ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.1 緒言

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
略語一覧 3
2.6.1 ノナコグ ベータ ペゴル 4
2.6.2 製剤 6
2.6.3 申請された適応、用量及び投与期間 6
2.6.4 ノナコグ ベータ ペゴル nonacog beta pegol の表記 7
2.6.5 単位と国際単位の比較 7
2.6.6 IU の mg 及び μmol の換算 7

略語一覧

AUC	:	area under the concentration-time curve（濃度－時間推移曲線下面積）
AUC_{GIR}	:	area under the glucose infusion rate curve （グルコース注入速度推移曲線下面積）
BMI	:	body mass index〔体容量指数：体重(kg)／身長$(m)^2$〕
C_{max}	:	maximum concentration（最高血中濃度）
CPMP	:	Committee for Proprietary Medicinal Products（欧州医薬品委員会）
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay（酵素免疫吸着測定法）
EMEA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
FDA	:	US Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
GCP	:	good clinical practice（医薬品の臨床試験の実施の基準）
GIR	:	glucose infusion rate（グルコース注入速度）
GIR_{max}	:	maximum glucose infusion rate at steady state（最高グルコース注入速度）
PP	:	per protocol (analysis set)（治験実施計画書に適合した対象集団）
SD	:	standard deviation（標準偏差）
TEAE	:	treatment emergent adverse event
$tGIR_{max}$	:	time at which the highest glucose infusion rate occurs（最高グルコース注入速度到達時間）
t_{max}	:	time at which the highest concentration occurs（最高血中濃度到達時間）
$t_{1/2}$	:	terminal half-life（消失半減期）
TEAE	:	treatment emergent adverse event

2.6.1　ノナコグ ベータ ペゴル

ノボ ノルディスク社は 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: 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 2.6.1-1 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。遺伝子組換えヒト FIX である N9（rFIX、非臨床に関する概要では rFIX と呼ぶ）は、ノナコグ ベータ ペゴル製造における中間体であり、その分子量は約 55.6 kDa である。

rFIX の PEG 化は酵素を用いて行われ、rFIX 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。rFIX 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、ほぼ均等に分布している。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 rFIX、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。より詳細な構造は、Module 3.2.S.1.2 構造を参照のこと。

ノナコグ ベータ ペゴルは、他の FIX 製剤よりも半減期を長くし、全般的に薬物動態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 ペゴルは半減期が長く、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。

ノナコグ ベータ ペゴルが血液凝固過程で活性化されると、活性化ペプチド及び結合された PEG 部分は開裂され（図 2.6.1-1 の赤印）、天然型と同一構造の活性化 rFIX（rFIXa）が残る。したがって、一旦活性化されたノナコグ 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。FIXa は、活性化第 VIII 因子（FVIIIa）に加えてリン脂質及びカルシウムイオンを含む他の補助因子の存在下でテナーゼ複合体を形成し、第 X 因子を活性化する（FXa）。この結果として、プロトロンビンがトロンビンに変換され、最終的にフィブリノゲンがフィブリンに変換される。フィブリンは線維状の強固な不溶性タンパク質であり、沈着し血小板に結合する。血液凝固第 XIII 因子（FXIII）がフィブリン架橋を完成させ、機械的強度がより高いフィブリン塊を生成する。架橋したフィブリンは、血小板血栓上でフィブリン網を形成し、血栓が完成する。

ノナコグ ベータ ペゴルの作用機序は、血友病 B 患者における欠乏又は欠損している FIX の補充である。FIX の補充により、血液凝固カスケードが途切れることなく進み、最終産物であるフィブリンの生成を経て、止血栓が形成される。

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。

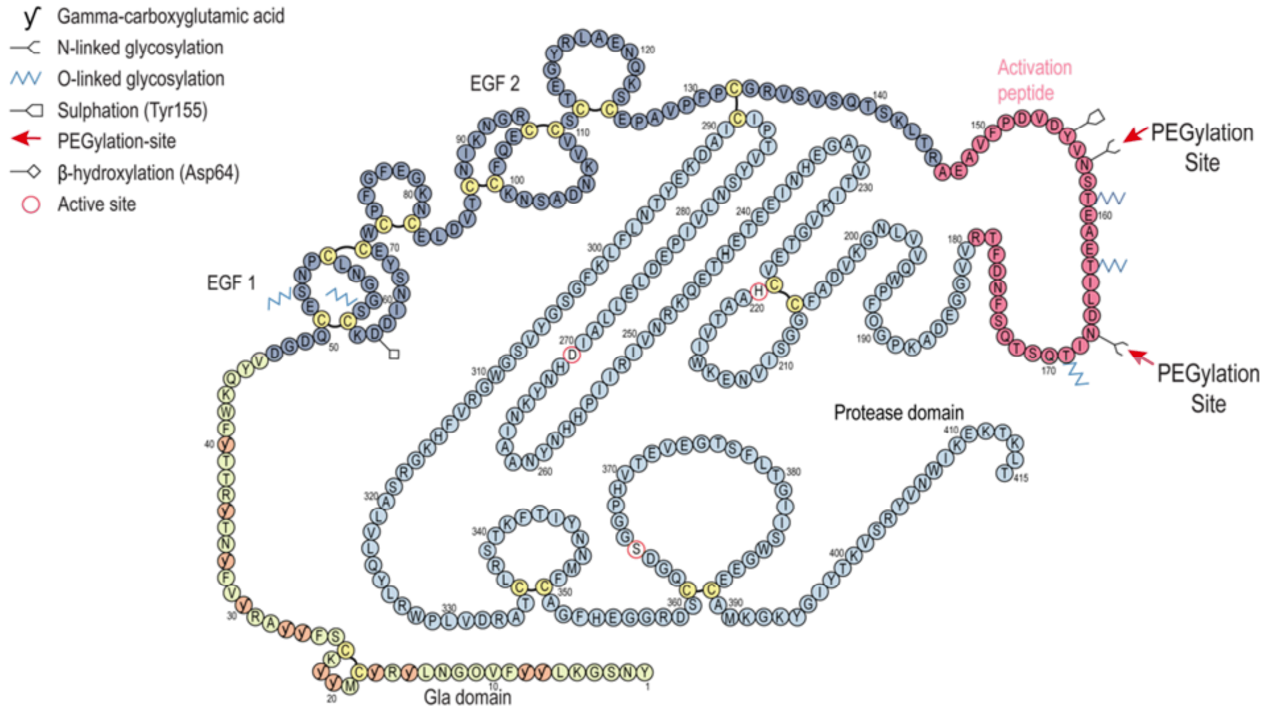


図 2.6.1-1　　ノナコグ ベータ ペゴルの一次構造、赤矢印は活性化ペプチド上の 2 ヵ所の PEG 化可能な N-結合型糖鎖の部位（Asn157 及び Asn167）を示す

2.6.2　製剤

ノナコグ ベータ ペゴル製剤は、表示量 500 IU/バイアル、1000 IU/バイアル又は 2000 IU/バイアルの単回使用バイアルに入った凍結乾燥粉末であり、4.2 mL の 10 mmol/L ヒスチジン溶解液で溶解して静注に用いる。溶解後の液は無色澄明な液であり、異物を認めない。

開発中に組成と製造工程は最適化され、非臨床試験は異なる製造工程（A1、B1 及び B3）から得られたロットを用いて実施された。概要は表 2.6.2-1 を参照すること。開発中に使用した異なる組成と製造工程の同等性については、Module 3.2.P.2.3.製造工程の開発の経緯を参照すること。臨床ロットと非臨床ロットの同等性については、Module 3.2.P.5.4 ロット分析を参照すること。

表 2.6.2-1　　開発期間中における製剤の組成、製造工程及び主な使用目的の概要

Drug product composition	**A**	**B**		
Manufacturing process	1		2	3
Composition/manufacturing process	A1	B1	B2	B3
Manufacturing facility of drug product	Novo Nordisk pilot facility, Gentofte Denmark	Novo Nordisk pilot facility, Gentofte Denmark	Novo Nordisk pilot facility, Gentofte Denmark	Novo Nordisk pilot facility, Gentofte Denmark and Novo Nordisk commercial facility, Gentofte Denmark
Manufacturing facility of drug substance	Pilot purification and PEGylation facility	Pilot purification and PEGylation facility	Pilot purification and PEGylation facility	Pilot purification and PEGylation facility and Commercial purification and PEGylation facility
Use	Non-clinical Clinical phase 1 trial	Non-clinical Clinical phase 3 trial	Clinical phase 3 trial	Non-clinical Clinical phase 3 trial

2.6.3　申請された適応、用量及び投与期間

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。

予定している投与経路は静脈内注射である。定期補充療法での推奨用量は 40 IU/kg 週 1 回投与、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。

2.6.4　ノナコグ ベータ ペゴル nonacog beta pegol の表記

開発中に、ノナコグ ベータ ペゴルに対して複数の表記が使用された。それらには N9-GP、RP 0156、NN7999、LA-FIX、LA-rFIX、40 kDa PEG rFIX、40 K-rFIX、40K PEG-rFIX、PEG 化遺伝子組換え第 IX 因子、40K PEG 化遺伝子組換え第 IX 因子、40K PEG 化遺伝子組換えヒト第 IX 因子、NNC0156-0000-0009 又は NNC0156-0009 が含まれる。これらの表記は、非臨床試験の報告書で区別なく使用された。

中間体遺伝子組換え FIX の表記は rFIX 又は N9 である。薬理試験では、市販の rFIX である BeneFIX®を使用した。したがって、rFIX に関する一般的な記述に関しては、rFIX を BeneFIX®と N9 の両者に対して区別なく使用している場合がある。それ以外の場合には、N9 又は BeneFIX®を明記している。

2.6.5　単位と国際単位の比較

非臨床開発プログラムを通して、すべての投与量と薬物動態の値は単位（U）で表示され、U が主要な試験報告書で使用された。ノナコグ ベータ ペゴルの 1U は、FIX の 1 国際単位（IU）に相当することから、非臨床に関する文書では IU を使用し、臨床に関する概要と一致させた。

2.6.6　IU の mg 及び μmol の換算

IU から mg 又は μmol への換算には、計算を簡略化するためにモノ PEG 化 rFIX を使用した表 2.6.6-1 を参照すること。1 mg のノナコグ ベータ ペゴルタンパク質は 152 IU に相当し、rFIX（糖鎖を除くタンパク質骨格）の分子量は 46525 Da、PEG の分子量は 40000 Da であり、1 mol のモノ PEG 化 rFIX には 1 mol の PEG が含まれる。これらの換算値は、2.6.4 薬物動態試験の概要文及び 2.6.6 毒性試験の概要文で、mg 及び μmol での PEG 投与量の概数値を算出する場合に使用される。

表 2.6.6-1　　IU に対応する mg 又は μmol 単位の投与量

	rFIX		**PEG**	
	mg	μmol	mg	μmol
152 IU	1.00	0.0215[a]	0.86[b]	0,0215[c]
80 IU	0.53[d]	0.0114	0.45	0.0114
40 IU	0.26	0.0056	0.23	0.0056
1IU	0.0066	0.0001	0.0057	0.0001

a：(1 mg = 1×1000 μg)÷46525 μg/μmol＝0.0215 μmol
b：(40 kDa÷46.525 kDa)×1 mg＝0.86 mg
c：(0.86 mg×1000 μg/mg)÷40000 μg/μmol＝0.0215 μmol
d：80IU÷152 IU/mg＝0.53 mg

ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.2 薬理試験の概要文

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 3
表目次 4
略語一覧 5
2.6.2.1 まとめ 8
2.6.2.2 薬効薬理 11
2.6.2.2.1 FIX の構造及び機能 12
2.6.2.2.2 ノナコグ ベータ ペゴル 13
2.6.2.2.3 *In vitro* 試験 14
2.6.2.2.3.1 40K PEG-rFIX の機能的 *in vitro* 特性解析：FXIa 及び TF/FVIIa 複合体による活性化（Module 2.6.3.2、試験番号 LCP080101） 15
2.6.2.2.3.2 生理的 FIX 活性物質である FXIa 及び TF/FVIIa 複合体によるノナコグ ベータ ペゴル活性（Module 2.6.3.2、試験番号 HQSG141101）及び FIXa/FVIIIa 複合体に触媒された FX 活性化における FIXa の特性解析（Module 2.6.3.2、試験番号 KFSQ141101） 16
2.6.2.2.3.3 トロンボエラストグラフィー 19
2.6.2.2.3.3.1 トロンボエラストグラフィーによる血友病 B 患者血中でのノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性比較（Module 2.6.3.2、試験番号 MSGC080301） 19
2.6.2.2.3.4 トロンビン生成試験 21
2.6.2.2.3.4.1 TF（Module 2.6.3.2、試験番号 ELW130401）又は FXIa（Module 2.6.3.2、試験番号 ELW130901）で誘発したノナコグ ベータ ペゴル及び N9 によるトロンビン生成の特性検討 21
2.6.2.2.4 ノナコグ ベータ ペゴルの *in vitro* 薬理試験のまとめ 22
2.6.2.2.5 *In vivo* 試験 23
2.6.2.2.5.1 血友病 B マウスの出血に対するノナコグ ベータ ペゴルの効果の用量反応性の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 TELM080903） 23
2.6.2.2.5.2 血友病 B マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴルの効果持続時間の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 TELM081202） 24
2.6.2.2.5.3 F9-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの効果持続時間の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 FLMQ081104） 27
2.6.2.2.5.4 F9-KO マウス膝関節損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの作用の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 MiE120301） 28

2.6.2.2.5.5 血友病 B イヌにおけるヒト FIX 製剤の薬力学的作用（Module 2.6.3.2、試験番号 MIE080701）.....30
2.6.2.3 副次的薬理試験.....33
2.6.2.3.1 ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の血管内皮細胞に対する結合（Module 2.6.3.2、試験番号 PKHO090102）.....33
2.6.2.3.2 血漿及び全血を用いた測定法における FIX 活性測定.....33
2.6.2.3.3 血漿及び全血を用いる測定法における凝固活性.....34
2.6.2.3.3.1 凝固一段法.....34
2.6.2.3.3.1.1 凝固一段法によるノナコグ ベータ ペゴルの活性測定（Module 2.6.3.2、試験番号 MTBH071001）.....34
2.6.2.3.3.1.2 凝固一段法による活性化ノナコグ ベータ ペゴルの活性測定（Module 2.6.3.2、試験番号 MTBH100202）.....37
2.6.2.3.3.1.3 各種 aPTT 試薬を用いた凝固一段法におけるノナコグ ベータ ペゴルの回収率－作用機序試験（Module 2.6.3.2、試験番号 215063）.....39
2.6.2.3.3.2 発色性合成基質法.....40
2.6.2.3.3.2.1 発色性合成基質法におけるノナコグ ベータ ペゴルの測定法性能（Module 2.6.3.2、試験番号 PKHO141102）.....40
2.6.2.3.4 ノナコグ ベータ ペゴル測定法における PEG 化の影響に関する全体的結論.....41
2.6.2.4 安全性薬理試験.....42
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験.....43
2.6.2.6 考察及び結論.....44
参考文献.....46

図目次

ページ

図 2.6.2-1 細胞における血液凝固様式.....12
図 2.6.2-2 FIX の作用機序.....13
図 2.6.2-3 ノナコグ ベータ ペゴルの構造.....14
図 2.6.2-4 ノナコグ ベータ ペゴルの活性化.....15
図 2.6.2-5 ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の FXIa による活性化の経時変化.....16
図 2.6.2-6 ノナコグ ベータ ペゴルと rFIX（BeneFIX®又は N9）の活性及び機能特性の比較.....18
図 2.6.2-7 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.....20
図 2.6.2-8 TF 誘発時の N9 (A)及びノナコグ ベータ ペゴル(B)によるトロンビン生成反応（ELW130401）.....22

図 2.6.2-9　FXIa 誘発時の N9 (A)及びノナコグ ベータ ペゴル(B)によるトロンビン生成反応（試験番号 ELW130901）.....22
図 2.6.2-10　F9-KO マウスにおける出血時間及び出血量に対する効果の用量反応性.....24
図 2.6.2-11　F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®（0.75 mg/kg）の効果持続時間.....26
図 2.6.2-12　F9-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の効果持続時間.....28
図 2.6.2-13　ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®投与後の F9-KO マウスにおける滑膜炎スコア.....30
図 2.6.2-14　WBCT に基づくノナコグ ベータ ペゴル（●）及び BeneFIX®（■）のヒト FIX 免疫寛容血友病 B イヌにおける効果持続時間.....31
図 2.6.2-15　TEG に基づくノナコグ ベータ ペゴル（●）及び BeneFIX®（■）のヒト FIX 免疫寛容血友病 B イヌにおける効果持続時間.....32
図 2.6.2-16　ノナコグ ベータ ペゴルは BeneFIX®及び N9 よりも低い親和性で内皮細胞へ結合する.....33
図 2.6.2-17　凝固一段法及び各種 aPTT 試薬を用いた FIX 製剤（BeneFIX®、N9、ノナコグベータ ペゴル及び 40k PEG BeneFIX®）の FIX 活性.....35
図 2.6.2-18　各種 aPTT 試薬を用いた凝固時間測定に及ぼす rFIX の PEG 化の影響.....37
図 2.6.2-19　各種 aPTT 試薬（SynthAFax 又は Dapttin）を用いる凝固時間に及ぼす rFIX の活性化の影響.....38
図 2.6.2-20　各種 aPTT 試薬（APTT-SP、Triniclot HS、STA PTTa、Actin-FS 及び Synthasil）を用いた凝固時間測定に及ぼす rFIX の活性化の影響.....39
図 2.6.2-21　2 種の FIX 発色性合成基質法測定キットで定量した、ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®又は MonoNine®を添加した FIX 欠損血漿における FIX 活性の回収率.....41

表目次

ページ

表 2.6.2-1　薬理試験の概要.....8
表 2.6.2-2　酵素反応速度パラメータ.....19
表 2.6.2-3　血友病 B 患者の全血を用いた TEG の測定結果.....21
表 2.6.2-4　針穿孔誘発膝損傷モデルにおける滑膜炎スコア.....29
表 2.6.2-5　CNS に及ぼす影響の評価又は一般状態観察時にみられた全身の震えの要約.....42

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（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）

2.6.2.1 まとめ

ノナコグ ベータ ペゴルは分子量 40 kDa のポリエチレングリコール（40K PEG）で修飾した遺伝子組換えヒト血液凝固第 IX 因子（rFIX）製剤であり、活性化ペプチドに 40K PEG を結合させたものである。血管傷害部位において活性化が起きると、ノナコグ ベータ ペゴルから PEG 化活性化ペプチドが除去され、天然型の活性型 FIX（FIXa）と同一構造及び同等の機能を有する分子に変換される。活性化後は活性化ペプチドに生物学的役割は無く、タンパク質分解系により分解され、リンカーと結合した PEG が循環血中に残る。薬効薬理試験の目的は、ノナコグ ベータ ペゴルが rFIX と類似した薬理学的特性を有する一方で作用時間が延長していることを示すことである。したがって、rFIX 製剤〔BeneFIX®またはノボ ノルディスク社で製造した rFIX（N9）〕との比較を行った。表 2.6.2-1 に、臨床試験及び承認申請のために実施した薬理試験の概要を示した。

表 2.6.2-1　　薬理試験の概要

Discipline	Study Title	Compounds	Study ID
Primary Pharmacology			
In vitro studies	Functional *in vitro* characterization of 40K PEG- rFIX including activation by factor XIa and factor VIIa-tissue factor and subsequent inactivation by antithrombin III	Nonacog beta pegol and BeneFIX®	LCP080101
	Activation of nonacog beta pegol by physiological activators FXIa and TF-FVIIa	Nonacog beta pegol, BeneFIX®, N9	HQSG141101
	Characterisation of FIXa activity in FIXa-FVIIIa catalyzed FX activation	Nonacog beta pegol, BeneFIX®, N9	KSFQ141101
	Comparison of NN LA-N9 and BeneFIX® in TEG® in blood from haemophilia B patients	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	MSGC080301
	Characterising sensitivity of the thrombin generation assay using nonacog beta pegol and N9 with FXIa as the trigger	Nonacog beta pegol, N9	ELW130901
	Utilizing design of experiment to characterise sensitivity of the thrombin generation assay using nonacog beta pegol and N9	Nonacog beta pegol, N9	ELW130401
In vivo studies	Dose response effect of 40K PEG-rFIX on bleeding in haemophilia B mice compared with BeneFIX®	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	TELM080903
	Duration of action of 40K PEG-rFIX on bleeding in haemophilia B mice compared with BeneFIX®	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	TELM081202
	Duration of effect of 40K PEG-rFIX vs. BeneFIX® in a ferric chloride induced injury model in F9-KO mice	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	FLMQ081104
	Effect of nonacog beta pegol compared to BeneFIX® in the knee joint injury model in F9-KO mice	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	MiE120301
	Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of different human FIX preparations in haemophilia B dogs	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	MIE080701

Discipline	Study Title	Compounds	Study ID
Secondary Pharmacology			
	Binding of nonacog beta pegol and BeneFIX® to vascular endothelial cells	Nonacog beta pegol, BeneFIX®, N9	PKHO090102
	Activity of nonacog beta pegol in one-stage clotting assays	Nonacog beta pegol, BeneFIX®, N9	MTBH071001
	Activity of pre-activated nonacog beta pegol in one-stage clotting assays	Nonacog beta pegol, BeneFIX®, N9	MTBH100202
	Nonacog beta pegol (N9-GP) recovery in one-stage FIX clot assay depends on the aPTT reagent – a mechanistic study	Nonacog beta pegol, BeneFIX®	215063
	Assay performance of nonacog beta pegol in chromogenic assays	Nonacog beta pegol, BeneFIX®, Mononine FIX®	PKHO141102
Safety Pharmacology			
	Safety Pharmacology endpoints (resp, CV, CNS, kidney) included in pivotal 4 wk repeat dose toxicity study in cynomolgus monkey	Nonacog beta pegol	208260
Pharmacodynamic Drug interaction			
No studies performed.			

ノナコグ ベータ ペゴルの *in vitro* における特性を異なる複数の試験系で評価したが、概してBeneFIX®と同等であった。ノナコグ ベータ ペゴルは活性型血液凝固第 XI 因子（FXIa）及び生理的活性化因子である組織因子（TF）／活性型血液凝固第 FVII 因子（FVIIa）複合体によりヒト rFIXa に変換された。この変換の反応速度は FXIa による活性時には通常の速度であったが、TF/FVIIa 複合体による活性時には緩徐であった。

ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 部分が、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）試薬の一部に干渉し、凝固時間が延長又は短縮し、そのために FIX 活性が過小評価又は過大評価され、限られた試薬でのみ正確な測定結果が得られた。PEG 化した BeneFIX®を用いた試験結果から、凝固一段法で認められた変動は PEG 化そのものに起因することが示唆された。凝固一段法による測定前にノナコグ ベータ ペゴルを FXIa で活性化したところ、ノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の凝固時間に差異は認められなかった。作用機序試験の結果、aPTT 試薬を含むシリカへの PEG を介したノナコグ ベータ ペゴル吸着に際し早発活性化が誘導されることが過大評価の原因であることが示されたが、過小評価の原因については未だに不明である。活性測定のデータと他の *in vitro* 及び動物での *in vivo* 薬効薬理試験における生物活性に相関が認められること及び既知のヒト FIX 製剤との比較結果から、ノボ ノルディスク社はノナコグ ベータ ペゴルの aPTT に基づく効力測定及び臨床検査に用いる最適な試薬として SynthAFax を選択した。一方で、発色性合成基質法では、凝固一段法で認められたような干渉は軽微であった。

ノナコグ ベータ ペゴルの止血作用は、FIX 欠損（F9-KO）マウス又は先天性 FIX 欠損イヌを用いる複数の動物モデルにおいて検討した。F9-KO マウスの急性尾出血モデルにおいて、ノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の有効性及び効力に明確な差異は認められなかった。F9-KO マウスの尾出血モデル及び塩化鉄誘発損傷モデルにおいて、ノナコグ ベータ ペゴルの止血作用は BeneFIX®と比較し有意な延長が認められた。F9-KO マウスの針穿刺膝損傷モデルにおいて、ノナコグ ベータ ペゴル単回投与は、等用量の BeneFIX®投与と比較し、滑膜損傷治癒を有意に改善した。上記の通り、すべての *in vivo* モデルにおいて急性期でのノナコグ ベータ ペゴルの止血効果は BeneFIX®と同様であり、その持続時間は BeneFIX®よりも有意に延長された。

安全性薬理評価項目（血圧、心電図、呼吸数、体温、神経系/中枢神経（CNS）系評価項目及び尿検査）を、カニクイザル 4 週間反復投与毒性試験に組み入れて評価した。安全性薬理に関連する唯一の所見は、高用量群（3750 IU/kg/週）の初回及び 2 回目投与後に認められた軽度で一過性の全身の震えであった。1300 IU/kg/週までの用量では、安全性薬理パラメータに関連する影響は認められず、無毒性量（NOAEL）は 1300 IU/kg/週であると推察された。

2.6.2.2 薬効薬理

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の、安定した血小板血栓とフィブリン血栓の形成である。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（図 2.6.2-1）[1]。

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 は開始期において明確な役割を有せず、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 が生成されると、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、TF/FVIIa 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[1]。

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。

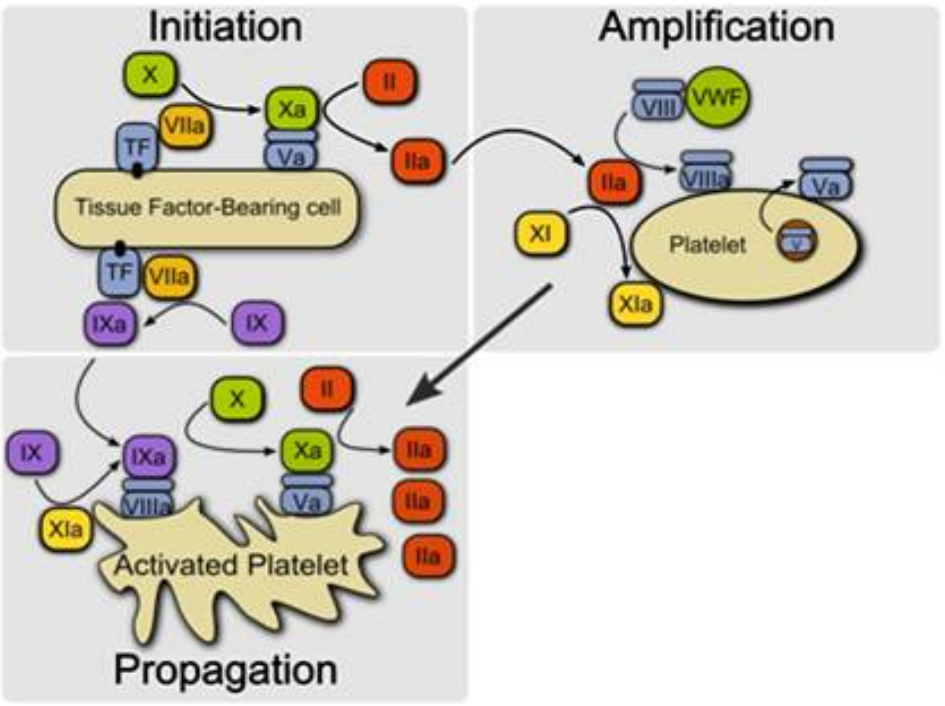


図 2.6.2-1　　細胞における血液凝固様式
Adapted from Monroe and Hoffman[1]

2.6.2.2.1　FIX の構造及び機能

FIX は血液凝固系における重要なセリン・プロテアーゼであり、ビタミン K 依存性タンパク質に属している。FIX は FVII、FX 及びプロテイン C と共通したドメイン構造を有する[2]。FIX は血漿中で 55 kDa の一本鎖プロテアーゼ前駆体として循環しており、その濃度は約 90 nmol/L（5 µg/mL）であり、この濃度が 1 IU/mL と定義される。FIX は FXIa 及び TF/FVIIa 複合体により活性化され二本鎖の活性型となる。プロテアーゼドメインにおける Arg145 及び Arg180 の限定的なタンパク質の分解、ならびに、そのタンパク質構造中に N-結合型糖鎖を 2 ヵ所有する 35 アミノ酸残基から成る活性化ペプチドの遊離により活性化が誘発される[3, 4]。活性化ペプチド自体は生物活性を有さないものと推測されている。続いて、FIXa は、補因子 FVIIIa ともに活性化血小板表面に集合し基質となる FX に対するタンパク質分解活性が強く増強される。このことは、血液凝固反応の伝播に不可欠なプロセスである（図 2.6.2-2）[5]。

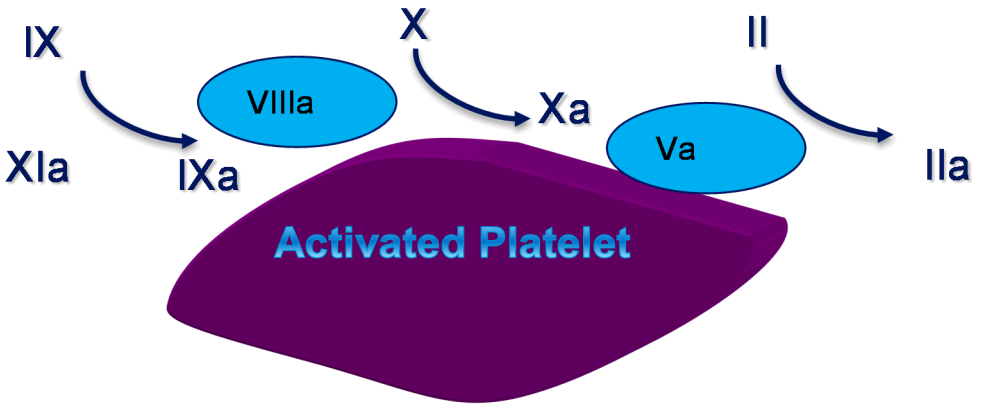


図 2.6.2-2　　FIX の作用機序

2.6.2.2.2　ノナコグ ベータ ペゴル

ノナコグ ベータ ペゴルは、40K PEG で修飾した遺伝子組換えヒト FIX である。中間体となる遺伝子組換え FIX（N9）は、ノボ ノルディスク社において CHO 細胞系 AAMP5 株を用いて製造している。PEG 化は酵素的修飾反応によるもので、rFIX の N-結合型糖鎖の末端シアル酸を、分岐構造を有する 40K PEG と結合したシアル酸で置換した。活性化ペプチド上には 2 箇所の PEG 化可能部位が存在する（Asn157 及び Asn167）。しかしながら、ノナコグ ベータ ペゴルの多く（約 80%）はそのうち一方のみが PEG 化（モノ PEG 化）されたものであり、それぞれの割合はほぼ同じである。PEG 化されなかった rFIX（[redacted]%）、モノ PEG 化 rFIX（[redacted]%）及び[redacted] *目的物質A （[redacted]%）それぞれの含有量は規格で管理される（Module 3.2.S.4.1 Specifications for Drug Substance 及び Module 3.2.P.5.1 Specifications for Drug Product 参照）。ノナコグ ベータ ペゴルには rFIX、モノ PEG 化 rFIX 及び *目的物質A が含有されるが、非臨床薬物動態／薬力学（PK/PD）試験により PEG の分布プロファイルが示されている。rFIX の活性化ペプチドにおける N-結合型糖鎖の存在部位を考慮すると、血管傷害部位における活性化の過程で、ノナコグ ベータ ペゴルは天然型と構造的及び機能的に同一な分子（rFIXa）に変換すると考えられる[6]。ノナコグ ベータ ペゴルの構造を図 2.6.2-3 に示す。

PEG などの疎水性ポリマー附加によるタンパク質の修飾は、タンパク質の循環血中からの消失半減期を延長させることにより PK プロファイルを改善するための手法として確立しているものである。PEG 化による血中循環の延長は、腎排泄及びタンパク質分解など各種消失過程の効率低下によるものと考えられている[7]。

ノナコグ ベータ ペゴルの機能特性に及ぼす PEG 化の影響は、種々の *in vitro* 及び *in vivo* 試験において検討した。

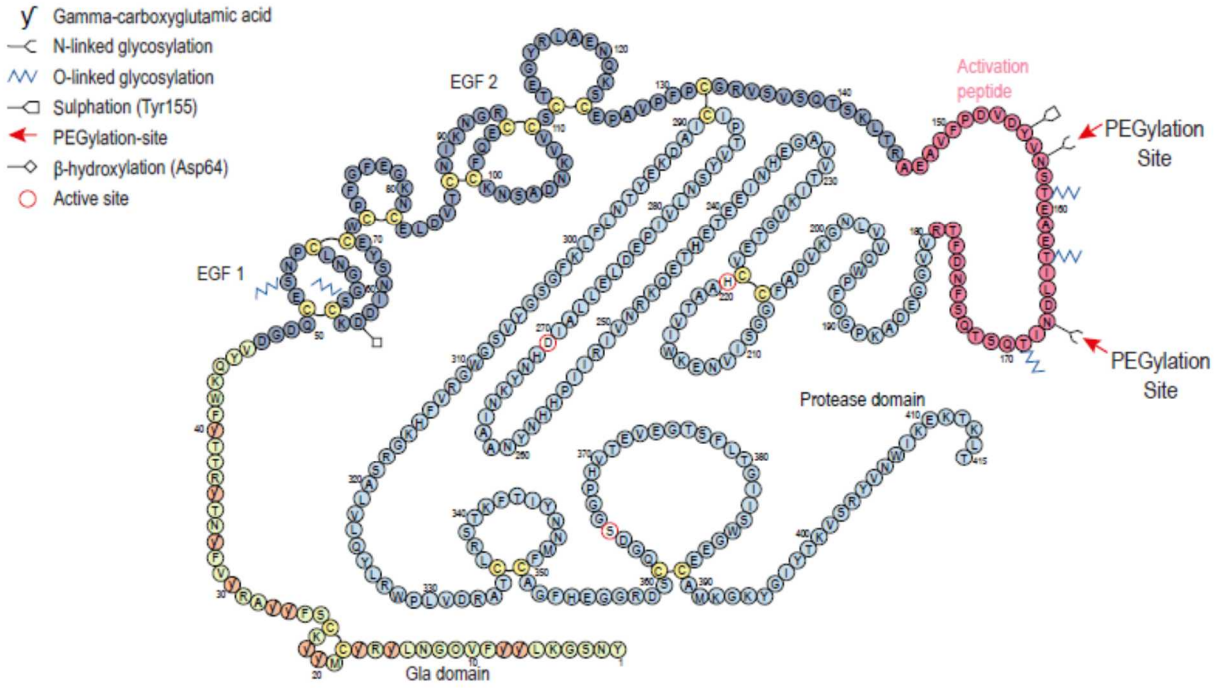


図 2.6.2-3　　ノナコグ ベータ ペゴルの構造

The two possible PEGylation sites (Asn157 and Asn167; N-glycans) on the activation peptide are shown.

2.6.2.2.3　*In vitro* 試験

FXIa で活性化されると、ノナコグ ベータ ペゴルは二本鎖の活性型分子となると同時に、35 アミノ酸残基から成る活性化ペプチドが遊離する（図 2.6.2-4）。ノナコグ ベータ ペゴル分子の 2 箇所の PEG 化 N-結合型糖鎖は、活性化ペプチド上に存在することから、40K PEG 分子はこの過程において遊離する。活性化後は活性化ペプチドの生物学的役割を終え、タンパク質分解系により分解され、リンカーと結合した PEG が循環血中に残る。

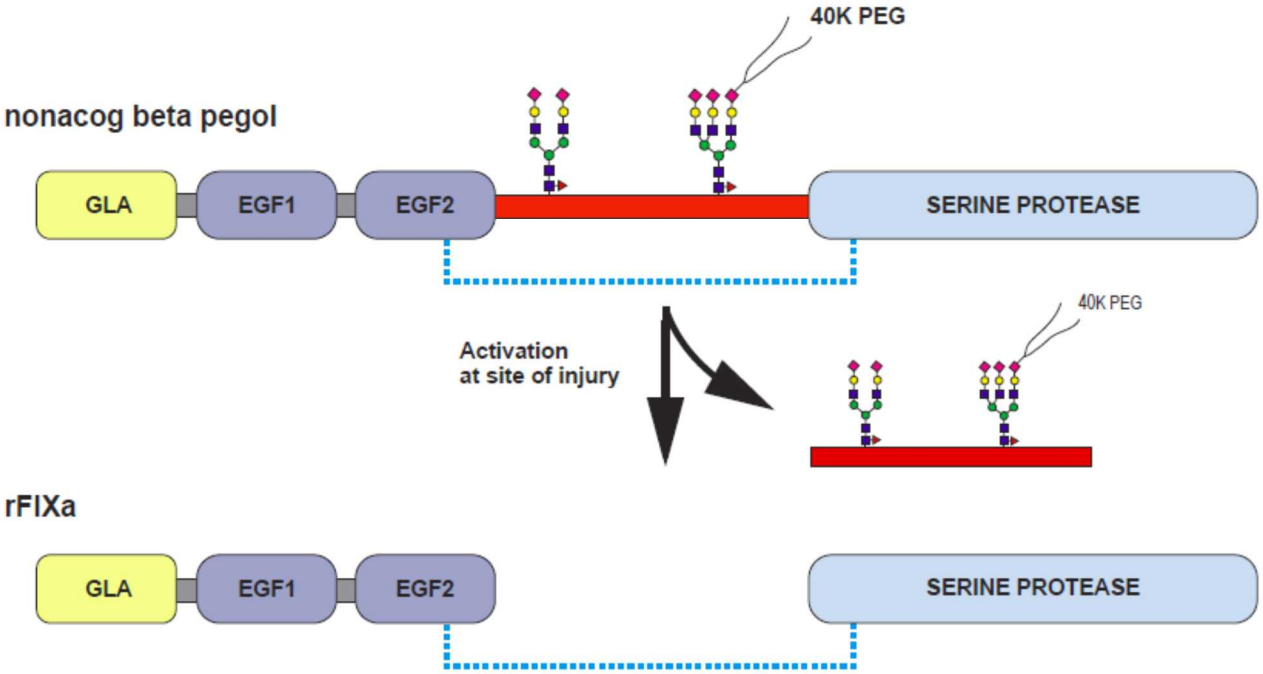


図 2.6.2-4　　ノナコグ ベータ ペゴルの活性化

2.6.2.2.3.1　40K PEG-rFIX の機能的 *in vitro* 特性解析：FXIa 及び TF/FVIIa 複合体による活性化（Module 2.6.3.2、試験番号 LCP080101）

［目的］

ノナコグ ベータ ペゴルの生理的 FIX 活性物質である FXIa 及び FVIIa による活性化を *in vitro* で検討した。

［試験方法］

ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の断片を、ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）で分析した。HEPES バッファー中で FIX（40K PEG-rFIX 又は BeneFIX®）に FXIa を添加し、FIX 活性化を誘発した。測定用試料は活性誘発前（0 分）ならびに誘発後 5、15、30、60 及び 120 分に採取した。また、FIX を FVIIa、可溶化 TF（sTF）及びホスファチジルセリン：ホスファチジルコリン（PS:PC）溶媒により活性化し、誘発前（0 分）ならびに誘発後 5、15、30、60、120、240 分及び 24 時間に測定用試料を採取した。試料、緩衝液及び希釈液を加温した後、泳動バッファーに MOPS を用い還元条件で SDS-PAGE に供した。電気泳動に引き続き 40K PEG-rFIX 含有ゲルを PEG 染色し撮影した。さらに、40K PEG-rFIX 含有ゲルを脱染色し、BeneFIX®含有ゲルと共にクマシーブルーで染色した。

［結果］

ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の断片を SDS-PAGE で分析した。その結果、それぞれ FIXa の重鎖及び軽鎖を示す 30 kDa 付近及び 22 kDa 付近の 2 つのバンドが、両製剤で同様に認められた。ノナコグ ベータ ペゴル活性化の過程で PEG 化ペプチドが遊離していることが、PEG 染色ゲルで認められた高分子側のバンドから明確に示された（図 2.6.2-5 の太い矢印）。

ノナコグ ベータ ペゴルの 150 kDa 付近のバンドの下に、弱いバンド（図 2.6.2-5 の細い矢印）が PEG 染色ゲル及びクマシーブルー染色ゲルの両方で認められた。このバンドは、Arg145 で特異的に切断された、活性化途中のノナコグ ベータ ペゴルであると考えられた。この構造は、FIX 活性化の途中で一時的に生成される $FIXa_{\alpha}$ に相当する。また、TF/FVIIa 複合体で活性化した時に認められた FIX の切断パターン（図 2.6.2-5）は、概して FXIa で活性化した時に認められたものと類似していた。

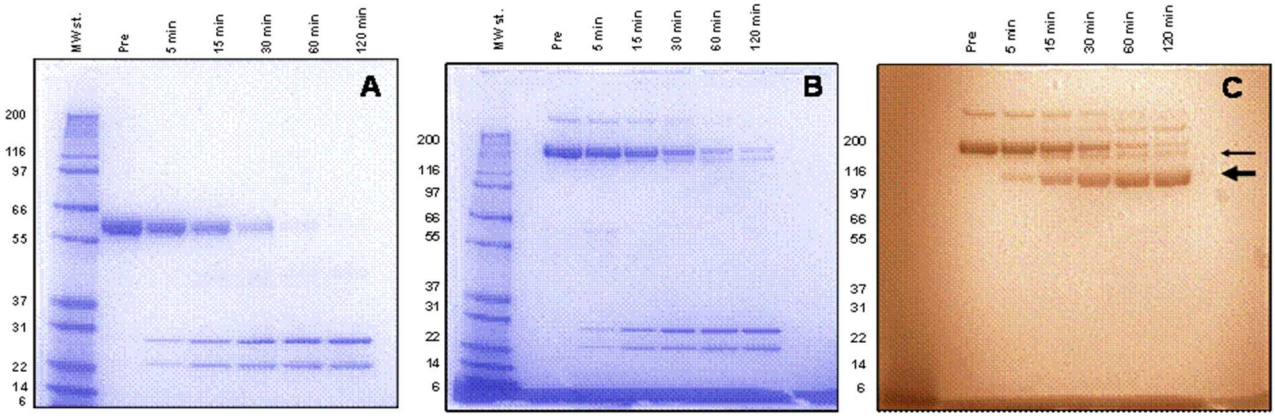


図 2.6.2-5　　ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の FXIa による活性化の経時変化

A) BeneFIX® (Coomassie blue staining) , B) nonacog beta pegol (Coomassie blue staining), C) nonacog beta pegol (PEG staining). Bold arrow: PEGylated activation peptide. Slim arrow: PEGylated $rFIXa_{\alpha}$.

［結論］

結論として、FXIa 又は TF/FVIIa 複合体による活性化で、ノナコグ ベータ ペゴルは、活性化 rFIX（BeneFIX®）と同じ分子サイズの二本鎖分子に変換され、40 kDa の PEG 化活性化ペプチドを遊離することが PEG 染色ゲルにより視覚的に示された。

2.6.2.2.3.2　生理的 FIX 活性物質である FXIa 及び TF/FVIIa 複合体によるノナコグ ベータ ペゴル活性（Module 2.6.3.2、試験番号 HQSG141101）及び FIXa/FVIIIa 複合体に触媒された FX 活性化における FIXa の特性解析（Module 2.6.3.2、試験番号 KFSQ141101）

［目的］

血液凝固過程における各反応を個別に評価するため、ノナコグ ベータ ペゴル、PEG 化する前の中間体である rFIX（N9）及び BeneFIX®の活性化速度を、FXIa 又は TF/FVIIa 複合体（組織因子／リン脂質混合物を rFVIIa で飽和したもの）存在下で、アミド分解測定法により測定した（試験番号 HQSG141101）。

さらに、活性化したノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9 の機能特性を比較するため、これらを FXIa で活性化した FIXa とトロンビンで活性化した FVIIIa の組み合わせによるテナーゼ（FIXa/FVIIIa）複合体をリン脂質表面で反応させた。これらの複合体による FX の FXa への転換をアミド分解活性により測定した（試験番号 KFSQ141101）。

［方法］

5～200 nmol/L の各種濃度の FIX（ノナコグ ベータ ペゴル、N9 又は BeneFIX®）に、FXIa 又は FVIIa ならびに組織因子／リン脂質混合物（Innovin®）を HEPES 緩衝液中で添加し、活性化を誘導した。30 分後に測定用試料（n=3）を反応停止用の EDTA 緩衝液を加えたウェル型のマイクロタイタープレートに移し、活性化反応を停止させた。測定試料を活性測定基質（Spectrozyme®）と混合し、マイクロプレートリーダー（SpectraMax®）を用いて 405 nm の波長幅で FIXa 活性を測定した。

本活性測定と同条件の緩衝液を用い既知の FIXa 濃度で作成した検量線を用い、アミド分解活性の測定値を FIXa モル濃度単位に変換した。医療統計解析プログラム（GraphPad Prism 6）を用い、反応曲線をミカリエス・メンテン式にフィッティングし、反応速度パラメータである K_m 及び k_{cat} を非線形最小二乗法により求めた（試験番号 HQSG141101）。

活性化されたノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9 に対する FVIIIa の結合を、PS:PC (25:75) 溶媒及び FX 存在下で FIXa を FVIIIa でタイトレーションし解析した。30 分間インキュベーションした後 EDTA により反応を停止させ、アミド分解活性から FXa 生成反応の初期速度を推察した。1:1 の結合等温式をデータにフィッティングした。ミカリエス・メンテン式から FX 活性化の初期速度を求めた（試験番号 KFSQ141101）。

［結果］

図 2.6.2-6A に示した通り、FXIa によるノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX® 及び N9 の活性化反応の速度定数はほぼ同じであった（表 2.6.2-2）。これとは対照的に、TF/FVIIa 複合体によるノナコグ ベータ ペゴルの触媒効率（k_{cat}/Km）は PEG 化されていない rFIX の 45～50%まで低下しており（図 2.6.2-6B）、主として Km 値が 74±3 から 122±10 nmol/L に増加したことに起因するものであった。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 ペゴルによっても生成した。また、血友病 B 患者（2.6.2.3.3）の全血と薬効薬理試験（2.6.2.2.5）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（試験番号 HQSG141101）。

複数濃度の FVIIIa で測定を行い、FVIIIa／リン脂質混合物との相互作用の反応速度からみかけの解離定数（$K_{1/2,\ FVIIIa}$）を推定したところ、ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9 の間に差異は認められなかった（図 2.6.2-6C）。また、これら 3 つの化合物はいずれも FX 活性を触媒し、リン脂質及び飽

和量の FVIIIa 存在下における FX 活性化の反応速度に明確な差異は認められなかった（図 2.6.2-6D 及び表 2.6.2-2）（試験番号 KFSQ141101）。

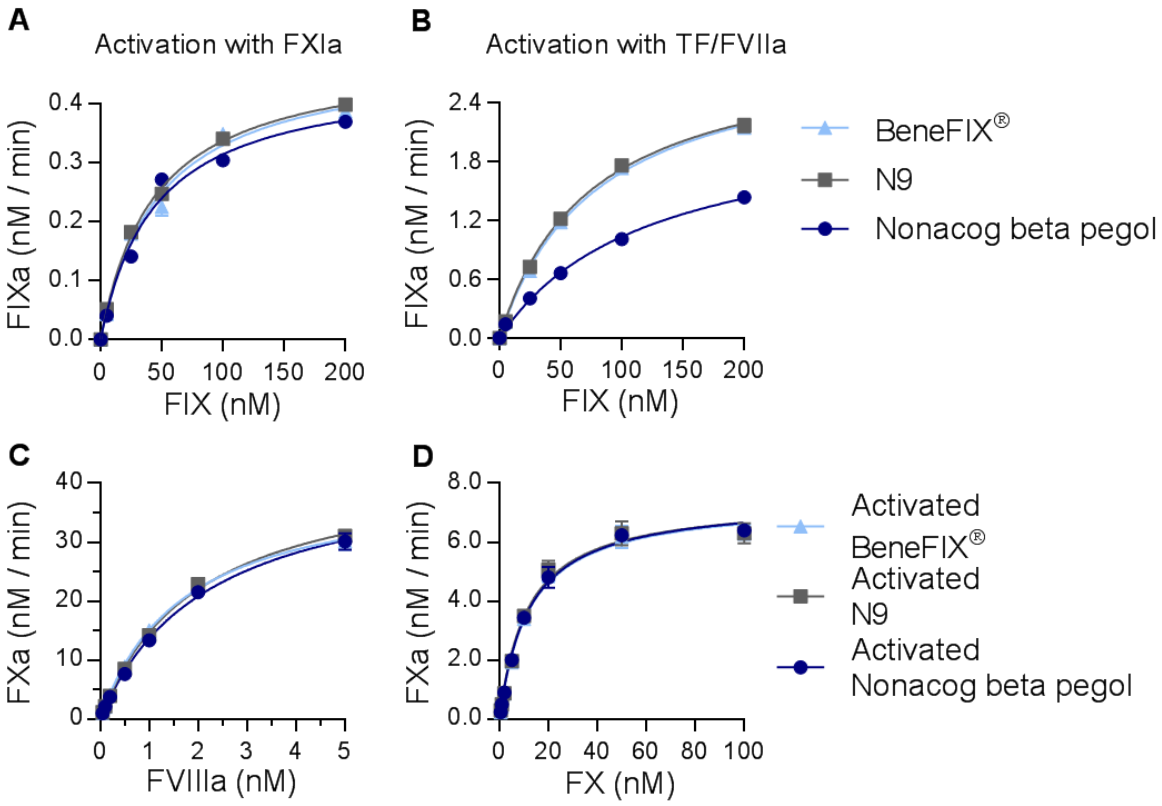


図 2.6.2-6　ノナコグ ベータ ペゴルと rFIX（BeneFIX®又は N9）の活性及び機能特性の比較

(A) Activation with FXIa of nonacog beta pegol, BeneFIX®, or N9; B) Activation with TF/FVIIa of nonacog beta pegol, BeneFIX®, or N9 (un-PEGylated rFIX intermediate); 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.

表 2.6.2-2　　酵素反応速度パラメータ

Enzyme	Cofactor	Substrate	K_m(nM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$) x 10^6
FXIa	-	N9	45 ± 2	0.81 ± 0.01	18 ± 1
FXIa	-	Nonacog beta pegol	46 ± 6	0.76 ± 0.03	17 ± 2
FXIa	-	BeneFIX®	48 ± 5	0.81 ± 0.03	17 ± 2
FVIIa	TF/PS:PC	N9	74 ± 3	0.50 ± 0.01	6.7 ± 0.2
FVIIa	TF/PS:PC	Nonacog beta pegol	122 ± 10	0.38 ± 0.02	3.1 ± 0.1
FVIIa	TF/PS:PC	BeneFIX®	80 ± 5	0.51 ± 0.02	6.3 ± 0.5
N9a	FVIIIa/PS:PS	FX	11.5 ± 0.9	8.5 ± 0.2	N.C.
[nonacog beta pegol]a	FVIIIa/PS:PC	FX	12.3 ± 1.0	9.0 ± 0.2	N.C
[BeneFIX]a	FVIIIa/PS:PC	FX	12.2 ± 1.0	8.3 ± 0.2	N.C.

N9a, [nonacog beta pegol]a and [BeneFIX]a denote activated N9 and nonacog beta pegol ,BeneFIX® respectively. N.C. not calculated.

［結論］

ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9 は FXIa により同様の速度で活性化されることから、FXIa による活性は PEG 化による影響を受けず、ノナコグ ベータ ペゴルの TF/FVIIa 複合体活性化の減退は主として Km の増加によるものと考えられた。活性化後のノナコグ ベータ ペゴルの機能的特性は BeneFIX®と同様であった。

2.6.2.2.3.3　トロンボエラストグラフィー

2.6.2.2.3.3.1　トロンボエラストグラフィーによる血友病 B 患者血中でのノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性比較（Module 2.6.3.2、試験番号 MSGC080301）

［目的］

ノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性を、8 人の血友病 B 患者から採取した全血中でトロンボエラストグラフィー法（TEG）を用いて評価した。

［方法］

合計 8 人の血友病 B 患者の血液を試験に供した。うち 5 人の患者は重症のフェノタイプ（血漿中 FIX が 1%未満）であり、3 人が中等症のフェノタイプ（血漿中 FIX が 1～5%）であった。各患者から 1 回、最小限の駆血と円滑な静脈穿刺により血液試料を採取した。ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®を血液試料に添加し、カオリンを添加して止血栓形成を惹起した。TEG には TEG 5000（Haemoscope Corporation 社、Niles, Illinois、米国）を用いた。FIXa を阻害した上でノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®それぞれにつき 8 用量を添加し、血液凝固能の用量反応性を検討した。

両剤の比較を 0.08～76 nmol/L の濃度範囲で行い、R（凝固速度）、MA（最大強度）及び MTG（最大速度）に関して統計解析を行った。

［結果］

ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の 28 nmol/L 添加前後の代表的なトロンボエラストグラムを図 2.6.2-7 に示す。2 つの曲線が重ね合わせられることから、両製剤は同様に止血栓形成を改善することが示された。

ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を 0.08～76 nmol/L までの濃度で添加したところ、最初の止血栓形成までの時間〔凝固速度（R）〕の濃度依存的な短縮及び止血栓形成の最大速度（MTG）の濃度依存的な増加がみとめられ、最高濃度では正常値域に達した（図 2.6.2-7B 及び C）。同様に、R 値、MTG 値及び MA 値に基づくノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の EC_{50} には有意な差が認められず、両剤は同程度の効力を有することが示された（表 2.6.2-3）。

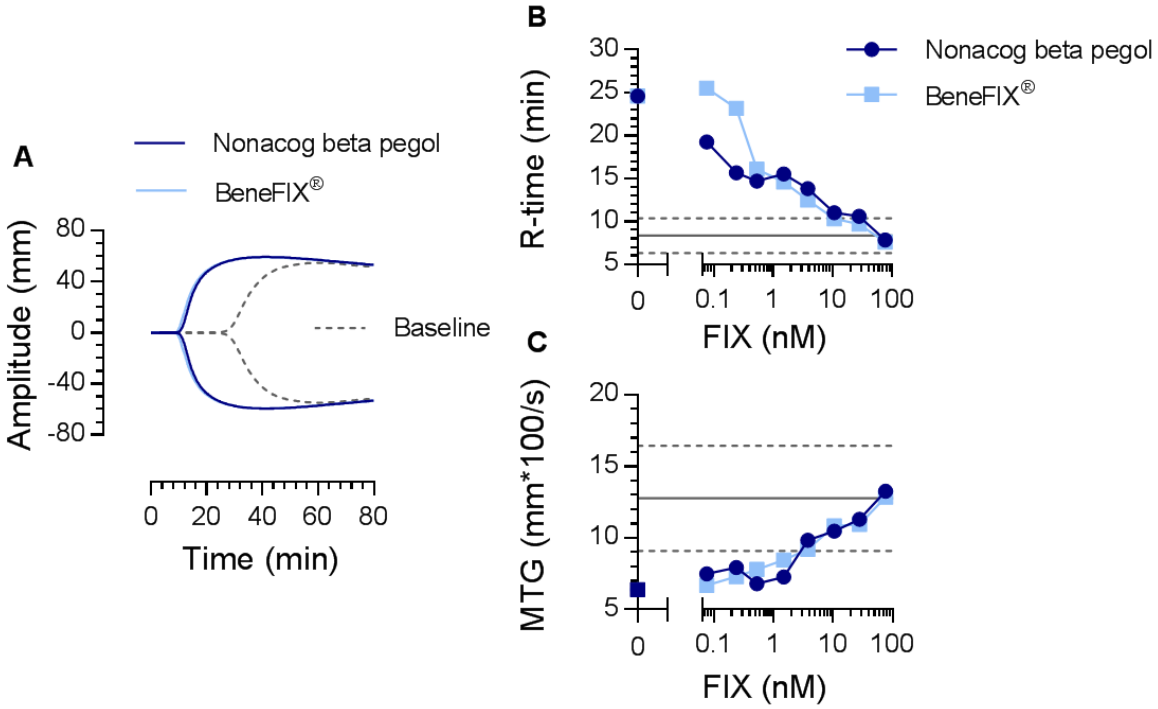


図 2.6.2-7　血友病 B 患者全血中におけるノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の活性比較

(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) R-time and (C) 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.

表 2.6.2-3　　血友病 B 患者の全血を用いた TEG の測定結果

	Mean Pre-spiking [95%CI]	**Nonacog beta pegol [95%CI]**	**BeneFIX® Max conc [95%CI]**	**EC_{50} ratio (BeneFIX®/ Nonacog beta pegol) [95%CI]**
R-time (s)	1178 [820-1536]	532 [447-616]	494 [450-538]	0.9 [0.4-2.3]
MTG (x 100 mm/s)	7.0 [5.5-8.5]	10.6 [8.7-12.4]	11.0 [9.1-12.9]	0.7 [0.4-1.2]
MA (mm)	47.9 [41.7-54.1]	53.7 [48.2-59.3]	53.9 [48.7-59.2]	1.2 [0.4-3.5]

Mean pre-spiking values and values of R-time, MTG, and MA in whole blood samples (N=8) spiked with the highest tested concentration (max conc) of nonacog beta pegol or BeneFIX® (76 nM).

［結論］

結論として、ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を添加した血友病 B 患者血液の TEG の測定結果から、両剤は同程度の活性を有することが示された。

2.6.2.2.3.4　トロンビン生成試験

2.6.2.2.3.4.1　TF（Module 2.6.3.2、試験番号 ELW130401）又は FXIa（Module 2.6.3.2、試験番号 ELW130901）で誘発したノナコグ ベータ ペゴル及び N9 によるトロンビン生成の特性検討

［目的］

N9 又はノナコグ ベータ ペゴルを添加した、新鮮凍結正常ヒト血漿（NHP）及び重症血友病 B 患者から採取した市販品の FIX 欠乏血漿を用いて、トロンビン生成の特性評価を行った。

［方法］

血友病 B 血漿に 0.13～130%（SynthAFax を aPTT 試薬に用いた凝固一段法で求めた、1 IU/mL を 100%とした）の濃度で添加し、ノナコグ ベータ ペゴル及び N9 の FIX 欠乏患者の血漿中における活性をトロンビン生成測定法（TGA）により検討した。TF 又は FXIa 添加による活性化後に、蛍光トロンビン基質を用いてトロンビン生成量を測定した。

［結果］

TF で誘発した時の代表的な TGA プロファイルを図 2.6.2-8 に示す。最大トロンビン生成時間に差は認められなかったが、最大トロンビン生成量には濃度依存性が認められた。しかしながら、N9 と比較しノナコグ ベータ ペゴルの最大トロンビン生成量は少なく、図 2.6.2-6 に示した TF/FVIIa 複合体で誘発した時の活性化動態と一致するものであった。

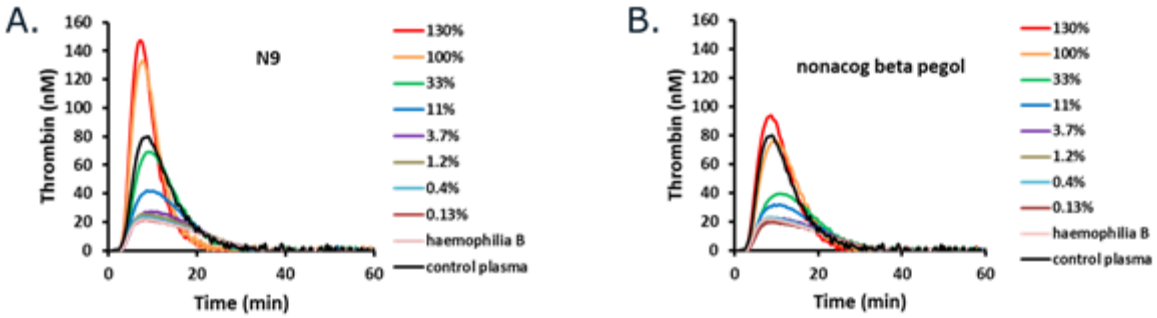


図 2.6.2-8　　TF 誘発時の N9 (A)及びノナコグ ベータ ペゴル(B)によるトロンビン生成反応（ELW130401）

FXIa で誘発した時の代表的な TGA プロファイルを図 2.6.2-9 に示す。最大トロンビン生成時間及び最大トロンビン生成量に関して、N9 とノナコグ ベータ ペゴルで同様の濃度依存的な影響が認められ、FXIa で誘発した場合には N9 とノナコグ ベータ ペゴルは同程度の量のトロンビンを生成させることが示唆された。

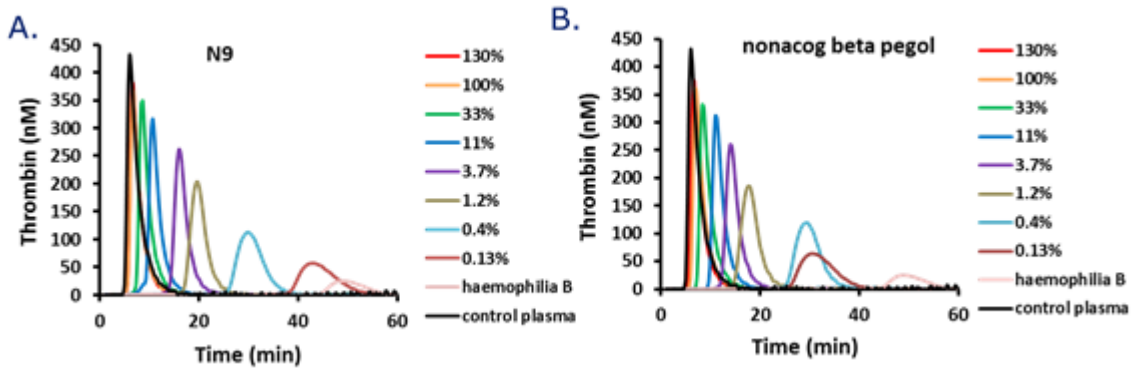


図 2.6.2-9　　FXIa 誘発時の N9 (A)及びノナコグ ベータ ペゴル(B)によるトロンビン生成反応（試験番号 ELW130901）

［結論］

FIX 欠乏血液を用いた TEG 及び FIX 欠乏血漿を用いた TGA のいずれにおいても、ノナコグ ベータ ペゴルは BeneFIX®又は N9 と同程度の活性を示した。しかしながら、TF で誘発した時の TGA では、N9 と比較しノナコグ ベータ ペゴルによるトロンビン生成量はやや少なかった。

2.6.2.2.4　ノナコグ ベータ ペゴルの *in vitro* 薬理試験のまとめ

PEG 化はノナコグ ベータ ペゴルの生物活性に明確な影響を及ぼさないことが *in vitro* 試験の結果から明らかとなり、動物試験（2.6.2.2.5）においても支持された。ノナコグ ベータ ペゴルの凝固一段法による活性測定で大きな変動が認められたが、これは PEG の aPTT 試薬に対する特異的な相互作用に

よるものであった。したがって、非 PEG 化タンパク質で観察されたものに近い結果が得られた aPTT 試薬を用いた結果がノナコグ ベータ ペゴルの活性を正確に反映しているものと考えられた。この要件を満たす試薬が SynthAFax であったことから、これを力価決定及び臨床試験で用いる凝固一段法で使用する試薬として選択した。ノナコグ ベータ ペゴルの力価は、SynthAFax を aPTT 試薬として FIX 濃縮製剤に対する第 4 回国際標準品に対する相対値を測定し、ノナコグ ベータ ペゴルの 1 単位（U）は FIX の 1 国際単位（IU）に相当するように設定した。

2.6.2.2.5 *In vivo* 試験

F9-KO マウス及び血友病 B イヌはヒト FIX 製剤及び FIX アナログ製剤の止血効果を評価する動物モデルとして汎用されている[8]。ノナコグ ベータ ペゴルの止血特性を検討するために、F9-KO マウスの尾出血モデル、塩化鉄損傷モデル及び針穿孔膝損傷モデルといった 3 種の損傷モデルを使用した。また、血友病 B イヌでは、被験物質投与後に TEG 及び全血凝固時間（WBCT）を *ex vivo* で評価した。

2.6.2.2.5.1 血友病 B マウスの出血に対するノナコグ ベータ ペゴルの効果の用量反応性の BeneFIX® との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 TELM080903）

［目的］

F9-KO マウスの尾出血モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの止血能を BeneFIX®と比較した。

［方法］

マウスをペントバルビタールで麻酔し、溶媒投与群〔F9-KO マウス及び C57BL/6 マウス（Taconic M&B 社、デンマーク）それぞれの対照群、n=7／性／群〕又はノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX® の 0.01、0.1、0.2、0.4、0.75 mg/kg 投与群（F9-KO マウスのみ、n=3 又は 6／性／群）に静脈内投与した。被験物質投与後 5 分に尾先端から 4 mm を切断し出血させ、30 分間出血時間を観察した。出血時間は、観察期間内におけるすべての出血エピソードに関する時間の総和とした。出血量は生理食塩液中のヘモグロビン濃度として測定した。測定用チューブを遠心し、ヘモグロビン試薬で希釈した後、550 nm における吸光度を吸光度計測器で測定した。吸光度からヘモグロビン量（nmol）への変換は、ヒトヘモグロビンで作成した標準曲線を利用した。出血時間観察及び血液試料採取を終了後、供試動物を過量のペントバルビタールで安楽死処置した。

［結果］

溶媒投与 F9-KO マウス（血友病 B）では、野生型の C57BL/6 マウス（正常止血機能）と比較し、出血時間及び出血量ともに有意な増加を示した。一方、ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®は、0.01 mg/kg では効果が認められなかったが、それより高い用量では明確な用量相関性が認められ、0.4 mg/kg で最大効果に達し、出血時間及び出血量とも正常値に復した。中間用量群である 0.1 及び 0.2 mg/kg では部分的な効果が認められた（図 2.6.2-10）。

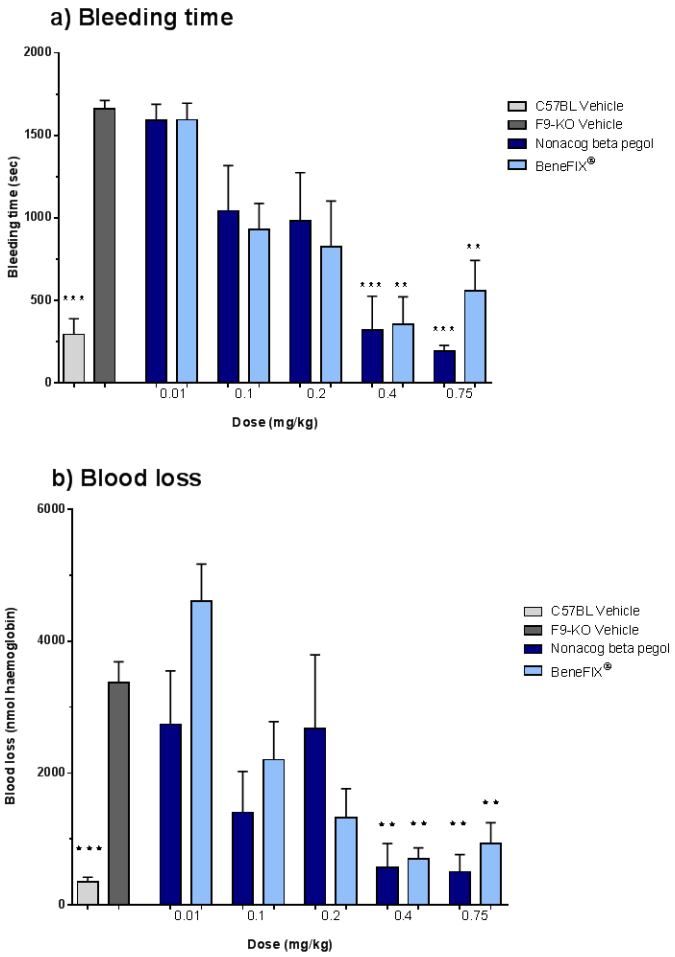


図 2.6.2-10　　F9-KO マウスにおける出血時間及び出血量に対する効果の用量反応性

I.v. injections of nonacog beta pegol or BeneFIX® was given 5 minutes before induction of bleeding by cutting a 4 mm tip of the tail. Results are shown as mean ± SEM (n=6-14) for each group of animals treated with nonacog beta pegol (■) and BeneFIX® (■) at the doses indicated. F9-KO (■) mice and C57BL/6 (■) mice were administered vehicle representing haemophilia B or a normal haemostatic condition, respectively. $p<0.01$ (**) and $p<0.001$ (***) compared to F9-KO vehicle.

An inverse sigmoidal dose response equation was fitted to the data. For bleeding time, the ED_{50} values were estimated to 0.10 mg/kg and 0.11 mg/kg for nonacog beta pegol and BeneFIX®, respectively (P=0.85, non parametric test Kruskal-Wallis including Dunn's post test). For blood loss, the corresponding ED_{50} values were 0.16 mg/kg and 0.12 mg/kg, respectively (P=0.70, parametric one way ANOVA and Bonferroni's post test).

［結論］

本試験の結果、F9-KO マウス尾先端切断術後急性期における、ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の出血時間及び出血量を指標とした用量反応性に差異は認められなかった。

2.6.2.2.5.2　血友病 B マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴルの効果持続時間の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 TELM081202）

［目的］

血友病 B マウス尾出血モデルを用いて、ノナコグ ベータ ペゴルの効果持続時間を BeneFIX®と比較した。

［方法］

マウスをペントバルビタールで麻酔し、ランダムに群分けし、溶媒投与群（F9-KO マウス及び C57BL/6 マウス、Taconic M&B 社、デンマーク）それぞれの対照群（n=7／性／群）に溶媒を、ノナコグ ベータ ペゴル投与群（F9-KO マウス、n=36／性／群）又は BeneFIX®投与群（F9-KO マウス、n=24／性／群）にノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を各 0.75 mg/kg の用量で静脈内投与した。被験物質投与後 5 分（全対照群動物ならびにノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®投与動物から 4 又は 8 匹／性）ならびに 1、2、3 及び 5 日（ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®投与動物から 4 又は 8 匹／性）に尾出血を誘発し、出血時間及び出血量を測定した。試験群の設定及び複数時点で測定を実施したこと以外の試験方法は、出血時間及び出血量の測定を含め、前述した TELM080903 試験と同じ手順を用いた。

［結果］

TELM080903 試験でも示された通り、急性期の止血は両剤により正常化された。ノナコグ ベータ ペゴル投与群では投与後 3 日間、止血の正常化が維持された。一方、BeneFIX®投与群では投与後 1 日で出血の増加が認められた。投与後 2 及び 3 日において、ノナコグ ベータ ペゴル投与群と BeneFIX®投与群の出血時間に統計学的に有意な差が認められた。BeneFIX®投与群における出血は、投与後 2 日において F9-KO マウス溶媒投与群と同程度となった一方で、ノナコグ ベータ ペゴル投与群が同程度に戻ったのは投与後 5 日であった（図 2.6.2-11）。

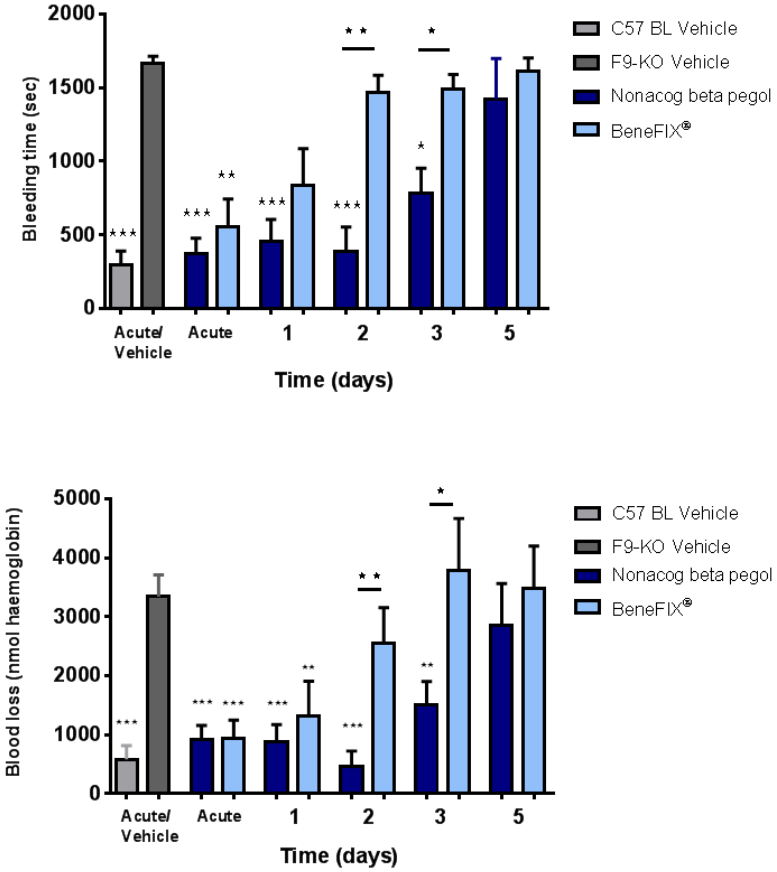


図 2.6.2-11　　F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®（0.75 mg/kg）の効果持続時間

Bleeding time (a) and blood loss (b) 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/6 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.

［結論］

急性期の止血は両剤により正常化された。ノナコグ ベータ ペゴル投与群では投与後 3 日間、止血の正常化が維持された。一方、BeneFIX®投与群では投与後 1 日で出血の増加が認められた。投与後 2 及び 3 日において、ノナコグ ベータ ペゴル投与群と BeneFIX®投与群の出血時間に統計学的に有意な差が認められた。本試験結果は、ノナコグ ベータ ペゴルは既存品である BeneFIX®よりも作用の持続時間が長いことを示すものであった。

2.6.2.2.5.3　F9-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの効果持続時間の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 FLMQ081104）

［目的］

F9-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルを用いて、ノナコグ ベータ ペゴルの効果持続時間を BeneFIX®と比較した。

［方法］

マウスをケタミン、キシラジン及びアトロピンの生理食塩液混合物で麻酔し、体側頸静脈を露出させ、被験物質又は溶媒投与のためのカテーテルを装着した。引き続き頸動脈を露出させ、10%塩化鉄溶液に浸したフィルターペーパーを 3 分間当てることにより血管損傷を惹起した。

塩化鉄誘発損傷は、F9-KO マウス（Taconic M&B 社、デンマーク）にノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を 0.75 mg/kg 静脈内投与後、5 分（急性期）ならびに、1、2、3、4 及び 5 日に惹起した。塩化鉄浸潤フィルターペーパーを除去してから 25 分間又は損傷動脈の血管閉塞まで超音波測定による血流を記録した。血管閉塞が認められなかった場合、データ上の血管閉塞時間は 25 分として取り扱った。

［結果］

投与後 5 分からの観察では、ノナコグ ベータ ペゴル投与マウス（n=6～10／群）又は BeneFIX®投与マウス（n=8～11／群）のいずれにおいても頸動脈閉塞が認められた。投与後 1～5 日の観察では、ノナコグ ベータ ペゴル投与マウスにおける平均血管閉塞時間は溶媒投与群（n=6）よりも有意に短かったが、BeneFIX®投与群では投与 1 及び 2 日においてのみ短かった。ノナコグ ベータ ペゴル投与群では、投与後 1～4 日に 90～100%の動物で血管閉塞が認められたが、BeneFIX®投与群では投与後 1 日で 70%の動物でのみ血管閉塞が認められ、投与後 4 日では 44%まで減少した。投与後 5 日においては、ノナコグ ベータ ペゴル投与群の 56%で依然として血管閉塞が認められた一方で、BeneFIX®投与群では僅かに 13%であった。したがって、投与後 3、4 及び 5 日において、ノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®の F9-KO マウスにおける平均血管閉塞時間に有意な差が認められた（図 2.6.2-12）。

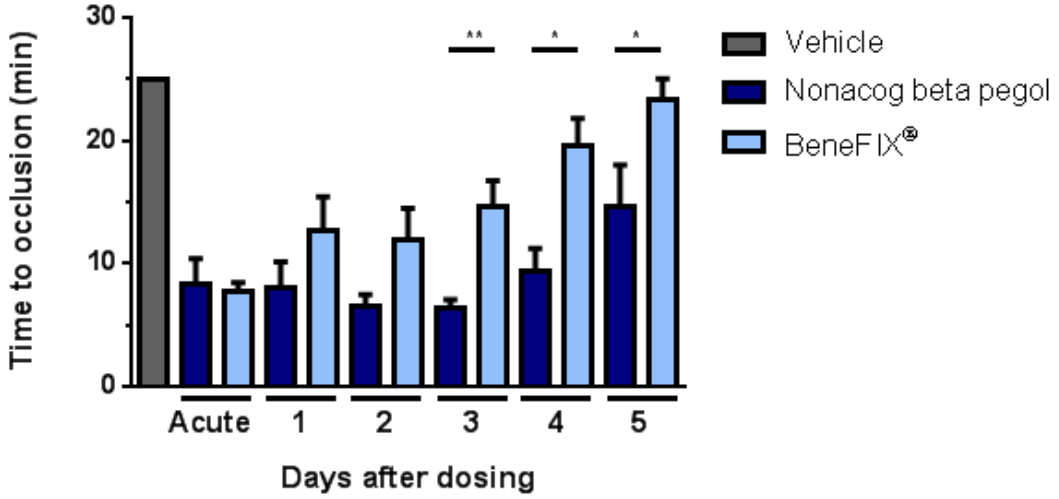


図 2.6.2-12　F9-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX® の効果持続時間

Bar graphs showing the mean time to occlusion after $FeCl_3$ induced injury 5 min (acute effect), 1, 2, 3, 4, and 5 days after dosing of 0.75 mg/kg nonacog beta pegol or BeneFIX®, or vehicle. Mean and SEM of 6-11 mice per group are shown. The occlusion time in the vehicle group was arbitrarily set at 25 min. Time to occlusion between the different groups was compared using Kruskal-Wallis test including Dunn's post test. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$.

［結論］

F9-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおいて、ノナコグ ベータ ペゴルは BeneFIX®よりも止血作用の持続時間が有意に長かった。

2.6.2.2.5.4　F9-KO マウス膝関節損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの作用の BeneFIX®との比較（Module 2.6.3.2、試験番号 MiE120301）

［目的］

F9-KO マウスの膝関節損傷モデルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの効果を非修飾型の FIX 製剤と比較するため、関節血症誘発後 2 週間に、Valentino らの滑膜炎診断スコアによる評価を行った。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。

［方法］

試験 0 日：F9-KO マウス（North Carolina 大学、米国）をイソフルラン／O_2 混合物により麻酔した。膝蓋骨被覆部の一部（0.5 mm 未満）を皮膚切開し、30.5G 針を装着したハミルトンシリンジを用いて膝関節内出血を誘発した。損傷誘発後には無痛処置を施した。関節血症誘発後 20 分に、F9-KO マウスに 0.9%塩化ナトリウムの 150 µL 及びノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の 250 IU/kg を静脈内投与した。また、野生型の C57BL/6 マウス（Jackson Laboratory 社、米国）に対しては、0.9%塩化ナトリウムの 150 µL を静脈内投与した。

出血誘発から安楽死処置し組織試料を採取するまでの 2 週間の間に FIX 製剤投与を行い、ノナコグ ベータ ペゴル投与群では試験 0 及び 7 日の 2 回投与、BeneFIX®投与群では試験 0 及び 7 日の 2 回投与、試験 0、1 及び 3 日の 3 回投与もしくは試験 0、1、3、5、7、9、11 及び 13 日の 8 回投与を行った。全てのマウスは試験 14 日に安楽死処置し、病理組織学的検査に供した。

針穿孔誘発損傷後 2 週間における病理組織学的検査に基づくグレーディングシステムが確立されており[9]、関節のスコアは（i）滑膜過形成、（ii）血管分布、（iii）ヘモジデリンによる退色、（iv）血液（赤血球）の有無、（v）絨毛形成及び（vi）軟骨びらん、といった 6 つの特徴的な変化から構成される（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4　　針穿孔誘発膝損傷モデルにおける滑膜炎スコア

Mouse Strain	**Mean synovitis score after bleed**	**Synovitis score >2**
C57BL/6 (normal haemostatic system)	0.14 ± 0.3	0%
F9-KO (haemophilia B)	4.4 ± 2.0	96%

The grading system 1-10: Synovial hyperplasia and vascularity were present in variable amounts and quantitatively scored (0-3), while the other changes (discolouration, blood, villus, and cartilage erosion) qualitatively scored as absent or present (0 or 1).

本試験に用いた動物モデルにおいて、止血に有効な用量の rFIX を損傷時に単回投与しても、損傷を受けた血友病様関節の滑膜炎スコアは正常化しないことが、過去の試験において示されている[10]。本試験では、F9-KO マウスに対しノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®を損傷誘発後 20 分に単回又は反復静脈内投与し、損傷誘発後 14 日における効果を比較した。

［結果］

ノナコグ ベータ ペゴルの 250 IU/kg を単回投与した結果、滑膜炎スコアは 1.76±0.35 となり、BeneFIX®の 250 IU/kg の単回投与時のスコアである 3.77±0.55 よりも有意に（p=0.009）低値を示した。BeneFIX®の投与回数を 3 回、8 回と増やすにつれ、滑膜炎スコアはそれぞれ 2.45±0.56、2.12±0.30 と改善した。これらのスコアとノナコグ ベータ ペゴルの単回又は 2 回投与時のスコアに差異は認められなかった。なお、BeneFIX®の 8 回投与時のスコアは単回投与時のスコアに比較し有意な（p=0.015）改善が認められている（図 2.6.2-13）。

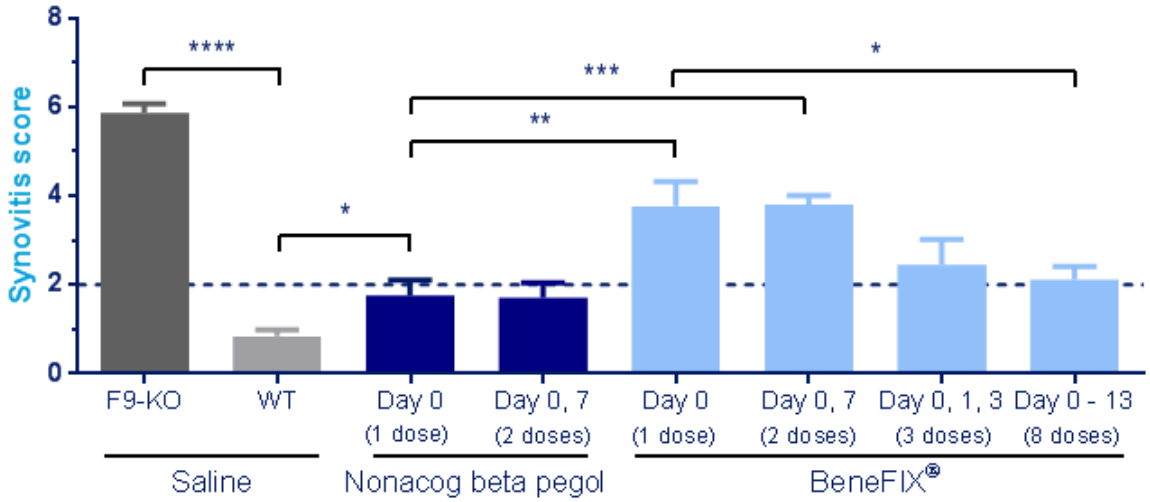


図 2.6.2-13　　ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®投与後の F9-KO マウスにおける滑膜炎スコア

Synovitis score 14 days after haemarthrosis induction in F9-KO mice treated with nonacog beta pegol or BeneFIX®. Each dose contained 250 IU/kg of nonacog beta pegol or BeneFIX®, and the first dose was given 20 minutes after induction of haemarthrosis. The following doses were given on the day(s) specified; the eight doses were given days 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13. F9-KO mice and C57BL/6 mice representing haemophilia B and a normal haemostatic condition, respectively, received a dose of saline. Experimental groups comprised six to eight mice. The effect of a single dose of nonacog beta pegol was significantly superior to the effect of a single dose of BeneFIX®. The dashed horizontal line indicates synovitis score of 2; when evaluated 14 days after induction of injury, 96% of untreated F9-KO mice score above that level. Mean ± SEM. * P< 0.05, ** P< 0.01, *** P< 0.001, and **** P< 0.0001.

［結論］

ノナコグ ベータ ペゴルの 250 IU/kg 単回投与時の効果は、同用量の BeneFIX®.の単回投与時よりも有意に優れていた。

2.6.2.2.5.5　血友病 B イヌにおけるヒト FIX 製剤の薬力学的作用（Module 2.6.3.2、試験番号 MIE080701）

［目的］

レトロウイルスベクターを利用した新生児期の遺伝子導入により、ヒト FIX に免疫寛容を示す先天性血友病 B イヌ 1 頭を用い、ノナコグ ベータ ペゴルの薬力学的作用を、クロスオーバーデザインにより BeneFIX®と比較した。

［方法］

ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®を、0.4 mg/kg の用量で 3 頭の血友病 B イヌに静脈内投与し、0（投与前）、投与後 5、15 及び 30 分、1、2、3、4、6、8、12、24、48、72、96 及び 120 時間ならびに投与後 168 時間以降毎週月、水及び金曜日に、被験物質の活性が認められなくなるまで採血を行った。3 頭のうち 1 頭はヒト FIX に免疫寛容を示すことから、30 日を超えても抗体形成を認めることなく両製剤の投与が可能であった。残りの 2 頭はヒト FIX naïve であり、ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を抗体形成が認められるまで（14 日未満）投与した。薬力学的プロファイルを WBCT 及び

TEG により測定した。WBCT は試験管を 2 本使用した。1 本目を 1 分間インキュベートした後 30 秒毎に傾け、止血栓が形成されたら 2 本目を傾け、30 秒毎に観察を行った。評価項目は 2 本目の試験管における止血栓形成とした。TEG は、採血後 2 分以内に、カオリンにより活性を誘発し、Thromboelastograph Analyzer を用いて測定した。

［結果］

BeneFIX® 投与後 5 分において WBCT の正常化が認められ、投与後 4 日間正常値を示し、その後徐々に回復性を示し、投与後 12 日には投与前値に復した（図 2.6.2-14）。ノナコグ ベータ ペゴル投与群における凝固時間でも同様の正常化が認められたが、本剤の特性である消失速度の低下に伴い、投与後 12～19 日においても WBCT は正常値を示し、その後緩徐な回復性を示し、投与後 45 日において投与前値に復した。FIX を定量的に評価するのにより精度が高い TEG においても同様のパターンが観察された（図 2.6.2-15）。止血栓形成は投与後 26 日まで正常化が認められ、その後 R 値及びアングル（α°）は投与前値に復した。

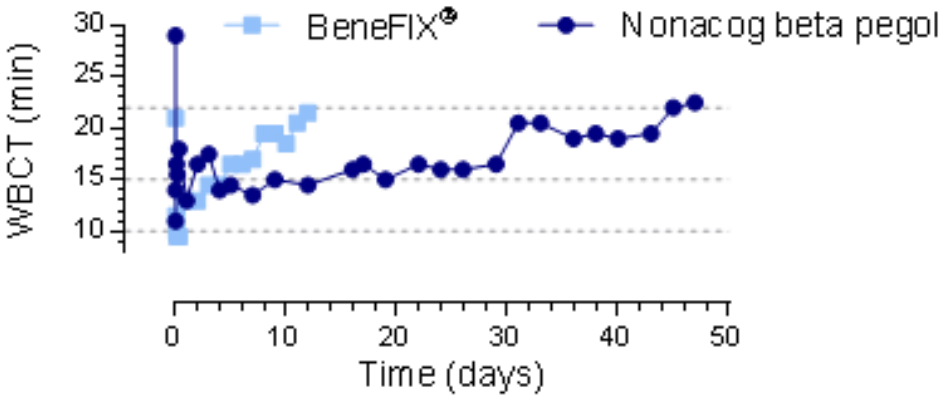


図 2.6.2-14　WBCT に基づくノナコグ ベータ ペゴル（●）及び BeneFIX®（■）のヒト FIX 免疫寛容血友病 B イヌにおける効果持続時間

The dog was dosed with 0.4 mg/kg nonacog beta pegol and BeneFIX® separated by a washout period. Upper dotted line is baseline, the two lower dotted lines are the ranges for WBCT in normal dogs.

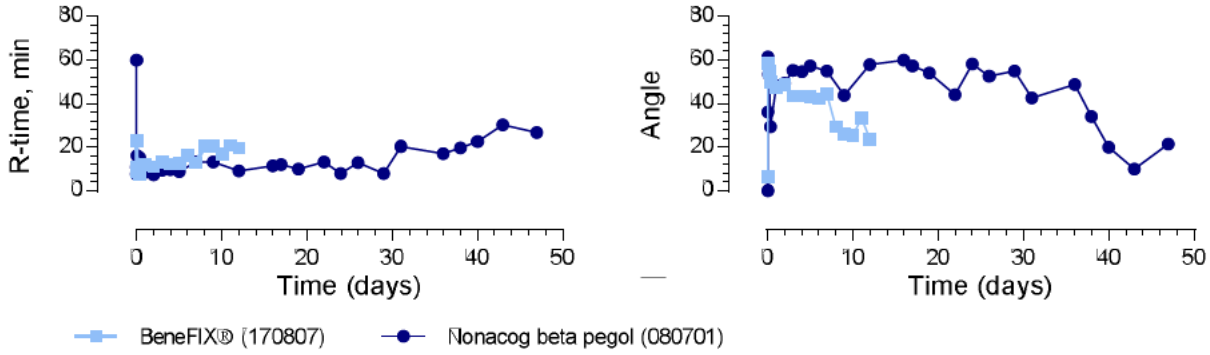


図 2.6.2-15　　TEG に基づくノナコグ ベータ ペゴル（●）及び BeneFIX®（■）のヒト FIX 免疫寛容血友病 B イヌにおける効果持続時間

［結論］

ノナコグ ベータ ペゴルの 0.4 mg/kg 単回投与時の止血効果を WBCT 及び TEG により評価したところ、同用量の BeneFIX®の単回投与時と比較し有意に持続時間が延長していることが示された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

2.6.2.3.1 ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の血管内皮細胞に対する結合（Module 2.6.3.2、試験番号 PKHO090102）

凝固プロテアーゼの中でも、FIX は血管内皮に関連する IV 型コラーゲンと特異的に結合する[11]。結合はカルシウム依存性であり、Gla ドメイン残基を介して行われる[12]。ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）への結合に及ぼすグリコ PEG 化の影響を *in vitro* で検討した。ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9 はいずれも ^{125}I 標識 BeneFIX®を競合的に置換可能であったが、Ki 値はそれぞれ 48、1.6 及び 2.4 nmol/L であり、ノナコグ ベータ ペゴルが BeneFIX®又は N9 と同等の効力を得るには 20 倍高い濃度が必要であった（図 2.6.2-16）。

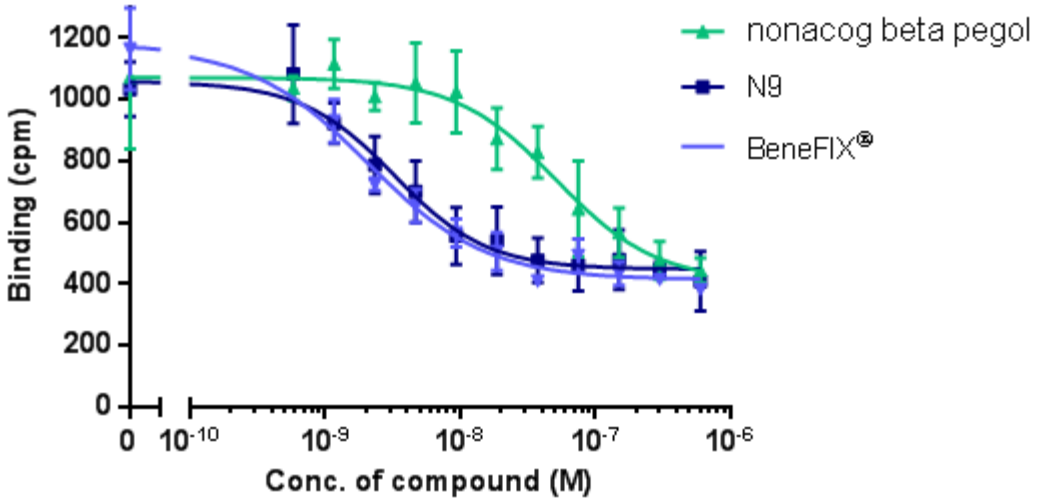


図 2.6.2-16 ノナコグ ベータ ペゴルは BeneFIX®及び N9 よりも低い親和性で内皮細胞へ結合する

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.

結論として、ノナコグ ベータ ペゴルは *in vitro* で上皮内細胞に対する結合能が認められたが、その親和性は BeneFIX®と比較して約 1/20 に減少することが明らかとなった。

2.6.2.3.2 血漿及び全血を用いた測定法における FIX 活性測定

凝固一段法（aPTT による測定）又は発色性合成基質法（発色性合成基質の FXa 開裂による発色）を用いて、血漿中の FIX 活性量を測定した。凝固一段法は世界中の臨床検査機関で汎用されており、FIX 力価の測定法として欧州薬局方に収載されている。FIX の発色性合成基質法の測定キットは近年市販品が作成されたばかりである。凝固一段法は aPTT に基づく活性測定法である。本測定法は、FIX が欠損

するがそれ以外の凝固因子はすべて含まれる血漿試料の aPTT 依存性の凝固時間を、被験物質が改善させる能力に基づくものである。FIX は制御因子であることから、凝固時間は試料中 FIX 濃度に依存する。濁度を用いて測定したフィブリン血栓形成時間は不可逆的に FIX 活性と用量比例的であった。凝固一段法では、活性化剤の種類、市販の aPTT 試薬で使用するリン脂質（PLs）の供給源、使用する測定機器の違いにより、検査室内及び検査室間の変動がかなり大きいことが広く知られている[13]。

PEG 化タンパク質の PEG 成分が凝固一段法の使用試薬に干渉し、得られる結果が使用試薬に依存することが報告されている[14, 15]。このことは、ノナコグ ベータ ペゴルにおいても同様であり、ノナコグ ベータ ペゴル活性を異なる凝固活性測定法で評価することは重要であると考えられた。したがって、ノナコグ ベータ ペゴルの止血プロファイルを評価するのに TEG 及び TGA を用いた。TEG はヒト全血中のフィブリン形成動態を測定するのに対し、TGA は異なる凝固誘発試薬を用いて血漿中トロンビン形成を測定する。

2.6.2.3.3 血漿及び全血を用いる測定法における凝固活性

2.6.2.3.3.1 凝固一段法

2.6.2.3.3.1.1 凝固一段法によるノナコグ ベータ ペゴルの活性測定（Module 2.6.3.2、試験番号 MTBH071001）

FIX の活性は通常凝固一段法、すなわち aPTT により測定される。したがって、FIX 活性測定用の凝固活性測定法を確立する必要があった。特異活性に及ぼす PEG 化の影響を評価するため、6 種類の aPTT 試薬、2 種類のキャリブレーター、異なる試験条件下でノナコグ ベータ ペゴルの凝固一段法による測定法を検討した。

ノナコグ ベータ ペゴルの非 PEG 化中間体である N9、BeneFIX® 及び 40k PEG BeneFIX®も試験に供した（図 2.6.2-17）。各種 aPTT 試薬を用いた結果から、BeneFIX® 及び N9 は同等の特異活性を示し（242～385 IU/mg）、試薬間のばらつきは想定の範囲内であったが、ノナコグ ベータ ペゴルの特異活性は 61～2111 IU/mg とばらつきが非常に大きく、aPTT 試薬に依存することが示されたことから、PEG 化による測定結果への干渉が考えられた。このことは、ノナコグ ベータ ペゴルと同様の方式で PEG 化した BeneFIX®、すなわち 40k PEG BeneFIX®の特異活性の測定実験でも確認された。

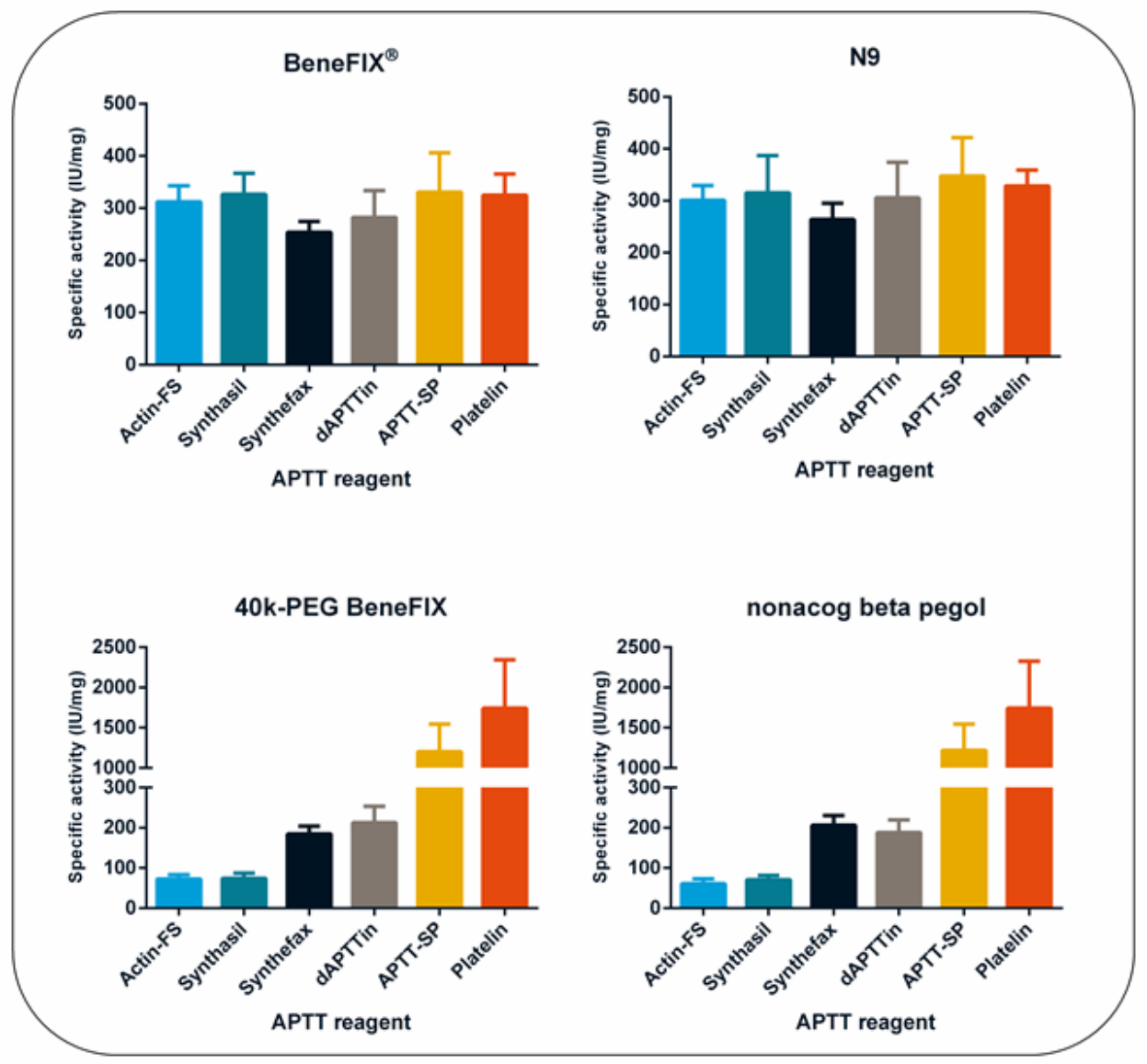


図 2.6.2-17　　凝固一段法及び各種 aPTT 試薬を用いた FIX 製剤（BeneFIX®、N9、ノナコグベータペゴル及び 40k PEG BeneFIX®）の FIX 活性

Specific activity expressed as IU/mg is estimated against NHP calibrator. Mean of 3-6 experiments ± SEM.

国際血栓止血学会－学術標準化委員会〔The International Society on Thrombosis and Haemostasis - Scientific and Standardization Committee (ISTH-SSC)〕が推奨する測定希釈条件、欧州薬局方に含まれる FIX 欠損血漿における事前希釈のステップ、ウシ血清アルブミン含量の 1%までの増加、及び FIX 濃縮製剤に対する第 4 回国際標準品の使用に関しては、PEG 化 FIX タンパク質で観察されたような測定結果への干渉は認められなかった。

複数の aPTT 試薬による凝固時間に及ぼす PEG 化の影響を図 2.6.2-18 に示す。供試した aPTT 試薬のうち 2 試薬（Actin FS 及び Synthasil）では、PEG 化タンパク質（ノナコグ ベータ ペゴル及び 40k-PEG BeneFIX®）の凝固時間を延長し、低い特異活性が観察された（図 2.6.2-18、上図）が、別の 2 試薬（APTT-SP 及び Platelin）では凝固時間を短縮し、特異活性の増加が認められた（図 2.6.2-18、下図）。残りの 2 試薬（SynthAFax 及び Dapptin）では、PEG 化による干渉は軽微であることが示された（図 2.6.2-18、中図）。しかしながら、Dapptin はロット間差が大きかったことから選択しなかった。

ノナコグ ベータ ペゴルと同様の方法で PEG 化した BeneFIX®がノナコグ ベータ ペゴルと同様の動態を示したことから、rFIX に 40 kDa PEG を特異的に附加することで変動が大きくなったと考えられた（図 2.6.2-18、中図）。

凝固一段法での測定前に FXIa と共に FIX 製剤（ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9）を活性化した場合には、製剤間で差は認められなかった。

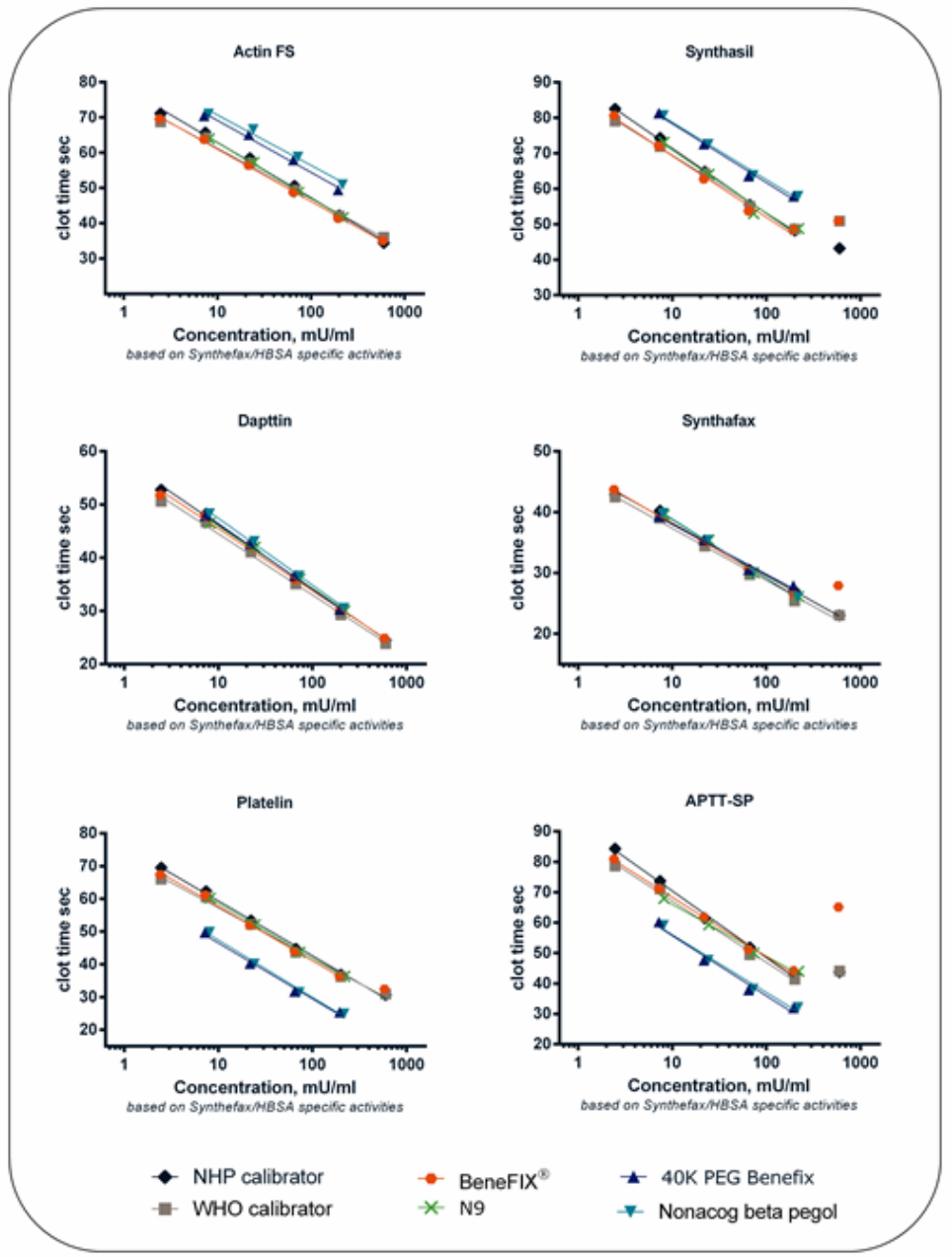


図 2.6.2-18　　各種 aPTT 試薬を用いた凝固時間測定に及ぼす rFIX の PEG 化の影響

2.6.2.3.3.1.2　凝固一段法による活性化ノナコグ ベータ ペゴルの活性測定（Module 2.6.3.2、試験番号 MTBH100202）

7 種類の aPTT 試薬を用いた凝固一段法において、FXIa で活性化したノナコグ ベータ ペゴル活性を評価した。活性化した N9 を比較対照とした。

SynthAFax 及び Dapttin の aPTT 試薬では、N9 及び BeneFIX®と比較してノナコグ ベータ ペゴルの凝固時間は非常に類似又は僅かに延長した。同様に活性化された FIX 分子の凝固時間は本質的に同等であった（図 2.6.2-19 を参照）。

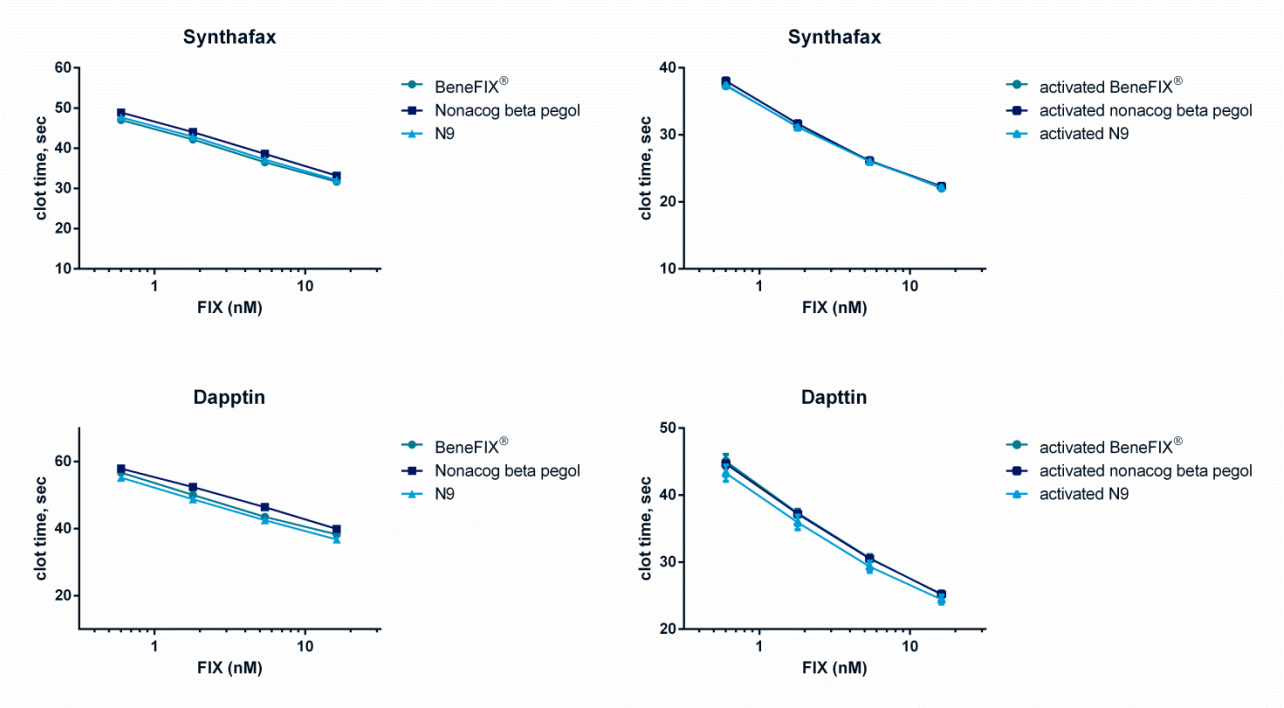


図 2.6.2-19　　各種 aPTT 試薬（SynthAFax 又は Dapttin）を用いる凝固時間に及ぼす rFIX の活性化の影響

前回の検討結果（試験番号 MTBH071001）と同様に、APTT-SP、Triniclot HS 及び STA PTTa 試薬を用いた場合には、ノナコグ ベータ ペゴルは N9 及び BeneFIX®と比較して凝固時間の極端な短縮を示した。一方、ノナコグ ベータ ペゴル、N9 及び BeneFIX®を FXIa で活性化した場合には、これら製剤の希釈曲線は重なり合うことが観察された（図 2.6.2-20）。

ノナコグ ベータ ペゴルの凝固時間を延長することがこれまでに示されている Actin FS や Synthasil のような aPTT 試薬に関して、ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び N9 を FXIa で事前に活性化した場合には、凝固時間の違いは視覚的に相殺された（図 2.6.2-20）。

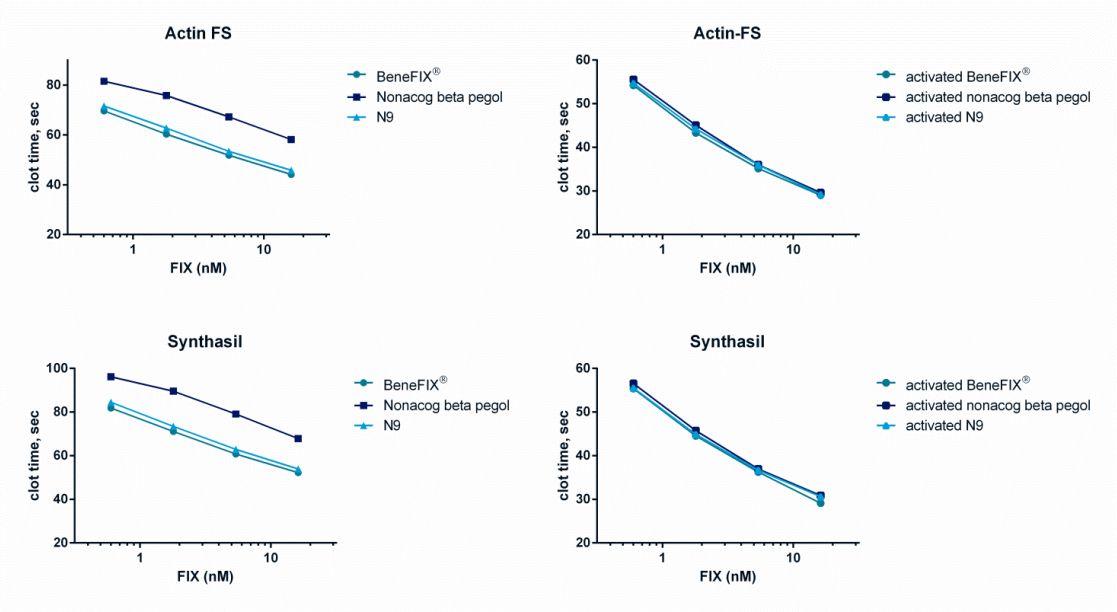


図 2.6.2-20　　各種 aPTT 試薬（APTT-SP、Triniclot HS、STA PTTa、Actin-FS 及び Synthasil）を用いた凝固時間測定に及ぼす rFIX の活性化の影響

結論として、凝固一段法では、rFIX の PEG 化により、非 PEG 化 rFIX である BeneFIX®及び N9 と比較して凝固時間の延長又は短縮をもたらす試薬特異的な相互作用が生じる。開発早期段階における初期力価測定用に SynthAFax を選択した。

2.6.2.3.3.1.3　各種 aPTT 試薬を用いた凝固一段法におけるノナコグ ベータ ペゴルの回収率－作用機序試験（Module 2.6.3.2、試験番号 215063）

各種 aPTT 試薬で認められたノナコグ ベータ ペゴルの回収率の違いの原因を検討するため、作用機序試験を実施した。FIX 凝固一段法におけるノナコグ ベータ ペゴル活性の過小評価、正常評価、過大評価の状態をそれぞれ表すため、3 種類の aPTT 試薬、すなわち Actin FS（活性化剤としてエラグ酸）、SynthAFax（活性化剤としてエラグ酸）及び APTT-SP（活性化剤としてシリカ）を選択した。

凝固一段法の 2 相、すなわち接触活性化相及び血漿凝固相を模倣する様々な試験系において、これらの試薬をノナコグ ベータ ペゴル及び非 PEG 化 FIX と共に使用した。接触相では、FXIIa 及びカリクレインが生成され、その後 FXIa を生成する。凝固相では、再石灰化後、FXIa により FIX が活性化されることで凝固形成を生じる。

Actin FS 存在下では、ノナコグ ベータ ペゴルは FIX と比較してより緩徐に FIXa に転換されることが明らかとなった。aPTT-SP 試薬を用いた場合にはシリカ粒子表面への PEG 基によるノナコグ ベータ ペゴルの吸着が生じ、そのため接触相で FXIa 及びカリクレインによる FIXa への早期転換が生じること

から、ノナコグ ベータ ペゴルの回収率は過大評価されることが示された。このことは、シリカを含む試薬に適用されると考えられる。一方、Actin FS 試薬を用いた場合には、再石灰化後の FIXa への転換が FIX と比較して相対的に緩徐であったことから、ノナコグ ベータ ペゴルの回収率は過小評価されたが、その原因はまだ明らかにされていない。SynthAFax 存在下では、ノナコグ ベータ ペゴルは非 PEG 化 rFIX と同等の活性化プロファイルを示した。

2.6.2.3.3.2 発色性合成基質法

2.6.2.3.3.2.1 発色性合成基質法におけるノナコグ ベータ ペゴルの測定法性能（Module 2.6.3.2、試験番号 PKHO141102）

発色性合成基質法は、FXa 生成を比色法で測定することにより血漿中又は緩衝液中の FIX 活性を測定する。トロンビン（FIIa）、リン脂質（PC:PS）及びカルシウム存在下では、FXIa は FIX を FIXa に活性化し、トロンビン/FVIIIa 複合体、リン脂質、カルシウムからなる酵素複合体を形成する。これら複合体はさらに FX を FXa に活性化する。本活性は直接制御因子である FIX 量に関連する。生成した FXa はその後発色基質を加水分解し、比色検出により定量化される p-ニトロアニリン（pNA）を放出する。

ノナコグベータペゴル、BeneFIX®及び MonoNine®（血漿由来の FIX 製剤）を FIX 欠損血漿に添加し、市販の FIX 発色性合成基質法測定キットである Biophen® 及び Rossix®にて、血漿キャリブレーターもしくは WHO 国際標準品のいずれかを用いて測定し、ノナコグ ベータ ペゴル活性を相対的に評価した。

ノナコグ ベータ ペゴルの回収率は BeneFIX®及び MonoNine®と同等であることが確認された。さらに、BeneFIX®のグリコ PEG 化により、発色性合成基質法で測定した回収率に変化は認められなかった。また、いずれの rFIX キットも同等の結果を示した（図 2.6.2-21）。

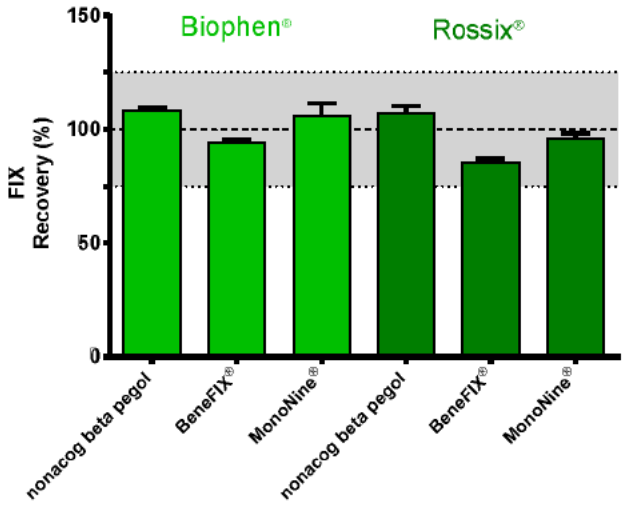


図 2.6.2-21　2 種の FIX 発色性合成基質法測定キットで定量した、ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®又は MonoNine®を添加した FIX 欠損血漿における FIX 活性の回収率

The shaded area is the recovery ± 25%.

結論として、FIX 発色性合成基質測定法は、凝固一段法でみられたような PEG 化による影響は認められなかった。

2.6.2.3.4　ノナコグ ベータ ペゴル測定法における PEG 化の影響に関する全体的結論

In vitro 試験により PEG 化はノナコグ ベータ ペゴルの生物学的活性に有意な影響を及ぼさないと結論され、このことは動物試験（2.6.2.2.5）の結果からも支持された。凝固一段法では、ノナコグ ベータ ペゴルでより大きな変動が認められたが、これは PEG 依存的な aPTT 試薬特異的な相互作用によるものであった。したがって、非 PEG 化タンパク質で観察されたものと同等の結果を示す aPTT 試薬はノナコグ ベータ ペゴル活性を正確に反映すると考えられる。これらの要求を満たす試薬は SynthAFax であり、表示力価及び臨床試験での凝固一段法に用いる試薬として選択された。aPTT 試薬として SynthAFax を用いる FIX 濃縮製剤に対する第 4 回国際標準品との相対比較によるノナコグ ベータ ペゴルの力価測定法が確立されたことから、ノナコグ ベータ ペゴルの 1 U は FIX の 1 IU 相当と定義する。

2.6.2.4 安全性薬理試験

ICH S6 ガイドラインに従い、雄性カニクイザルに 350、1300 及び 3750 IU/kg の用量で週 1 回、4 週間静脈内投与を行う 4 週間反復投与毒性試験（Module 2.6.3.4、試験番号 208260）に安全性薬理試験を組み込み、血圧（カフ）、心電図（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、ならびに尿検査を実施した。

その結果、安全性薬理に関連する影響として、高用量群（3750 IU/kg）で軽度かつ一過性の全身の震えが認められたのみであった。本所見は、高用量群（3750 IU/kg/週）の 5/8 頭で 1 回、2/8 頭で 2 回観察されたが、3 回観察された個体はいなかった（表 2.6.2-5）。全身の震えは軽度かつ一過性であり、投与後 3 時間に観察され、1 時間以内に減弱した。低用量群（350 IU/kg/週）、中用量群（1300 IU/kg/週）では、全身の震えは認められなかった。

表 2.6.2-5　　CNS に及ぼす影響の評価又は一般状態観察時にみられた全身の震えの要約

	Control	**350 IU/kg**	**1300 IU/kg**	**3750 IU/kg**
CNS assessment tremor present				
Pre-treatment	0/5	0/8	0/8	0/8
Day 2[1]	0/5	0/8	0/8	6/8
Day 12[2]	-	-	-	1/8
Clinical observation of tremors				
Day 15[3]	-	-	-	2/8

[1]Animal no 22, 23, 24, 27, 28, 29, [2]animal no 25; [3]animal no 28 and 29, - not assessed or no observations

1300 IU/kg 以下の投与量では安全性薬理評価項目に影響は認められなかったことから、本試験の NOAEL は 1300 IU/kg/週と考えられた。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

FIX に特異的な薬物動態学的相互作用が認められておらず、また予想されていないこと、さらに、ノナコグ ベータ ペゴルは薬物代謝酵素 CYP450 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）に結合しないことから、非臨床薬物相互作用試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

ノナコグ ベータ ペゴルは、血漿中半減期の延長を目的として 40 kDa PEG を活性化ペプチドの N-グリカン部位に選択的に結合させた rFIX であり、活性化により天然型の FIXa と同一構造及び同等の機能を有する分子へと変換される。

生理活性物質を用いた *in vitro* 試験から、PEG 化活性化ペプチドが活性化により放出されること、また、生理活性物質として FXIa を用いた場合には、ノナコグ ベータ ペゴルの活性化反応は正常状態と同じ速度であったが、TF/FVIIa 複合体による活性化反応では 1/2 の速度に低下することが示された。しかしながら、各種の動物モデルで示されたように、この相違は *in vivo* での止血特性に明らかに影響を及ぼすものではなかったことから、ノナコグ ベータ ペゴルはいずれの生理活性物質によっても十分に活性化さたものと考えられた。

さらに、ノナコグ ベータ ペゴルの内皮細胞との結合能は、BeneFIX®と比較して 1/20 に低下した。FIX の細胞外マトリックス、主に IV 型コラーゲンとの結合が報告されている [11, 12]。しかしながら、この結合の意義は十分に理解されていない。ノナコグ ベータ ペゴルの結合が低下した理由として、血漿中回収率の増加に寄与すると考えられる PEG 化によるものと考えられた。ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質部分を検出する生体試料中薬物濃度分析法（凝固法、LOCI、ELISA）を用いた場合には、ノナコグ ベータ ペゴルでは、BeneFIX®と比較して分布容積の減少が認められた（2.6.4 薬物動態試験の概要文を参照）。

BeneFIX®と比較して、ノナコグ ベータ ペゴルは F9-KO マウス及び血友病 B イヌで効果持続時間の明らかな延長を示した。針穿孔膝関節損傷モデルでは、ノナコグ ベータ ペゴルの単回投与により滑膜炎の進展を予防し、その効果は BeneFIX®の単回投与と同等であった。

ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 化は aPTT 試薬依存的に凝固一段法による凝固時間に影響を及ぼすが、発色性合成基質法では、PEG 化の影響は認められなかった。凝固一段法で認められた過大評価が生じた理由として、40 kDa PEG 基の存在と aPTT 試薬に含まれるシリカの使用が考えられた。動物を用いたその他の *in vitro* 及び *in vivo* での効力を裏付ける試験、ならびに既知のヒト FIX 製剤との比較から、表示力価及び臨床試験でのモニタリングで凝固一段法に用いる試薬として、SynthAFax を選択した。

カニクイザルを用いるノナコグ ベータ ペゴルの安全性薬理試験を実施したところ、高用量群（3750 IU/kg）で軽度かつ一過性の全身の震えが認められた。NOAEL（1300 IU/kg）では、評価したいずれの安全性薬理学的評価項目（循環器系、呼吸器系、CNS 及び腎機能）に影響は認められなかった。全身の震えの説明はできないが、臨床試験では全身の震えは報告されていない。

結論として、効力を裏付ける試験から、生理活性物質である FXIa 及び TF/FVIIa 複合体による活性化が生じたこと、ならびに *in vivo* 出血モデルで止血効果の延長が認められ、ノナコグ ベータ ペゴルの薬力学的特性が示された。

参考文献

1 Monroe M, Hoffmann M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1381-1389.

2 Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. Cell. 1988; 53(4):505-518.

3 Kurachi K, Davie EW. Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. Proc Natl Acad Sci U S A. 1982; 79(21):6461-6464.

4 Makino Y, Omichi K, Kuraya N, Ogawa H, Nishimura H, Iwanaga S, et al. Structural analysis of N-linked sugar chains of human blood clotting factor IX. J Biochem. 2000; 128(2):175-180.

5 van Dieijen DG, Tans G, Rosing J, Hemker HC. The role of phospholipid and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. J Biol Chem. 1981; 256(7):3433-3442.

6 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.

7 Hamidi M, Azadi A, Rafiei P. Pharmacokinetic consequences of pegylation. Drug Deliv. 2006; 13(6):399-409.

8 Sabatino DE, Nichols TC, Merricks E, Bellinger DA,Herzog RW, Monahan PE. Animal models of hemophilia. Prog Mol Biol Transl Sci. 2012; 105:151–209.

9 Valentino LA, Hakobyan N. Histological changes in murine haemophilic synovitis: a quantitative grading system to assess blood-induced synovitis. Haemophilia. 2006; 12(6):654-662.

10 Sun J, Hakobyan N, Valentino LA, Feldman BL, Samulski RJ, Monahan PE. Intraarticular factor IX protein or gene replacement protects against development of hemophilic synovitis in the absence of circulating factor IX. Blood. 2008; 112(12):4532-4541.

11 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.

12 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.

13 Viuff D, Barrowcliffe TW, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. International comparative field study of N8 evaluating factor VIII assay performance. Haemophilia. 2011;17:695–702.

14 Gu JM, Ramsey P, Evans V, Tang L, Apeler H, Leong L, et al. Evaluation of the activated partial thromboplastin time assay for clinical monitoring of PEGylated recombinant factor VIII (BAY 94-9027) for haemophilia A. Haemophilia. 2014;20(4):593-600.

15 Hubbard AR, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastatava A, et al. Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. J Thromb Haemost. 2013;11:988–989.

ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.3 薬理試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.3.1 薬理試験一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.3.3 副次的薬理試験 13
2.6.3.4 安全性薬理試験 16
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 17

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Test Article: Nonacog beta pegol

Title of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Primary Pharmacodynamics					
In vitro					
Functional *in vitro* characterization of 40K PEG-rFIX including activation by factor XIa and factor VIIa-tissue factor and subsequent inactivation by antithrombin III	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	LCP080101	4.2.1.1
Activation of nonacog beta pegol by physiological activators FXIa and TF/FVIIa	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	HQSG141101	4.2.1.1
Characterisation of FIXa activity in FIXa-FVIIIa catalyzed FX activation	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	KFSQ141101	4.2.1.1
Comparison of NN LA-N9 and BeneFIX® in TEG® in blood from haemophilia B patients	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	MSGC080301	4.2.1.1
Characterising sensitivity of the thrombin generation assay using nonacog beta pegol and N9 with FXIa as the trigger	In vitro	N/A	Novo Nordisk A/S	ELW130901	4.2.1.1
Utilizing design of experiment to characterise sensitivity of the thrombin generation assay using nonacog beta pegol and N9	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	ELW130401	4.2.1.1

Title of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
In vivo					
Dose response effect of 40K PEG-rFIX on bleeding in haemophilia B mice compared with BeneFIX®	F9-KO mice	i.v.	Novo Nordisk A/S	TELM080903	4.2.1.1
Duration of action of 40K PEG-rFIX on bleeding in haemophilia B mice compared with BeneFIX®	F9-KO mice	i.v.	Novo Nordisk A/S	TELM081202	4.2.1.1
Prolonged effect of 40K PEG-rFIX vs. BeneFIX® in a $FeCl_3$ induced injury model in F9-KO mice	F9-KO mice	*i.v.*	Novo Nordisk A/S	FLMQ081104	4.2.1.1
Effect of nonacog beta pegol compared to BeneFIX® in the knee joint injury model in F9-KO mice	F9 –KO mice	*i.v.*	University of North Carolina	MIE120301	4.2.1.1
Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of different human Factor IX preparations in haemophilia B dogs	Haemophilia B dogs	i.v.	University of North Carolina	MIE080701	4.2.1.1
Secondary Pharmacodynamics					
Binding of nonacog beta pegol and BeneFIX® to vascular endothelial cells	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	PKHO090102	4.2.1.2
Activity of nonacog beta pegol in one-stage clotting assays	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	MTBH071001	4.2.1.2
Activity of pre-activated nonacog beta pegol in one-stage clotting assays	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	MTBH100202	4.2.1.2
Nonacog beta pegol (N9-GP) recovery in one-stage FIX clot assay depends on the aPTT reagent – a mechanistic study	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	215063	4.2.1.2

Title of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Assay performance of nonacog beta pegol in chromogenic assays	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk A/S	PKHO141102	4.2.1.2
Safety Pharmacology					
Central nervous system/General Behaviour	Male cynomolgus monkeys	*i.v.*	Covance, Harrogate, UK	208260	4.2.3.2
Respiratory function	Male cynomolgus monkeys	*i.v.*	Covance, Harrogate, UK	Same as above	Same as above
Kidney function	Male cynomolgus monkeys	*i.v.*	Covance, Harrogate, UK	Same as above	Same as above
Cardiovascular system	Male cynomolgus monkeys	*i.v.*	Covance, Harrogate, UK	Same as above	Same as above
Pharmacodynamic Drug Interactions No studies performed.					

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: Nonacog beta pegol

Please refer to Pharmacology Written Summary 2.6.2.2.

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
In vitro						
Functional *in vitro* characterization of 40K PEG-rFIX including activation by factor XIa and factor VIIa-tissue factor and subsequent inactivation by antithrombin III	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	*In-vitro* activation of nonacog beta pegol by FXIa analyzed by SDS-PAGE results in the appearance of two bands at ~30 KDa and ~22 KDa representing FIXa heavy and light chains with the same molecular size as activated rFIX (BeneFIX®). The PEGylated activation peptide excised during activation is apparent on PEG-stained gels as a distinct high molecular weight band of approximately 80 KDa. These results show that the PEGylated activation peptide of nonacog beta pegol is cleaved of during activation, resulting in FIXa similar to activated BeneFIX®.	LCP080101
Activation of nonacog beta pegol by physiological activators FXIa and TF/FVIIa	*In vitro*	NA	NA	NA	The activation kinetics of nonacog beta pegol, un-PEGylated rFIX (N9) and BeneFIX® by FXIa or the FVIIa-TF complex were measured in amidolytic assays. The activation of BeneFIX®, nonacog beta pegol and N9 by FXIa proceeded with essentially identical kinetics. In contrast, the catalytic efficiency (kcat/Km) of nonacog beta pegol activation by the TF-FVIIa complex was reduced to 45-50 % of un-pegylated rFIX which was mainly because of an increased Km value from 74± 3 to 122± 3nM	HQSG141101

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Characterisation of FIXa activity in FIXa-FVIIIa catalyzed FX activation	N/A	N/A	N/A	N/A	To compare the functional properties of activated BeneFIX®, nonacog beta pegol and un-PEGylated rFIX (N9), tenase complexes were assembled on a phospholipid surface by combining the respective FXIa activated FIX forms and thrombin-activated FVIII. Conversion of FX to FXa by the complexes was measured from the generated amidolytic activity. The kinetically derived apparent dissociation constants (K1⁄2, FVIIIa) for the interaction with FVIIIa phospholipid were found to be similar for activated nonacog beta pegol, N9, and BeneFIX®. Likewise, all three molecules catalysed FX activation with indistinguishable kinetics in the presence of phospholipid and saturating FVIIIa.	KFSQ141101
Comparison of NN LA-N9 and Benefix® in TEG® in blood from Haemophilia B patients	N/A	N/A	N/A	N/A	The activity of nonacog beta pegol was assessed by thromboelastography (TEG) in whole blood from FIX deficient patients. Nonacog beta pegol and BeneFIX® were spiked into the blood samples covering the concentration range of (0.08-76nM). The ratio of EC50 values of nonacog beta pegol and BeneFIX® based on R time, MTG, and MA values did not differ significantly from unity indicating comparable potencies.	MSGC080301

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Characterising sensitivity of the thrombin generation assay using nonacog beta pegol and N9 with FXIa as the trigger	N/A	N/A	N/A	N/A	The area under the thrombin generation curve (ETP) is similar for nonacog beta pegol and N9 using FXIa as initiator. However - in agreement with the TF/FVIIa activation kinetics described earlier in other studies - it is seen that nonacog beta pegol had slightly lower activity than N9 with the TF trigger.	ELW130901
Utilizing design of experiment to characterise sensitivity of the thrombin generation assay using nonacog beta pegol and N9	N/A	N/A	N/A	N/A	The activity of nonacog beta pegol was assessed by thrombin generation assay (TGA) in plasma from FIX deficient patients. For the study nonacog beta pegol and N9 were spiked into haemophilia B plasma in the range of 0.13%-130 % (100% = 1 IU/ml). Thrombin generation was initiated by addition of TF or FXIa. A concentration dependent effect is observed for both peak thrombin and lag time using FXIa as an initiator for both nonacog beta pegol and N9. However when using TF, increasing concentrations of nonacog beta pegol and N9 only affects the peak thrombin.	ELW130401
In vivo						
Dose response effect of 40K PEG-rFIX on bleeding in haemophilia B mice compared with BeneFIX®	F9-KO mice	Single dose i.v.	0.01 to 0.75 mg/kg	Male and female mice N = 6-14	The dose-response relationships of nonacog beta pegol and BeneFIX® were compared in a tail bleeding model in F9-KO mice. A sigmoidal dose response equation was fitted to the data. For bleeding time, the ED_{50} values were estimated to 0.10 mg/kg and 0.11 mg/kg for nonacog beta pegol and BeneFIX®, respectively (p=0.85). For blood	TELM080903

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
					loss, the corresponding ED_{50} values were estimated to 0.16 mg/kg and 0.12 mg/kg for nonacog beta pegol and BeneFIX®, respectively (p=0.70). Thus, the data indicated similar potencies on both effect parameters of nonacog beta pegol and BeneFIX® when investigated in a tail bleeding model in F9-KO mice.	
Duration of action of 40K PEG-rFIX on bleeding in haemophilia B mice compared with BeneFIX®	F9-KO mice	Single dose *i.v.*	0.75 mg/kg	Male and female mice N=8-16	The duration of effect of nonacog beta pegol and BeneFIX® was investigated in a tail bleeding model in F9-KO mice The injury was made acute (5 min.), 1, 2, 3, and 5 days after dosing. When the tail injury was performed 5 min after injection, bleeding time and blood loss did not differ between compounds. After nonacog beta pegol, the effect was maintained at day 3, whereas the effect after BeneFIX® had disappeared already at day 2. At days 2 and 3, the effect on bleeding time and blood loss between compounds were statistically significantly different. At day 5, the effect had returned to the baseline level for both compounds. The study has demonstrated a prolonged haemostatic effect of nonacog beta pegol when compared to BeneFIX®.	TELM081202
Prolonged effect of 40K PEG-rFIX vs. BeneFIX® in a $FeCl_3$ induced injury model in F9-KO mice	F9-KO mice	Single dose *i.v.*	0.75 mg/kg	Male and female mice N=6-11	The duration of effect of nonacog beta pegol vs. BeneFIX® was investigated in a $FeCl_3$ induced injury model in F9-KO mice. The injury was induced by applying a 10% FeCl3 solution to the carotid artery for 3 min. The injury leads to occlusion of the	FLMQ081104

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
					vessel in wild type mice (C57Bl/6) whereas no occlusion occurs in untreated F9-KO mice. F9-KO mice were treated with nonacog beta pegol or BeneFIX® (0.75 mg/kg) i.v. The $FeCl_3$ induced injury was made acute (5 min.), 1, 2, 3, 4, and 5 days after dosing. The blood flow was recorded by ultrasound, for 25 min after removal of $FeCl_3$ and the time to occlusion was determined. Occlusion time was set to 25 min if no occlusion occurred. All mice treated with nonacog beta pegol and BeneFIX® occluded 5 min after dosing. The occlusion time for nonacog beta pegol at day 1 to day 5 was significantly shorter than for vehicle treated mice, whereas mice treated with BeneFIX® only differed significantly on day 1 and 2. One to 4 days after dosing occlusion was observed in 90-100% of the mice treated with nonacog beta pegol, whereas only 70% of the mice treated with BeneFIX® occluded one day after dosing decreasing to 44% at day 4. At day 5, 56% of the nonacog beta pegol treated mice still occluded as compared to only 13% of the BeneFIX® treated mice. In conclusion, the haemostatic effect of nonacog beta pegol was significantly prolonged compared to BeneFIX®.	
Effect of nonacog beta pegol compared to BeneFIX® in the knee joint injury model in F9-KO mice	N9-KO mice	i.v.	250 IU/kg	N= 6-8	In F9-KO mice, nonacog beta pegol was given as a single or two doses (Day 0 and 7) and BeneFIX® was given in 8 doses (Day 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13. Treatment with a	MIE120301

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
					single dose of 250 IU/kg of nonacog beta pegol resulted in a synovitis score of 1.76±0.35 that was significantly lower (p = 0.009) than the score of 3.77±0.55 observed after treatment with a single dose of BeneFIX®. Notably, the score in the group that received a single dose of nonacog beta pegol did not differ significantly from the score observed in the group treated with three doses of BeneFIX® (2.45 ± 0.56) nor from the group treated with eight doses of BeneFIX® (2.12 ± 0.30). None of the therapies given to interrupt ongoing haemorrhage resulted in a synovitis score as low as in the joints of the injured haemostatically normal mice. In conclusion, the effect of one single 250 IU/kg dose of nonacog beta pegol was significantly superior to an equivalent dose of BeneFIX®. The prolonged effect of nonacog beta pegol appeared to correspond to the effect of multiple doses of BeneFIX®.	
Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of different human Factor IX preparations in haemophilia B dogs	Haemophilia B dogs	Single dose *i.v.*	0.4 mg/kg	Female and male 1-2 dogs per group	Nonacog beta pegol and BeneFIX® were administered to HB dogs (0.4 mg/kg IV) and blood was sampled until activity was no longer detected. A HB dog that was immunologically tolerant to human FIX received both compounds without antibody formation (>30 days) and 2 HB dogs that were naïve to human FIX were given either nonacog beta pegol or BeneFIX® and monitored until antibodies appeared (<14 days). PD profiles were evaluated by whole	MIE080701

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
					blood clotting time (WBCT) and thromboelastography (TEG). Both FIX compounds corrected the prolonged WBCT and clot formation by TEG to the range of normal dogs immediately after administration. The WBCT remained in the normal range for 12-19 days with nonacog beta pegol and for 4 days with BeneFIX®.	

2.6.3.3 副次的薬理試験

Test Article: Nonacog beta pegol

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
In vitro						
Binding of nonacog beta pegol and BeneFIX® to vascular endothelial cells	N/A	N/A	N/A	N/A	The effect of glycoPEGylation on the binding to endothelial cells (HUVECs) was investigated in vitro. Nonacog beta pegol, BeneFIX®, and N9 were all capable of competitively displacing ^{125}I-labeled rFIX , however a 20-fold higher concentration of nonacog beta pegol was required compared to BeneFIX® or N9 corresponding to Ki values of 48 nM, 1.6 and 2.4nM, respectively.	PKHO090102
Activity of nonacog beta pegol in one-stage clotting assays	N/A	N/A	N/A	N/A	PEGylation of FIX can with the majority of aPTT reagents cause a specific interference leading to either prolonged(*e.g.* Actin FS and Synthasil) or shortened clotting times (*e.g.*APTT-SP and Platelin), leading to either under- or overestimation of the activity of nonacog beta pegol in a sample. A few reagents (*e.g.* SynthAFax and Dapptin) gives clotting times comparable to BeneFIX® and N9. GlycoPEGylation of BeneFIX® with 40 kDa-PEG caused same aPTT specific interference in the one-stage clotting assay as seen for nonacog beta pegol. The observed discrepancies were not related to N9, but to the PEG moiety as the results for 40K-PEG BeneFIX® and nonacog beta pegol were similar.	MTBH071001

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Activity of pre-activated nonacog beta pegol in one-stage clotting assays	N/A	N/A	N/A	N/A	Pre-activation of the FIX preparations nonacog beta pegol, BeneFIX®, and N9 with FXIa prior to the one-stage clotting test showed no difference between the three rFIX preparations. Results confirm the previous observations that PEGylation of recombinant FIX affects the clotting times obtained in the one-stage clotting assay in an aPTT reagent dependent manner. The large variability in clotting activity for nonacog beta pegol was however completely attenuated when nonacog beta pegol was pre-activated with FXIa prior to performing the one-stage clot assay, and clotting times similar to activated BeneFIX® and activated N9 were obtained with all tested aPTT reagents. Results show that once activated, nonacog beta pegol have similar pro-coagulant properties as FIXa generated from BeneFIX® in the one-stage clot assay.	MTBH100202
Nonacog beta pegol (N9-GP) recovery in one-stage FIX clot assay depends on the aPTT reagent – a mechanistic study	N/A	N/A	N/A	N/A	Three APTT reagents, Actin FS, SynthAFax and APTT-SP, were chosen to represent situations of under-, normo- and overestimation of N9-GP activity in one-stage FIX clot assay, respectively. These reagents were used together with N9-GP and native, un-PEGylated FIX in various test systems mimicking the two phases of the one-stage clotting assay, namely the contact activation phase and the plasma clotting phase. The main purpose during these two phases is to generate FXIa and FIXa, respectively, and therefore focus was on monitoring the generation of these two enzymes in the test systems. In conclusion, N9-	215063

Title of study	Test System or Species/Strain	Method of Administration	Doses[a] (IU/kg/week)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
					GP is overestimated in one-stage FIX clot assay using APTT-SP due to PEG-mediated co-localisation with the potential activators FXIa and plasma kallikrein on the surface of silica particles, leading to precocious conversion to FIXa. N9-GP is underestimated in one-stage FIX clot assay using Actin FS due to relatively slower conversion to FIXa after calcification compared with FIX.	
Assay performance of nonacog beta pegol in chromogenic assays	N/A	N/A	N/A	N/A	The activity of BeneFIX®, Mononine® and nonacog beta pegol spiked into FIX deficient plasma using either a plasma calibrator or the WHO International Standard was determined using two available FIX chromogenic assays (Biophen® and Rossix®).The FIX activity of nonacog beta pegol is comparable to the activity of BeneFIX® and MonoNine® when measured in the chromogenic assay. In addition GlycoPEGylation of BeneFIX® did not change the FIX activity when measured the chromogenic assay. The two kits gave comparable results.	PKHO141102

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: Nonacog beta pegol

The safety pharmacology assessment was included in the pivotal 4-week repeated dose toxicity study.

Organ Systems Evaluated	**Species/ Strain**	**Method of Administration**	**Doses[a] (IU/kg/week)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Study ID**
Central nervous system/General Behaviour	Male cynomolgus monkeys	i.v.	0, 350, 1300, 3750	Male animals Control: 5 animals Dosed: 8 animals	Mild and transient body tremors were seen on a single occasions in five out of eight high dose animals (3750 IU/kg/week) and in two occasion in two out of eight high dose animals. Tremors were not seen beyond third dose. NOAEL 1300 IU/kg.	Yes	208260
Respiratory function	Male cynomolgus monkeys	i.v.	0, 350, 1300, 3750	Male animals Control: 5 animals Dosed: 8 animals	None	Yes	Same as above
Kidney function	Male cynomolgus monkeys	i.v.	0, 350, 1300, 3750	Male animals Control: 5 animals Dosed: 8 animals	None	Yes	Same as above
Cardiovascular system	Male cynomolgus monkeys	i.v.	0, 350, 1300, 3750	Male animals Control: 5 animals Dosed: 8 animals	None	Yes	Same as above

a -Single dose unless specified otherwise. NOAEL: No-Observed-Adverse-Effect-Level

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

No studies performed.