑制又は内分泌／ホルモン変化の観察から、がん原性の懸念の増加が示唆される場合がある。Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性ではそのような懸念要因は認められなかった。器官重量に影響はみられなかった。対照群との比較による群間差は、すべて軽微又は用量相関性のない正常な個体間変動の範囲内であった。病理組織学的検査では、血管新生、組織増殖又は細胞過形成のような変化はみられなかった。Rowett ヌー

ドラットは免疫抑制を示すモデル動物であり、腫瘍を形成しやすい性質を持つと考えられたが、本試験においてノナコグ ベータ ペゴルによる腫瘍発生頻度の増加は認められなかった。

2.4.4.4.4　文献検索

PEG 及び FIX について、以下の検索条件〔cancer（がん）、tumor（腫瘍）、oncology（腫瘍学）、neoplasm（新生物）、metastasis（転移）、angiogenesis（血管形成）、leukemia（白血病）、lymphoma（リンパ腫）、sarcoma（肉腫）、adenoma（腺腫）、mitogenicity（有糸分裂促進性）、neovascularization（血管新生）〕で、2012 及び 2014 年の文献検索を行った。文献検索は、Embase、Medline、Biosis、Current Contents のデータベースに基づいて行った。文献検索の基準／履歴は参考文献[38, 39]に示されている。FIX 又は PEG のいずれにもがん原性リスクの増加に関連する懸念要因は認められなかった。

PEG 化製剤に関連する検索における大半の文献では、検索条件〔cancer（がん）〕に関係するものは製剤のタンパク質成分の作用機序又は化合物の適用に関するものであった。タンパク質に附加された PEG 成分に関連する懸念要因は認められなかった。

FIX に関連する文献検索では、血友病 B 患者に対する血漿又は遺伝子組換え FIX による補充療法における懸念要因は示されなかった。検索条件〔cancer（がん）及び FIX〕での文献検索では、FIX 遺伝子治療に関するもの、血友病の原因となる遺伝子変異に関するもの、血漿又は遺伝子組換え FIX 製剤で治療を受けた血友病 B 患者における腫瘍／偽腫瘍の外科的切除に関する 1 例の症例報告に関するものであった。FIX の補充療法に関し、がん原性リスクの増加に関連する懸念要因は認められなかった。

2.4.4.5　授受胎能、生殖発生毒性

ノナコグ ベータ ペゴルについて授受胎能又は生殖能に関する毒性試験は実施しなかった。これは、血友病を保有しないヒトにおける一般的な FIX レベルは 55～163%であること[40]、及びノナコグ ベータ ペゴルを男性血友病 B 患者（13～65 歳）に週 1 回 40 IU/kg 投与した臨床試験（3747 試験）において、投与 30 分後に到達した幾何平均による FIX レベルは正常範囲内であったことから、rFIX が生理的濃度の 150%を超える可能性は低いという科学的根拠に基づく。適用患者集団は主として男性に発症する血友病 B 患者である。Benefix®は 1997 年から市販されているが、授受精能に対する影響又は胎児における有害所見を示す文献報告はみられていない。ノナコグ ベータ ペゴルの組織分布試験では精巣における PEG の分布が認められた。しかしながら、性成熟に達した雌雄 Rowett ヌードラットにおける反復投与毒性試験の生殖器官の病理組織学的評価では、投与に関連する形態学的変化は認められず、授受胎能を懸念させる要因は示唆されなかった。

2.4.4.6　幼若動物を用いた試験

ノナコグ ベータ ペゴルでは幼若動物における毒性試験は実施していないが、このことに関し規制当局からはノナコグ ベータ ペゴルの小児における臨床試験の開始に際して受入れ可能であるとされた。ノナコグ ベータ ペゴルの作用機序は rFIX と類似しており、成人及び小児患者で差異がないと考えられることから、幼若動物の効力に関する非臨床試験は実施していない。PK は臨床試験プログラムの一部として小児患者で検討されており、幼若動物における非臨床 PK 試験から新たに有用な情報が得られることはないと考えられた。ノナコグ ベータ ペゴルはカニクイザルでは 1300 IU/kg/週まで、Rowett ヌードラットでは 1200 IU/kg/5 日まで忍容性が認められ、これらの用量でノナコグ ベータ ペゴルに特異的な標的器官は認められなかった。その他、PEG に関連する腎に対する毒性変化として、ラットにおける限局性の腎尿細管上皮変性[41]ならびに尿細管断面のゆがみ及び細胞核圧迫に至る腎尿細管の空胞形成[42]が報告されている。しかしながら、ノナコグ ベータ ペゴルではこのような腎毒性所見は認められていない。一方、40 kDa PEG 化製剤及び 40 kDa PEG で報告されている脈絡叢の空胞形成[3, 43]はノナコグ ベータ ペゴルでは認められていない。以上を結論すると、標準的な毒性試験プログラムにおいて、ノナコグ ベータ ペゴルの幼若動物における毒性試験の実施を必要とする、標的器官又は懸念要因は認められなかった。

2.4.4.7　局所刺激性

局所刺激性は Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験の一部として、また、適用経路である静脈内に対し、非適用経路である静脈周囲及び動脈内投与での局所刺激性を、ウサギにおける局所刺激性試験で評価した。Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験では、対照群を含むすべての試験群で投与操作による軽微な注射部位の反応が認められた。ウサギでは、一般状態の観察で局所反応（出血／損傷、腫脹）及びそれに関連する顕微鏡的変化が認められた。これらの反応は静脈内投与及び静脈周囲投与よりも動脈内投与で強く発現し、また、ノナコグ ベータ ペゴル投与後では溶媒投与後よりもわずかに強く発現した。これらの局所刺激性は臨床使用において受入れ可能であると考えられた。臨床試験では、弱い注射部位反応が認められている（Module 2.7.4 臨床試験の要約、Module 2.1.5.5 投与部位での反応を参照のこと）。

2.4.4.8　その他の毒性試験

2.4.4.8.1　比較免疫原性

FDA の助言に従い、Wistar ラットを用い、市販の rFIX 製剤（BeneFIX®）に対するノナコグ ベータ ペゴルの相対的な免疫原性を評価するため、同様の曝露量で免疫原性比較試験を実施した。ラットにノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を 2 週間投与し、さらに 1 週間休薬後に抗体検査用試料を採取した。このサイクルを 4 回繰り返し、合計で最低 8 週間の曝露を行った。ノナコグ ベータ ペゴルの 25

IU/kg/週又は BeneFIX®の 25 IU/kg/日投与後の抗薬物抗体形成動物数又は抗体力価に差異はなかった。ノナコグ ベータ ペゴルの 200 IU/kg/週又は BeneFIX®の 200 IU/kg/日で抗体は検出されなかった。ラットにおけるノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の抗体形成誘発性に差異はみられなかった。この試験結果は臨床試験の結果と一致している（Module 5.3.5.3 Integrated Summary of Immunogenicity を参照のこと）。

2.4.4.8.2　40 kDa PEG の毒性試験

開発段階の早期、すなわち、Rowett ヌードラットを導入してノナコグ ベータ ペゴルの慢性毒性を評価する前の段階で、ラット及びサルにおける 40 kDa PEG 単体の毒性試験を実施することとした。入手可能な公開情報から、PEG 化製剤に関して、マクロファージ、腎尿細管上皮及び脳上皮細胞を含む種々の組織における空胞形成が記述されている [26, 27, 28, 29, 31, 32, 41, 42, 43, 44]。空胞形成はターンオーバーの低い細胞における PEG 蓄積に対する適応反応であると説明されている。

ラットでは 40 kDa PEG を 45 及び 117 mg/kg/週の用量で 2 又は 6 週間投与した。カニクイザルでは、40 kDa PEG を 45 mg/kg/週の用量で 2 及び 6 週間、又は 7 mg/kg/週の用量で 13 週間投与した。これらの結果から、PEG を高用量投与すると、他の 40 kDa PEG 化製剤で報告されている所見、すなわちマクロファージにおける空胞形成（ラットに 45 及び 117 mg/kg/週を 6 週間投与）及び脈絡叢上皮細胞の空胞形成（サルに 45 mg/kg/週を 6 週間投与）が認められた。マクロファージ又は脈絡叢に PEG がみられても、変性、炎症又は壊死の兆候は認められなかった。ノナコグ ベータ ペゴルの臨床推奨用量 40 IU/kg/週で投与される PEG 量は 0.23 mg/kg/週となるが、この量は前述の試験で使用した PEG 投与量の 30～500 分の 1 以下である。

2.4.4.8.3　PEG 及び脈絡叢

EMA[3]、The Society of Toxicological Pathology[45]及び BioSafe[43]は、PEG 化製剤が非臨床試験動物モデルの脈絡叢上皮細胞又は細網内皮系（RES）に空胞形成を示した場合、PEG 化製剤の安全性評価に関する勧告を公表している。特に懸念すべき事項は、広範囲な空胞形成が細胞機能及び脳脊髄液（CSF）の産生に影響を及ぼす可能性の有無である。脳脈絡叢上皮細胞は CSF の主要な分泌源であり、血液－CSF 関門を形成している[46]。現在のところ、脈絡叢の機能を評価する臨床バイオマーカーはない。

生体内分布試験において、ノナコグ ベータ ペゴルは血管に富む器官に分布すること、PEG は予期した通り脈絡叢を含む RES に分布することが示されている（図 2.4-13）。

予定臨床用量を超える用量が投与されたカニクイザル及び Rowett ヌードラットの試験における顕微鏡的観察では、脈絡叢上皮細胞に空胞形成は認められなかった。動物試験では、脈絡叢上皮細胞にノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分の分布が認められた。しかしながら、このことは空胞形成又は病理組

織学的な細胞機能障害と関連していなかった。Rowett ヌードラットの 26 週間試験における高用量群の脈絡叢に対する透過型電子顕微鏡観察では、小胞（リソソーム）に PEG の存在が認められたが、正常な上皮細胞の機能に対する影響は認められなかった。

PEG は製剤処方、化粧品及び食品添加物として、また、主として薬物の $t_{1/2}$ を延長させるために広く使用されている。最近 10 年間では、低分子 PEG（<1 kDa）からより高分子 PEG（≥ 30 kDa）を使用する方向にシフトしている。脈絡叢の空胞形成は主として 40 kDa 以上の PEG で報告されている [3, 41, 43]。

Ivens ら（2013）[47]は、Micera®、PEGASYS®及び Cimzia®の非臨床試験及び臨床試験では週 1 回投与による 30～40 kDa PEG と RES 及び脈絡叢における空胞形成との間には相関が認められると述べている。Ivens らの公表論文中の図に本申請の提出資料に含まれるノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG の試験データを追加し、図 2.4-15 として示した。

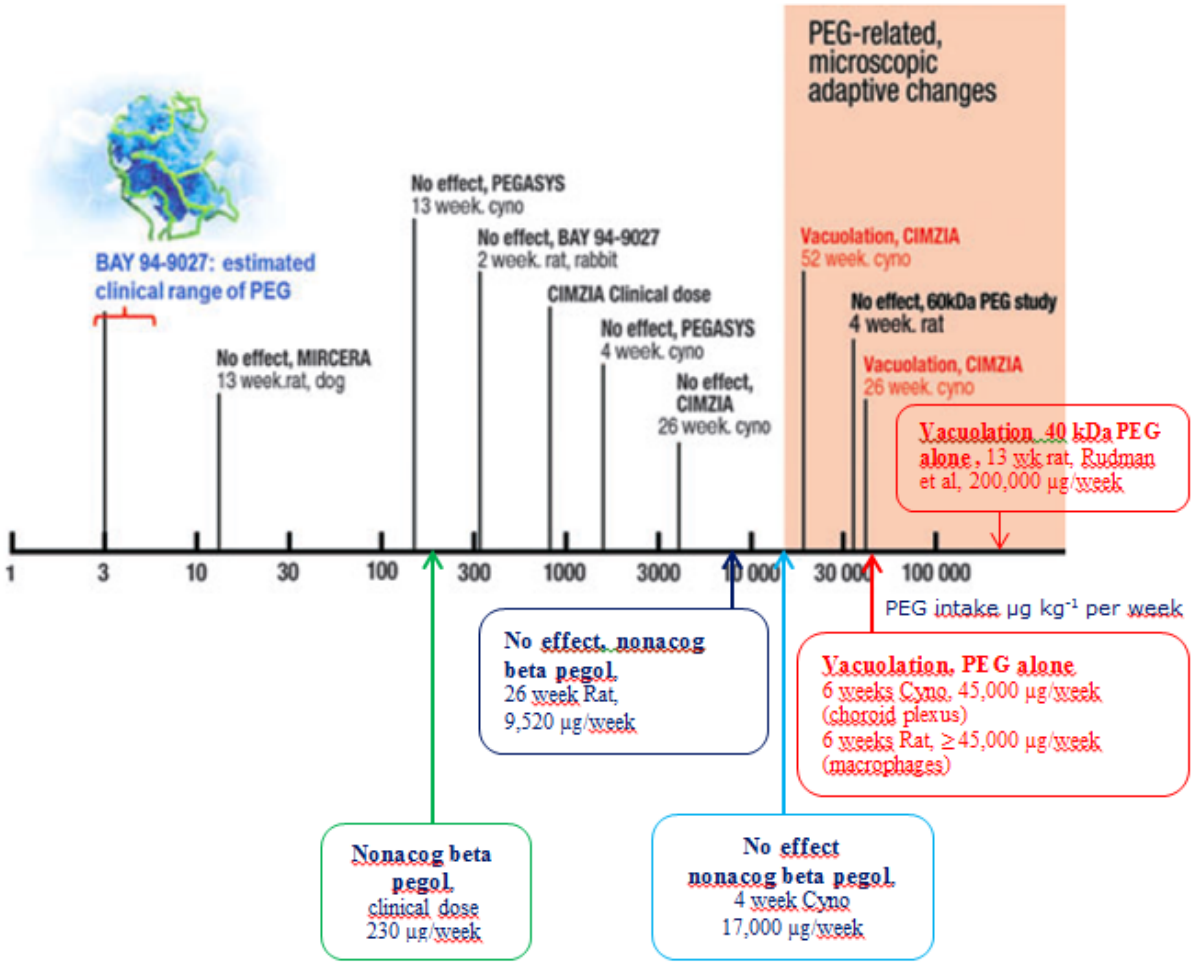


図 2.4-15　　非臨床試験における PEG 用量（µg/週）と空胞形成の関連性

Modified from Figure 3 in Ivens et al (2013, [47]) including nonacog beta pegol (study 208260, 4 week monkey, and study 212513, 26 week rat, for conversion to PEG doses 40 IU equals 0.23 mg or 230 µg PEG), 40 KDa PEG (study 209215, 6 week monkey, study 209294, 6 week rat, and 13 week rat data from Rudman et al.[41], 1 mg equals 1000 µg).

ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の非臨床試験における週 1 回の PEG 投与で認められた所見には、Ivens ら [47] が報告しているデータとよく相関していることが認められる。また、これまで、ノナコグ ベータ ペゴル投与時の PEG 相当量では、PEG に関連する顕微鏡的変化は認められていない。ノナコグ ベータ ペゴルの臨床推奨用量（40 IU/kg/週、PEG 量として 230 µg/週に相当）は、2009 年から慢性リウマチ性関節炎の治療剤として欧州連合及び米国で承認、市販されている Cimzia®の週 1 回臨床投与による PEG 量の 1/3 以下である。

PEG 単体又はタンパク質に結合した PEG に関する報告の大半では、脈絡叢、マクロファージ及び腎に空胞が認められたケースを含め、PEG の存在と関連する変性、炎症又は壊死が認められないことから、ターンオーバーの低い細胞における PEG 蓄積に対する適応反応であると記述されている [43, 48]。

2.4.4.9 添加物

ノナコグ ベータ ペゴル製剤で使用されている添加物はすべて、医薬品での使用前例があり、静脈内投与による臨床使用での適格性は確保されていると考えられる（表 2.4-7）。

表 2.4-7 ノナコグ ベータ ペゴル製剤の組成

Strength	**500 IU**	**1000 IU**	**2000 IU**	**500 IU**	**1000 IU**	**2000 IU**	**Reference to standards**	**Function**
Component	**Quantity per mL before lyophilisation**			**Quantity per mL after reconstitution**				
Active substance								
Nonacog beta pegol drug substance	125 IU (0.82 mg)	250 IU (1.64 mg)	500 IU (3.29 mg)	125 IU (0.82 mg)	250 IU (1.64 mg)	500 IU (3.29 mg)	Novo Nordisk A/S	Active substance
Excipient								
Sodium Chloride	2.34 mg			2.34 mg			Ph. Eur., USP, JP	Tonicity agent
Histidine	1.55 mg			3.10 mg[1]			Ph. Eur., USP, JP	Buffer
Sucrose	10 mg			10 mg			Ph. Eur., USP, JP	Stabiliser
Mannitol	25 mg			25 mg			Ph. Eur., USP, JP	Bulking agent
Polysorbate 80	0.05 mg			0.05 mg			Ph. Eur., USP, JP	Surfactant
Water for Injection	To final volume			To final volume			Ph. Eur., USP, JP	Solvent
Sodium hydroxide	q.s. [2]			q.s.[3]			Novo Nordisk A/S	pH adjustment
Hydrochloric acid	q.s.[2]			q.s.[3]			Novo Nordisk A/S	pH adjustment

q.s. quantum satis (sufficient amount)

[1] The amount of Histidine originates from the formulation (1.55 mg) and from the solvent Histidine Solution used for reconstitution (1.55 mg)

[2] pH is 6.8 prior to lyophilisation

[3]pH is 6.4 when reconstituted in Histidine Solution

2.4.4.10 設定規格の非臨床的妥当性

ノナコグ ベータ ペゴルの製造工程由来不純物及び目的物質由来不純物については、原薬及び製剤の申請有効期間内規格〔End of Shelf Life（EOSL）規格〕の妥当性を確認するための非臨床的観点からの結果を踏まえると適切に評価されていると考えられる。概して、非臨床試験で使用したロット中の不純物含量は EOSL 規格を下回っているが、より高用量が投与された非臨床安全性試験から EOSL 規格

値の正当性が確認されている。したがって、毒性を起こさない用量（1200～2000 IU/kg）は、40～80 IU/kg の臨床用量に対して 15～50 倍高い。表 2.4-8 に原薬及び製剤の EOSL 規格案、及び非臨床試験での NOAEL と 40 又は 80 IU/kg の臨床用量投与による不純物の計算値の比を示す。非臨床試験で使用した各ロットの不純物含量は毒性試験概要表の Module 2.6.7.4.B を、原薬及び製剤の規格は Module 3.2.S.4.1 Specification for Drug Substance 及び Module 3.2.P.5.1 Specifications for Drug Product を、臨床試験及び非臨床試験のロット比較は Module 3.2.P.5.4 Batch Analysis に示した。

高分子量タンパク質（HMWP）、ノナコグ ベータ ペゴル／rFIX フラグメント、宿主細胞タンパク質（HCP）、 *不純物7 、*不純物10 、 *不純物11 に関して、主に免疫原性に関する安全性が懸念される。非臨床試験は臨床上の免疫原性を予測しうるものではないと考えられる[49]。したがって、主に臨床データによって規格の妥当性が判断される（Module 3.2.S.4.5 Justification of Specification for drug Substance 及び Module 3.2.P.5.6 Justification of Specification を参照のこと）。

製法変更及び製剤中の rFIXa の規格値を第 1 相臨床試験から第 3 相臨床試験において緩和させることを支持するために単回投与毒性試験を実施した。0.12%の rFIXa（第 3 相臨床試験）を含むロットを用いて最高 2000 IU/kg をラットに投与した。この用量では、良好な忍容性が認められ、血栓形成（rFIXa で予測される有害作用）を含め、有害所見は認められなかった。臨床用量は 1/30～1/15 以下であることから、本試験によりノナコグ ベータ ペゴル製剤の EOSL 規格値として [redacted]%は妥当と考えられる。

表 2.4-8　原薬（DS）及び製剤（DP）の EOSL 規格値、予防治療での推奨用量（40 IU/kg）及び重篤な出血治療での用量（80 IU/kg）における不純物含量を EOSL 規格値とした場合の非臨床試験ロットでの最高不純物含量に対する比

	DS EOSL	DP EOSL	Highest content in a non-clinical batch	Ratio to clinical dose of 40 IU/kg (and 80 IU/kg)[4]
HMWP (%)	-	[redacted]	[redacted][1]	[redacted]
Total impurities (%)	-		[redacted][2]	
*不純物6 (%)	-		[redacted][3]	
*不純物3 (%)	-		[redacted][2]	
*不純物2-1 (%)	-		[redacted][1]	
*不純物2-2-1 (%)	-		[redacted][1]	
*不純物2-2-2 (%)	[redacted]	-	[redacted][2]	[redacted]
HCP ppm	[redacted]	-	[redacted][1]	[redacted]
*不純物7 (ppm)		-	[redacted][1]	
*不純物10 (ppm)		-	[redacted][2]	
*不純物11 (ppm)		-	[redacted][1]	

[1]Batch [redacted], used in 4 week repeat dose toxicity study in monkey 208260, NOAEL 1300 IU/kg,
[2]Batch [redacted], used in 26 week repeat dose toxicity in Rowett nude rats 212513, NOAEL 1200 IU/kg,
[3]Batch [redacted], used in single dose rat study 210259, NOAEL 2000 IU/kg
[4]Ratio from impurity dose at nonclinical NOAEL to corresponding clinical impurity dose at EOSL, calculation: [(highest content in a non-clinical batch divided by EOSL DS or DP) x NOAEL] divided by 40 or 80 IU/kg

ノナコグ ベータ ペゴルの製造工程で使用されている 2 種の試薬 [redacted] 及び [redacted] は、残留不純物となる可能性がある。[redacted] 及び [redacted] ならびにそれらの潜在的分解生成物について、DEREK により *in silico* 遺伝毒性解析を行った。DEREK 解析により、これらの構造内の[redacted]成分に起因する染色体損傷能が示唆された[50]。 *不純物14 及び *不純物13-1 ならびにその他の原薬関連不純物を検出するための分析方法を開発した。最低定量限界（LLoQ）1.0 µg/mL における最大不純物含量は、1 mg のノナコグ ベータ ペゴル当たり不純物 0.17 µg である。ノナコグ ベータ ペゴルの 1 日当たりの臨床摂取量は 2.4.4.11 に示された原則に基づいて算出し、ヒトの体重を 100 kg とすると最大 1 日曝露量は 4.2 mg/ヒト/日となる。このことから、これら不純物のヒトにおける最大 1 日曝露量は 0.7 µg/ヒト/日（0.17 µg/mg ノナコグ ベータ ペゴル × 4.2 mg ノナコグ ベータ ペゴル/100 kg ヒト）となる。これらの仮定から、1 日曝露量は遺伝毒性不純物の毒性学的懸念の閾値（TTC）として計算される 1.5 µg/ヒト/日[51, 52]よりも低い値であることから、安全性上の懸念はないものと考えられる。

2.4.4.11　容器施栓系からの溶出物（leachable）の毒性学的評価

ノナコグ ベータ ペゴルの容器施栓系は、12 mL の灰色のクロロブチルゴム製ストッパー付き透明ガラスバイアル及び 10 mmol/L ヒスチジン溶液を含むプレフィルド型ガラスシリンジから構成される。プレフィルド型ガラスシリンジ及びガラスバイアルはいずれもシリコン処理した[redacted] 1 型ガラスから成る。また、シリンジはゴム製プランジャー及び先端キャップから成り、これら 2 つはブロモブチル製ゴムでできている。全ての材料は、関連する欧州、米国及び日本の薬局方の基準に準拠している。詳細は Module 3.2.P.2.4 Container Closure System for Drug Product 及び 3.2.P.2.4 Container Closure System for Histidine Solution を参照のこと。

10 mmol/L ヒスチジン溶液を含むプレフィルド型シリンジからの溶出物（leachable）を最高 30℃の温度で 36 ヵ月保存後に評価した。12 種類の潜在的有機系溶出物（leachable）が同定された（表 2.4-9）。12 mL のクロロブチルゴム製ストッパー付き[redacted]ガラスバイアルでノナコグ ベータ ペゴル製剤を 5℃で 24 ヵ月、又は 5℃で 18 ヵ月に続き 30℃で 6 ヵ月保存後、別の溶出物（leachable）が 2 種類同定された（表 2.4-10）。

各溶出物について最大臨床曝露量を計算し、ICH Q3C[53]で概要が示されている 1 日摂取許容量（PDE）又は ICH M7[52] で決定された毒性学的懸念の閾値（TTC、1.5 µg/日）に対する比を算出した。科学論文に毒性学的データが見いだせなかった場合には後者の原則を用いた。

ノナコグ ベータ ペゴルの臨床曝露量は、週 1 回の予防治療（52×40 IU/kg）、年 2 回の出血時治療（2×40 IU/kg）及び年 1 回の大手術（80＋40＋40 IU/kg）という年間投与計画から算出される総投与量 2,320 IU/kg/年に基づいて推定される。2,320 IU/kg/年は 1 日曝露量として 6.4 IU/kg/日に相当し、ノナコグ ベータ ペゴル 1 mg は 152 IU に相当するため、6.4 IU/kg/日の 1 日曝露量を 152 IU/mg で除することで 42 µg/kg/日の 1 日曝露量が換算される。保守的に製剤の内、最も低い含量である 820 µg/mL（表 2.4-7）を用いて算出した場合、最大臨床投与容量は、42 µg/kg/日を 820 µg/mL で除して 0.051 mL/kg/日となる。

表 2.4-9 及び表 2.4-10 に示した通り、溶出物（leachable）のレベルはいずれも TTC 及び PDE 以下である。したがって、容器施栓系及びプレフィルド型シリンジからの溶出物（leachable）は、上記の指定温度で長期保存した後に検出されたレベルでは安全性に対する懸念は生じないと考えられる。

表 2.4-9　30℃までの温度で 36 ヵ月間保存したプレフィルド型シリンジのヒスチジン溶液からの溶出物（leachable）の最大臨床曝露量

Compound	CAS no.	Maximal concentration of leachables (µg/mL)	Max. clinical i.v. exposure (µg/kg/day)[a]	PDE[a,b] (mg/kg/day)	Fold to PDE	Max clinical i.v. exposure per day (µg/person/day)[d]	Fold to TTC (TTC= 1.5 µg/person/day)
4-methyl-benzaldehyde	104-87-0						
4-methyl-benzoic acid[54]	99-94-5			b			
4'-methyl-acetophenone	122-00-9						
4-tert-amylphenol[55]	80-46-6			b			
2-chloro-4-tert-amylphenol	73090-69-4						
methyl isobutyl ketone	108-10-1			a			
2-hexanone	591-78-6			a			
3-hexanone	589-38-8						
2-hexanol[c]	626-93-7			d			
3-hexanol	623-37-0						
Dimethylsilanediol[56]	1066-42-8			b			
Trimethylsilanol[57]	1066-40-6			b			

NA: Not applicable

[a]PDE established in ICH Q3C

[b]PDE calculated based on toxicological data from scientific literature applying same principle as in ICH Q3C i.e. PDE= NOAEL divided by (F1 × F2 × F3 × F4 × F5),

[c]The PDE for 2-hexanone is considered protective for exposure to 2-hexano

[d]Max clinical exposure per day for a person weighing 100 kg

表 2.4-10　5℃で 24 ヵ月又は 5℃で 18 ヵ月に続き 30℃で 6 ヵ月保存した 12 mL のクロロブチルゴム製ストッパー付き[redacted]ガラスバイアルからの溶出物（leachable）の最大臨床曝露量

Compound	CAS no.	Maximal concentration of leachables (µg/mL)	Max. clinical i.v. exposure (µg/kg/day)[a]	PDE[a] (mg/kg/day)	Fold to PDE	Max clinical i.v. exposure per day (µg/person/day)[b]	Fold to TTC (TTC= 1.5 µg/person/day)
Butylated hydroxy toluene[58, 59]	128-37-0			b			
2-isopropenyl-1,1,5,5-tetramethyl-3-(2,2,4-trimethylpentyl)cyclohexane	None						

NA: Not applicable

[a]PDE calculated based on toxicological data from scientific literature applying same principle as in ICH Q3C i.e. PDE= NOAEL divided by (F1 × F2 × F3 × F4 × F5)

[b] Max clinical exposure per day for a person weighing 100 kg

2.4.5　総合的考察及び結論

ノボ ノルディスク社は、rFIX の $t_{1/2}$ を延長させ、注射回数を減じ、血友病 B 患者における効果持続時間の延長を目的としたノナコグ ベータ ペゴル、すなわち 40 kDa PEG 化ヒト rFIX を開発した。効力を裏付ける試験から、ノナコグ ベータ ペゴルの作用機序及び効果持続時間の延長が裏付けられた。

2.4.5.1　ノナコグ ベータ ペゴル及び rFIX における PK/PD の比較

In vitro でノナコグ ベータ ペゴルは生理活性物質 FXIa 及び TF/FVIIa 複合体によって活性化されることが示された。FXIa によるノナコグ ベータ ペゴルの活性化速度は、rFIX の活性化と同等であった。一方、TF/FVIIa 複合体による活性化速度は、rFIX よりも低かった。ノナコグ ベータ ペゴルの内皮細胞への結合親和性は rFIX よりも低かった。このことから、*in vitro* ではノナコグ ベータ ペゴルの薬力学的特性に PEG がある程度影響を及ぼすことが示された。しかしながら、このことは *in vivo* での効力低下をもたらさなかった。一旦活性化されると、ノナコグ ベータ ペゴルの薬力学的特性は rFIXa と差が認められなかった。F9-KO マウスを用いる *in vivo* の薬効評価モデルから、BeneFIX®と比較してノナコグ ベータ ペゴルは同等の急性期止血効果を有し、止血効果が長時間持続することが示された。本結果は、F9-KO マウス及び血友病 B イヌにおいて BeneFIX®よりも長い $t_{1/2}$、低い CL 及び高い C_{max} が示されたノナコグ ベータ ペゴルの PK 特性によって支持された。

2.4.5.2　PK

ノナコグ ベータ ペゴルの PK 特性は、ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質分子を検出する生体試料中薬物濃度分析法を用いて明らかにされている。一般に、ノナコグ ベータ ペゴルの PK は、各種の非臨床試験に用いた動物種において、静脈内ボーラス投与後、1 相性の血漿消失パターンを示した。Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおいて、全身曝露量は概して用量比例的に増加した。非臨床と臨床での AUC の比較から、非臨床安全性試験における曝露量は、40 IU/kg という推奨臨床用量での曝露量と比較して、ラットでは 0.2～5 倍、サルでは 5～75 倍であることが明らかとなった（表 2.4-3）。

体内分布、排泄及び代謝試験のため、タンパク質部分（活性化ペプチドを ^{3}H 標識）、リンカー（グリシンリンカーを ^{14}C 標識）又は PEG（PEG を ^{3}H 標識）を放射能標識した 3 種の放射能標識トレーサーを用いた。タンパク質部分（活性化ペプチド）を放射能標識したトレーサーの PK は、同様の 1 相性の消失パターンを示し、タンパク質の生体内運命を反映している。リンカー又は PEG 部分を放射能標識したトレーサーの PK は、PEG 単体投与時と類似した 2 相性の消失パターンを示し、PEG の生体内運命／CL を反映している。PEG は、推定 $t_{1/2}$ が 2～3 日の、消失の速やかな初期相と、推定 $t_{1/2}$ が 15～18 日の、消失の緩徐な終末相を伴い、血漿中から尿及び糞中に排泄されることが知られている。緩徐に消失する終末相は、PEG、又はタンパク質分解後のリンカーに結合した PEG を表している可能性が高い。この裏付けとして、代謝試験において、ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質が分解され、主に 40

kDa PEG が体内を循環したことが明らかとなっている。F9-KO マウス及びラットにおいて、PEG 関連化合物（40 kDa 以下の PEG）が尿及び糞中に排泄され、大部分は消失の速い初期相で排泄されたことが認められている。ノナコグ ベータ ペゴルの単回投与後 12 週時において、5～11%の放射能が排泄されずに残存していたが、ノナコグ ベータ ペゴルは特定の器官に限局することはなかった。

分布試験から、ノナコグ ベータ ペゴルは速やかに全身に分布し、濃度は血流量の多い組織で最も高く、中枢神経系で最も低いことが示された。

2.4.5.3 毒性

ノナコグ ベータ ペゴルは、Rowett ヌードラットへの 1200 IU/kg までの 5 日に 1 回投与による 26 週間反復投与毒性試験及びカニクイザルにおける 1300 IU/kg までの週 1 回投与による 4 週間反復投与毒性試験で良好な忍容性が認められた。重要な試験であるカニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験では、高用量（3750 IU/kg/週）で軽度でかつ一過性に全身の震えが認められた。全身の震えは、臨床投与量の 75 倍の曝露量で試験初期に 1 又は 2 回みられたのみであったことから、臨床における 40～80 IU/kg の投与計画との関係において臨床的関連性を有さないと考えられた。実際、臨床試験では震えは報告されていないことからこのことが裏付けられている（Module 2.7.4 臨床的安全性の要約を参照のこと）。

ヒト FIX はカニクイザルでは外来異物であることから、重要な試験である 4 週間反復投与毒性試験では、交叉反応性の中和抗体の用量依存的な増加が認められ、中及び高用量群の多くの個体で後天性血友病様の変化が認められた。また、低用量（200 IU/kg/週）で実施した 13 週間投与免疫原性試験では、大多数の個体で内因性 FIX と交叉反応する中和抗薬物抗体が認められ、その結果、後天性血友病様の変化が生じ、5～6 回投与後の体内曝露に影響が認められたことから、本動物種では意味のある長期投与毒性の評価は不可能であると考えられた。

非臨床試験でみられた免疫原性からヒトの免疫原性を予測できないと考えられているが、市販の rFIX（BeneFIX®）とノナコグ ベータ ペゴルのラットにおける相対的な免疫原性の比較を行った。8 週間までの投与においてノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の免疫原性に差異は認められなかった。この結果は、他の FIX 製剤との比較においてノナコグ ベータ ペゴルの免疫原性リスクは変化しなかったという臨床試験結果によっても支持される。免疫原性に関する詳細な臨床結果については、Module 5.3.5.3 Integrated Summary of Immunogenicity を参照のこと。

Rowett ヌードラット及びカニクイザルともに、PT の延長が認められた。投与後の休薬期間中に採取した試料では、完全にベースライン値に復していることが確認された。*In vitro* 試験により高濃度の FIX が PT に影響を与えることが裏付けられた。以上のことから、カニクイザル及び Rowett ヌードラッ

トでみられた PT の延長は、概して臨床試験での FIX 濃度に比較して極端に高い血漿中 FIX 濃度でもたらされた変化であると考えられた。臨床試験では、少数の症例のみに PT の延長が報告されたが、一定の傾向は認められなかった。詳細については、Module 2.7.4 臨床的安全性を参照のこと。

PEG を含む治療薬の経験から、PEG 化製剤が非臨床試験用動物モデルにおいて脈絡叢上皮細胞における空胞形成を示した場合、PEG 化製剤の安全性をさらに評価するための勧告が公表されている。ノナコグ ベータ ペゴルでは、予定臨床用量よりもはるかに高用量を用い、また、IHC 染色及び透過型電子顕微鏡による高感度観察も行ったが、カニクイザル又は Rowett ヌードラットでは、脈絡叢上皮細胞に空胞形成はみられず、有害所見も認められなかった。ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分は脈絡叢上皮細胞に分布することが示されているが、組織学的及び超微構造のレベルでは空胞形成及び細胞機能障害の兆候は認められなかったことから、有害ではないものと考えられた。

2.4.5.4 結論

ノボ ノルディスク社は、非臨床試験プログラムから、ノナコグ ベータ ペゴルの薬理、PK 及び毒性の特性は明らかにされたものと考える。

参考文献

1 ICH S6. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. 16 July 1997.
2 ICH M3(R2). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. 11 June 2009.
3 EMA. CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediactric population. EMA/CHMP/SWP/647258/2012. November 2012.
4 Monroe M, Hoffmann M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1381-1389.
5 Østergaard H, Bjelke JR, Hansen L, Petersen LC, Pedersen A, Elm T, et al. Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide. Blood. 2011;118(8):2333-2341.
6 Cheung WF, van den Born J, Kühn K, Kjelléns L, Hudson BG, Stafford DW. Identification of the endothelial cell binding site for Factor IX. Proc Natl Acad Sci USA. 1996;93:11068-11073.
7 Cheung WF, Hamaguchi N, Smith KJ, Stafford DW. The binding of human factor IX to endothelial cells is mediated by residues 3-11. J Biol Chem. 1992;267(29):20529-20531.
8 Cai Y, Zhang Z, Fan K, Zhang J, Shen W, Li M. Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and antiviral activity of pegylated recombinant human consensus interferon-alpha variant in monkeys, rats and guinea pigs. Regul Pept. 2012;173:74-81.
9 Nesbitt AM, Stephens S, Chartash EK. Certolizumab pegol: a PEgylated anti-tumour necrosis factor alpha biological agent. In: Veronese FM, ed. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications. Basel: Birkhäuser Verlag. 2009;229-254.
10 Webster R, Didier E, Harris P, Siegel N, Stadler J, Tilbury L, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. Drug Metab Dispos. 2007;35:9-16.
11 Webster R, Elliott V, Park BK, Walker D, Hankin M, Taupin P. PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. In: Veronese FM, editor. PEGylated protein drugs: basic science and clinical applications. Berlin: Birkhäuser; 2009;127-146.
12 Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. J Pharm Sci. 1994;83:601-606.
13 Kaminskas LM, Ascher DB, McLeod VM, Herold MJ, Le CP, Sloan EK, et al. PEGylation of interferon alpha2 improves lymphatic exposure after subcutaneous and intravenous administration and improves antitumour efficacy against lymphatic breast cancer metastases. J Control Release. 2013;168:200-208.
14 Lamka J, Schiavon O, Laznicek M, Caliceti P, Veronese FM. Distribution of catalase, ribonuclease and superoxide dismutase modified by monomethoxy (polyethylene glycol) into rat central lymph and lymphatic nodes. Physiol Res. 1995;44:307-313.
15 Zou Y, Bateman TJ, Adreani C, Shen X, Cunningham PK, Wang B, et al. Lymphatic absorption, metabolism, and excretion of a therapeutic peptide in dogs and rats. Drug Metab Dispos. 2013;41:2206-2214.
16 Woodburn KW, Fong K-L, Wilson SD, Sloneker S, Strzemienski P, Solon E, et al. Peginesatide clearance, distribution, metabolism, and excretion in monkeys following intravenous administration. Drug Metab Dispos. 2013;41:774-784.
17 FDA. Omontys: Pharmacology Reviews. Application number: 202799Orig1s000. 27 Feb 2012.
18 Sawant SG, Fielden MR, Black KA. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. Regul Toxicol Pharmacol. 2014;70:87-97.
19 FDA. BeneFIX™: Summary of basis for approval. Reference number 96-1048. 1997.
20 EMEA. BeneFIX®: Scientific discussion. 2005.
21 Schaub R, Garzone P, Bouchard P, Rup B, Keith J, Brinkhous K, et al. Preclinical studies of recombinant factor IX. Semin Haemtol. 1998;35(2):28-32.
22 Lanigan RS, Yamarik TA. C. Final report on the safety assessment of PEG-6, -8, and -20 sorbitan beeswax. Int J Toxicol. 2001;20(Suppl 4):27-38.

23 EMEA. Somavert: EPAR - Scientific discussion. 2004.
24 FDA. Somavert: Pharmacology reviews, Application number 21-106. 27 November 2002.
25 FDA. Somavert: Label update 12-Dec-2013, section 13.1 Carcinogenicity, Mutagenicity, impairment of fertility.
26 EMEA. PEGintron: EPAR - Scientific Discussion. 2005.
27 EMEA. Macugen: EPAR - Scientific Discussion. 2006.
28 FDA. Macugen: Pharmacology reviews. Application number 21-756. 17 March 2004.
29 EMEA. PEGasys: EPAR - Scientific Discussion. 2005.
30 FDA. PEGasys: Summary pharmacology/toxicology review of PEGASYS® for hepatitis C. RMS BLA 103964. 19 Feb 2001.
31 FDA. Cimzia: Pharmacology Reviews. BLA 125160/0. 18 April 2008.
32 EMEA. Cimzia: Assessment report. EMEA/664021/2009.
33 FDA. Omontys: Highlights of prescribing information. (Label) Mar 2012.
34 Williams L. Reverse mutation in four histidine-requiring strains of salmonella typhimurium and two tryptophan-requiring strains of escherichia coli using a treat and plate methodology. Covance Laboratories Ltd. GLP study no.665/934. Novo Nordisk reference number 207397. 2008.
35 DEREK for Windows 11.0.0. FVII Peg Linker. Sponsor's Reference No. 209089. Covance. 2009.
36 Cavagnaro JA. Preclinical evaluation of cancer hazard and risk of biopharmaceuticals. In: Cavagnaro JA, ed. Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. A science based approach to facilitating cinical trials. New York (NY): John Wiley & Sons. 2008;399-474.
37 Vahle JL, Finch GL, Heidel SM, Hovland DN, Ivens I, Parker S, et al. Carcinogenicity assessment of biotechnology-derived pharmaceuticals: A review of approved molecules and best practice recommendations. Toxicol Pathol. 2010;38:522-553.
38 Search for possible carcinogenesis related to FIX products. 1966-2012.
39 Search for cancer assessment of pegylated factor IX. 1994-Oct 2014.
40 Kliegman, R., & Nelson, W. E. 1. (2011). Nelson textbook of pediatrics (19th ed.). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders – page 1698.
41 Rudmann DG, Alston JT, Hanson JC, Heidel S. High molecular weight polyethylene glycol cellular distribution and PEG-associated cytoplasmic vacuolation is molecular weight dependent and does not require conjugation to proteins. Toxicol Pathol. 2013;41(7):970-983.
42 Bendele A, Seely J, Richey C, Sennello G, Shopp G. Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. Toxicol Sci. 1998;42(2):152-157.
43 Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, Brandli-Baiocco, Cavagnaro J, Dempster M, et al. PEGylated Biopharmaceuticals: Current Experience and Considerations for Nonclinical Development. Toxicologic Pathology. 2015;43(7):959-983.
44 Kaufman LS, Conover C, Buchbinder A. The occurance of miscroscopic vacuoles in toxicology studies with marketed PEGylated proteins is associated with high doses, high clinical multiples, and accumulation. Poster. PDS 1810.
45 Morrison JP, Sharma AK, Rao D, Pardo ID, Garman RH, Kaufman W, et al. STP 2014 continuous education course #3: fundamentals of translational neuroscience in toxicologic pathology: optimizing the value of animal data for human risk assessment. Toxicol Pathol. 2015;43(1):132-139.
46 Redzic ZB, Segal MB. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. Adv Drug Delev Rev. 2004;56(12):1695-1716.
47 Ivens IA, Bauman A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. Haemophilia. 2013;19:11-20.
48 Baumann A, Tuerck D, Prabhu S, Dickmann L, Sims J. Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis? Drug Discov Today. 2014;19:1623-1631.
49 FDA. Guidance for Industry. Immungenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. Aug 2014.
50 Derek CMPNAN and 40K PSC

[51] FDA. Guidance for the Industry. Genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: Recommended approaches. Draft guidance. December 2008.

[52] ICH M7. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. 23 June 2014.

[53] ICH Q3C(R5). Impurities: Guideline on residual solvents. 4 Feb 2011.

[54] Shirota M, Seki T, Tago K, Katoh H, Marumo H, Furuya M, et al. Screening of toxicological properties of 4-methylbenzoic acid by oral administration to rats. J Toxicol Sci. 2008;33(4):431-445.

[55] US-EPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Reregistration eligibility decision (red) for para-tertiary-amylphenol, potassium sodium salt (Case 3016). 2005.

[56] Silicones Environmental, Health and Safety Council. Final Report: Combined repeated dose toxicity study with the reproductive/developmental toxicity screening test for dimethylsilanediol in sprague-dawley rats via oral gavage. 2009, 7 October.

[57] OECD - SIDS Initial Assessment Report For SIAM 31. Oxford, United Kingdom, 19-22 October, 2010.

[58] World Health Organisation (WHO) (1996): 833. Butylated hydroxytoluene. Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food. Prepared by the forty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). WHO Food Additives Series 35.

[59] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA J 2012;10(3):2588-2631.