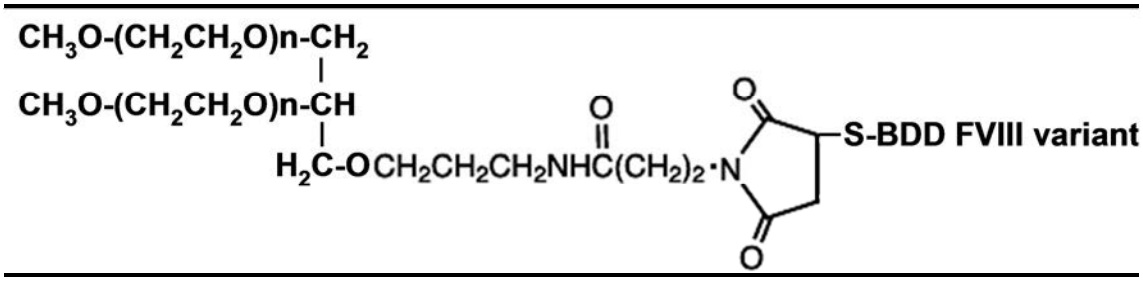
2.6.1 緒言

BAY 94-9027 は、分枝型のポリエチレングリコール（PEG）が部位特異的に結合した B ドメイン欠失（BDD）遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子（rFⅧ）（BDD-rFⅧ）であり、PEG（60kDa）を含む分子量は約 230kDa である。BAY 94-9027 の製造には、ベビーハムスター腎細胞株 BHK21 が使用され、遺伝子組換え技術により、システイン（完全長 rFⅧのアミノ酸配列番号で 1084）が導入された BDD-rFⅧとして産生される。BDD-rFⅧは、重鎖（A1 及び A2 ドメイン）及び軽鎖（A3、C1 及び C2 ドメイン）が金属架橋で結合したヘテロ二量体構造を形成している。BDD-rFⅧの導入システイン（K1804C）にマレイミド誘導体化 PEG を部位特異的に結合させることにより、BAY 94-9027 が生成される（2.3.S.1.2.1）。BAY 94-9027 の製剤に含まれる添加剤の処方成分は、既承認の完全長 rFⅧ製剤であるコージネイト FS（BAY 14-2222）及びコバールトリイ（BAY 81-8973）と同じである（2.3.P.2.1.2）。国際一般名（INN）は「Damoctocog alfa pegol」、一般名（JAN）は「ダモクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え）」である。BAY 94-9027 の構造を図 2.6.1- 1 に示す。

BAY 94-9027 は、非修飾の rFⅧと同じ作用機序及び血液凝固活性を有し、血漿クリアランスの減少を介して血漿中の FⅧ活性-時間曲線下面積（AUC）を増大させ、消失半減期が延長する。

BAY 94-9027 の申請効能・効果及び申請用法・用量を以下に示す。

効能・効果	血液凝固第Ⅷ因子欠乏患者における出血傾向の抑制
用法・用量	本剤を添付の溶解液全量で溶解し、緩徐に静脈内注射する。なお、1 分間に 2.5mL を超える注射速度は避けること。 通常、1 回体重 1kg 当たり 10～30 国際単位を投与するが、患者の状態に応じて適宜増減する。 定期的に投与する場合、通常、体重 1kg 当たり 45～60 国際単位を 5 日に 1 回投与するが、患者の状態に応じて、投与量及び投与間隔を体重 1kg 当たり 60 国際単位を週 1 回、又は体重 1kg 当たり 30～40 国際単位を週 2 回の範囲で適宜調節する。



"n" stands for repetitive $CH_3O(CH_2CH_2O)$ units. The "S" represents the sulfide group of cysteine 1804 on the BDD-FVIII.

図 2.6.1- 1 BAY 94-9027 の構造

本項（2.6 項）及び 2.4 項に記載する被験物質 BAY 94-9027 及び 60kDa PEG 部、並びに関連する rFⅧ製剤の名称及び定義を以下に示す。

被験物質及び 60kDa PEG 部	
BAY 94-9027	一般名：ダモクトコグ　アルファ　ペゴル（遺伝子組換え）（JAN） 部位特異的に 60kDa の PEG が結合した B ドメイン欠失遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子。
BAY 1025662	マレイミドリンカーの末端にシステインを結合させた 60kDa PEG 分子（PEG-60-マレイミド-システイン＝PEG-60-Mal-Cys）。
関連する rFⅧ製剤	
BAY 14-2222	一般名：オクトコグ　アルファ（遺伝子組換え）（JAN） 既承認の完全長 rFⅧ製剤（販売名：コージネイト FS）
BAY 81-8973	一般名：オクトコグ　ベータ（遺伝子組換え）（JAN） 既承認の完全長 rFⅧ製剤（販売名：コバールトリイ）

略語一覧

略語	英語名称	日本語名称
^{14}C	carbon 14 labeled	^{14}C 標識体
Ae, ur	amount excreted via urine	尿中排泄量
Admin	Administration	投与
ADA	anti-drug antibody	抗薬物抗体
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the concentration vs. time curve from zero to infinity	投与 0 時間から無限大時間までの FⅧ活性（又は濃度）-時間曲線下面積
AUC_{norm}	dose normalized AUC	体重あたりの投与量（IU/kg）で標準化した AUC
AUC(0-x)	AUC from zero to x h	投与 0 時間から x 時間までの FⅧ活性（又は濃度）-時間曲線下面積
BDD	B domain deleted	B ドメイン欠失
BDD-rFⅧ	B domain deleted recombinant factor Ⅷ	B ドメイン欠失遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子
BSA	bovine serum albumin	ウシ血清アルブミン
CBT	cuticle bleeding time	爪上皮出血時間
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use (European Medicines Agency)	欧州医薬品庁ヒト用医薬品委員会
CL	clearance	全身クリアランス
C_{max}	maximum concentration	最高 FⅧ活性、最高濃度
CNS	central nervous system	中枢神経系
DC	dendritic cell	樹状細胞
ED50	effective dose at 50% inhibition	50%有効量
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酵素免疫測定法
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
F / f	female(s)	雌
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FⅧ	Factor Ⅷ	血液凝固第Ⅷ因子
FX	Factor X	血液凝固第X因子
FXa	activated Factor X	活性化血液凝固第X因子
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HemA	hemophilia A	血友病 A
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸

略語	英語名称	日本語名称
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-MS/MS	high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IFNγ	Interferon γ	インターフェロンγ
IHC	Immunohistochemistry	免疫組織化学
IgG	Immunoglobulin G	免疫グロブリン G
IgM	Immunoglobulin M	免疫グロブリン M
IV, iv, i.v.	intravenous(ly)	静脈内
K	clot formation time	凝固速度
KG-FS	Kogenate FS, full length rFVIII	コージネイト FS、BAY 14-2222
PEG-FVⅢ	PEGylated FVⅢ, BAY 94-9027	PEG 化 FVⅢ、BAY 94-9027
LLOQ	lower limit of quantitation	定量下限
LPS	lipopolysaccharide	リポポリサッカライド
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計測
M / m	male(s)	雄
MA	maximal clot size	最大振幅
MRT	mean residence time	平均滞留時間
NOAEL	no-observed-adverse-effect-level	無毒性量
PBMC	peripheral blood mononuclear cell	末梢血単核細胞
PEG	polyethylene glycol	ポリエチレングリコール
PEG-60-Mal-Cys	PEG-60-Maleimide-Cysteine	PEG-60-マレイミド-システイン、BAY 1025662
PNDx	postnatal day x	生後 x 日
R	clot initiation time	反応時間
rFVⅢ	recombinant FVⅢ	遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子
SD	standard deviation	標準偏差
SE	standard error	標準誤差
SI	stimulation index	-
$t_{1/2}$	half-life	消失半減期
TEG	thromboelastography	トロンボエラストグラフィ
TLR	Toll like receptor	Toll 様受容体
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

略語	英語名称	日本語名称
Vz	apparent volume of distribution during terminal phase after IV administration	終末相における分布容積
WBCT	whole blood clotting time	全血凝固時間

2.6.2　薬理試験の概要文の目次

2.6.2.1　まとめ..... 2
2.6.2.2　効力を裏付ける試験..... 3
2.6.2.2.1　*In vitro* 薬理試験 3
2.6.2.2.1.1　ウサギ、イヌ及びヒト希釈正常血漿の凝固に及ぼす BAY 94-9027 の影響評価..... 3
2.6.2.2.2　*In vivo* 薬理試験 4
2.6.2.2.2.1　血友病 A マウスにおける BAY 94-9027 の薬物動態..... 4
2.6.2.2.2.2　血友病 A マウスの尾切断出血モデルにおける BAY 94-9027 の効果..... 5
2.6.2.2.2.3　血友病 A マウスの尾静脈切断モデルにおける BAY 94-9027 の効果..... 7
2.6.2.2.2.4　血友病 A イヌにおける BAY 94-9027（研究用製剤）の薬物動態及び効果 9
2.6.2.2.2.5　血友病 A イヌにおける BAY 94-9027 の薬物動態及び効果 11
2.6.2.2.3　探索的免疫原性試験 14
2.6.2.2.3.1　BAY 94-9027 に反応する抗 PEG 抗体のアイソタイプと反応性 14
2.6.2.2.3.2　探索的 BAY 94-9027 単回投与ミニブタ試験..... 15
2.6.2.2.3.3　BAY 94-9027 の免疫原性プロファイル検討のための試験..... 16
2.6.2.3　副次的薬理試験..... 19
2.6.2.4　安全性薬理試験..... 19
2.6.2.4.1　中枢神経系 20
2.6.2.4.2　腎機能..... 21
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用..... 22
2.6.2.6　考察及び結論..... 23
2.6.2.7　図表..... 24
引用文献一覧 25

2.6.2　薬理試験の概要文

2.6.2.1　まとめ

BAY 94-9027〔一般名：ダモクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え）、2.6.1〕は、部位特異的にポリエチレングリコール（PEG）化した B ドメイン欠失（BDD）遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子（rFⅧ）であり、導入システイン残基（完全長 rFⅧのアミノ酸配列番号で 1804 に相当）に 60kDa の分枝型 PEG 1 分子が結合している。BAY 94-9027 は、既承認の完全長 rFⅧである BAY 14-2222（コージネイト FS、2.6.1）と同様に内因系凝固カスケードにおける補助因子として機能し、かつ PEG 化により循環血液中での消失半減期が BAY 14-2222 に比べ延長している。

In vitro において、BAY 94-9027 の凝固活性が確認されている。*In vivo* での BAY 94-9027 の効果は、血友病 A マウスを用いた 2 つの出血モデル、並びに血友病 A イヌを用いた出血モデルで評価した。血友病 A マウス尾切断出血モデルにおいて、BAY 94-9027 の急性効果（急性出血に対する効果）は、BAY 14-2222 と同等であった。また、BAY 14-2222 と比較して向上した BAY 94-9027 の薬物動態プロファイルと相関し、血友病 A マウス尾静脈切断（TVT）モデルにおける BAY 94-9027 の出血予防効果（止血効果の持続）は BAY 14-2222 よりも長時間持続した。BAY 94-9027 は、血友病 A イヌにおける急性出血に対しても効果を示し、出血予防効果も非 PEG 化 BDD rFⅧ（BDD-rFⅧ）及び BAY 14-2222 より長時間持続することが示唆された。BAY 94-9027 の臨床試験において認められた過敏症反応と有効性の欠如について（2.5.5.3.3.3.2）、一連の探索的試験を実施して免疫原性及び免疫反応性を検討した。

rFⅧ及び PEG はいずれも、中枢及び末梢神経系、心血管系、並びに呼吸器系などの生命維持に重要な器官系に対し影響を及ぼさないことから、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン S6(R1)「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」に従い、BAY 94-9027 について、独立した安全性薬理試験での詳細な検討は必要ないと考えられたが、中枢神経系及び腎機能に関する評価項目を、ラット 2 週間反復投与毒性試験（14 日間隔日投与）のデザインに組み込み評価した。その結果、中枢神経系、自律神経系、神経筋及び感覚運動系、並びに生理機能の各パラメータに対する影響は認められず、尿量及び電解質（ナトリウム及びカリウム）排泄などの腎機能パラメータにも影響はみられなかった。更に、クレアチニンクリアランス、総たん白及び N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ排泄などの糸球体及び尿細管機能のマーカーの上昇も認められなかった。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

BAY 94-9027 の *in vitro* における凝固活性は、合成基質法及び凝固一段法による測定で確認されている。

BAY 94-9027 の *in vivo* 有効性については、動物モデルを用いた試験で評価した。主要な試験として、血友病 A マウス及び血友病 A イヌにおいて、出血に対する急性効果及び予防効果（止血効果の持続）を評価した。これらの試験には、BHK21 細胞株産生の BAY 94-9027 製剤を用いたが、血友病 A イヌを用いた 1 試験では、HKB11 細胞株産生の BAY 94-9027 製剤を用いた。

血友病 A マウス尾切断出血モデルにおける BAY 94-9027 の急性効果は、BAY 14-2222 と同等であった。血友病 A マウス TVT モデルにおいて評価した持続的な出血予防効果は、BAY 14-2222 と比較し向上した BAY 94-9027 の薬物動態プロファイルと相関していた。BAY 94-9027 は血友病 A イヌにおける出血に対しても急性効果を示し、さらに同モデルにおける効果が BDD-rFⅧ及び BAY 14-2222 よりも長時間持続することが示唆された。

2.6.2.2.1 *In vitro* 薬理試験

BAY 94-9027 の力価が、合成基質法及び凝固一段法により測定されており（2.3.P.2.2.3.11）、これらの測定結果により、BAY 94-9027 の *in vitro* での凝固活性が確認できる。凝固活性は国際単位（IU）で表示される。

2.6.2.2.1.1 ウサギ、イヌ及びヒト希釈正常血漿の凝固に及ぼす BAY 94-9027 の影響評価

参照項目：4.2.1.1.1 CB-2011-07

活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）アッセイにより、ウサギ、イヌ及びヒト血漿における BAY 94-9027（ロット番号 949027T070209）の *in vitro* での凝固促進作用を BAY 14-2222（ロット番号 27N1XL1T）と比較した。

ウサギ血漿（雄性 NZW ウサギ）、イヌ血漿（雌性ビーグル犬）及びヒト血漿（George King Bio-Medical）を、それぞれ aPTT 緩衝液（50mM HEPES、100mM NaCl、0.1% BSA 又は HSA、NaOH で pH7.4 に調整）で希釈した 10%血漿サンプルに、BAY 94-9027 又は BAY 14-2222 を最終濃度 0.078～10IU/mL となるように添加した。その被験液に、aPTT 緩衝液で希釈した 25%血漿、及び aPTT 試薬（Dade Behring）を加え、37℃で 3～4 分間インキュベート後、$CaCl_2$ を加えて、Stago Compact STA を用いて凝固時間を測定し、希釈血漿の凝固時間に及ぼす BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の影響を評価した。

図 2.6.2.2- 1 に示すように、BAY 94-9027 は、ウサギ、イヌ及びヒト血漿の凝固時間を濃度依存的に短縮させ、その作用は BAY 14-2222 とほぼ同等であった。BAY 94-9027 の作用はヒト血漿で最も強く、続いてウサギ及びイヌ血漿の順であった。

要約すると、BAY 94-9027 は検討したすべての動物種の血漿で凝固を促進し、その作用は BAY 14-2222 と同等であった。ウサギ血漿でも薬理作用が確認できたことから、ウサギは毒性試験に用いる動物種として適切であると考えられる。

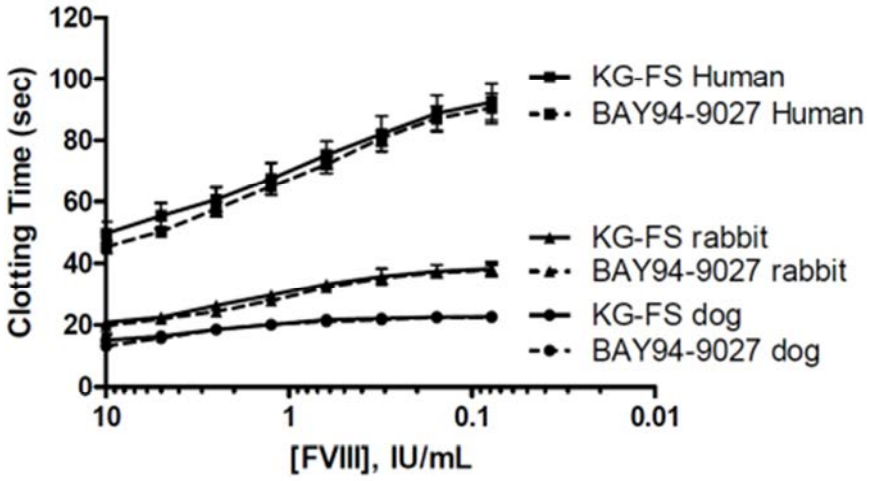


図 2.6.2.2- 1 ウサギ、イヌ及びヒト希釈血漿の凝固時間に及ぼす BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の作用

The Y-axis is clotting time in seconds versus the X-axis in IU/mL (10 IU/mL to 0.078 IU/mL).
The data represented the mean ± SD from three independent experiments.
KG-FS=Kogenate FS (BAY 14-2222)

2.6.2.2.2 *In vivo* 薬理試験

2.6.2.2.2.1 血友病 A マウスにおける BAY 94-9027 の薬物動態

参照項目：4.2.1.1.2 CB-2010-10

雄性血友病 A マウス（4 匹/時点/群）において、薬物動態を検討した。BAY 94-9027（ロット番号 949027T070209）及び BAY 14-2222（ロット番号 27N1XL1T）をそれぞれ 200IU/kg 尾静脈から静脈内ボーラス投与した。投与後 5 分及び 1、4、8、16、24、32、48 時間に血液を採取し、血漿中の FⅧ活性を合成基質法で定量した。

薬物動態解析及び統計解析には WinNonlin を用いた。マウスを群分けし、静脈内ボーラス投与後のデータを、スパースサンプリングによるノンコンパートメント解析により評価した。投与時点から血漿中 FⅧ活性が 10mIU/mL に低下するまでの時間を「閾値までの時間（Time to Threshold）」とし、追加薬物動態学的パラメータとして評価した（表 2.6.2.2- 1）。FⅧが効果を発揮するには、血漿中 FⅧ活性が閾値以上である必要があることから、「閾値までの時間」は、$t_{1/2}$ よりも有効性により関連すると考えられる。さらに、「閾値までの時間」は、被験薬の消失速度と投与後初期の生体内回収率の両方の影響を反映する。

BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 を投与したときの血漿中 FⅧ活性-時間プロファイルを図 2.6.2.2- 2 に示す。また推定薬物動態学的パラメータの要約を表 2.6.2.2- 1 に示す。BAY 94-9027 の閾値までの時間は BAY 14-2222 に比べて 1.7 倍長く、BAY 94-9027 の薬物動態学的パラメータは BAY 14-2222 に比べて向上していることを示している。

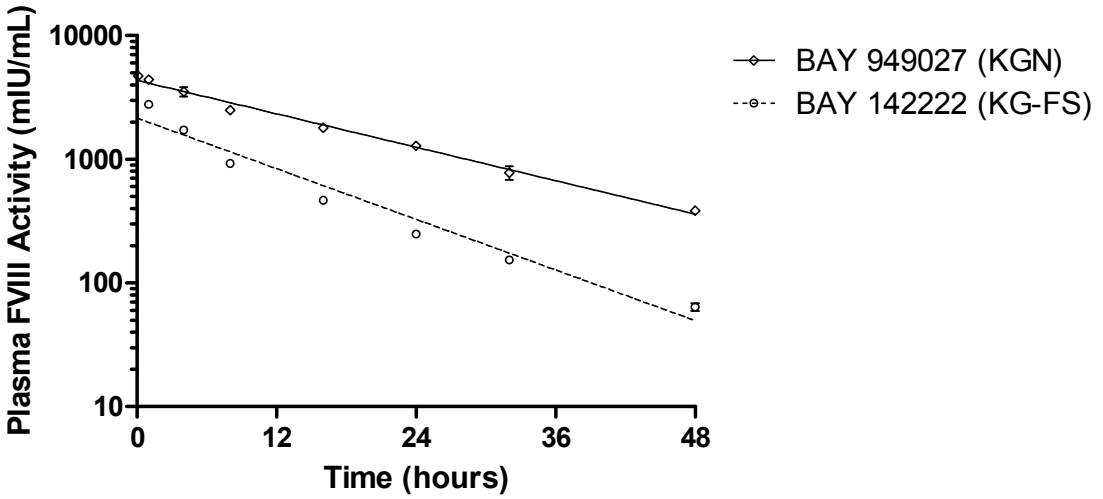


図 2.6.2.2- 2 BAY 94-9027（KGN）及び BAY 14-2222（KG-FS）を投与したときの平均血漿中 FⅧ活性推移

Points are mean concentrations of FVIII measured by Coatest activity (IU/mL).
Solid vertical lines are the standard error of the mean.

表 2.6.2.2- 1 血友病 A マウスにおける薬物動態パラメータ

Material	Dose (IU/kg) By Retain	$t_{1/2}$ (hr)	MRT∞ (hr)	AUC/Dose (hr*mIU/mL)/ (mIU/kg)	CL (mL/hr/kg)	Time to Threshold (1% of normal, in hrs)	V_z (mL)
BAY 94-9027 (KGN)	167	13.4	19	0.41	2.4	117	46.8
BAY 14-2222 (KG-FS)	210	8.8	10.7	0.14	7	68	89.8

2.6.2.2.2.2 血友病 A マウスの尾切断出血モデルにおける BAY 94-9027 の効果

参照項目：4.2.1.1.3 CB-2010-11

血友病 A マウスの尾切断出血モデルは、FⅧの急性効果（急性出血に対する効果）を定量的に評価するために用いられている。雄性血友病 A マウス（15 匹/群）に、200、100、40、20 及び 10IU/kg の BAY 94-9027（ロット番号 949027T070209）又は BAY 14-2222（ロット番号 27N1XL1T）を、尾切断 5 分前に静脈内投与した。イソフルランでマウスを麻酔し、温めた 0.9%生理食塩液に尾を 10 分間浸した後、先端から 4mm の位置で尾を切断し、直ちにあらかじめ温めておいた生理食塩液を入れたプラスチックチューブに入れ、そのまま 40 分間放置し、前後のチューブ重量の差から失血量を定量した。

図 2.6.2.2- 3 及び表 2.6.2.2- 2 に示すように、尾切断出血モデルにおいて、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 はいずれも用量依存的に失血量を減少させた。失血量を最大（中央値）の約半分である 400μL に減少させる BAY 14-2222 の用量は約 31.2IU/kg、BAY 94-9027 の用量は約 38.5IU/kg であり（図 2.6.2.2- 4 左図）、両製剤間に明らかな差は認められなかった。同様の

実験条件下で、正常雄性 C57BL/6 マウス（15 匹/群）の失血量は 74±92.6μL（平均±SD）であった（図 2.6.2.2- 3 及び表 2.6.2.2- 2）ことから、失血量の正常範囲を正常 C57BL/6 マウスの平均失血量＋3SD［74＋（3×92.57）＝352μL］とし、血友病 A マウスにおいて失血量が 352μL 未満になった場合を「正常化」と定義した。半数（50%）の血友病 A マウスに正常化が認められる被験薬の用量（ED_{50}）を決定するために、投与量ごとに正常化した動物数の割合を算出し、結果を図 2.6.2.2- 4 右図にプロットした。また、要約を表 2.6.2.2- 3 に示した。BAY 14-2222 の ED_{50} は約 30.3IU/kg、BAY 94-9027 の ED_{50} は 39.0IU/kg であり、明らかな差は認められなかった。

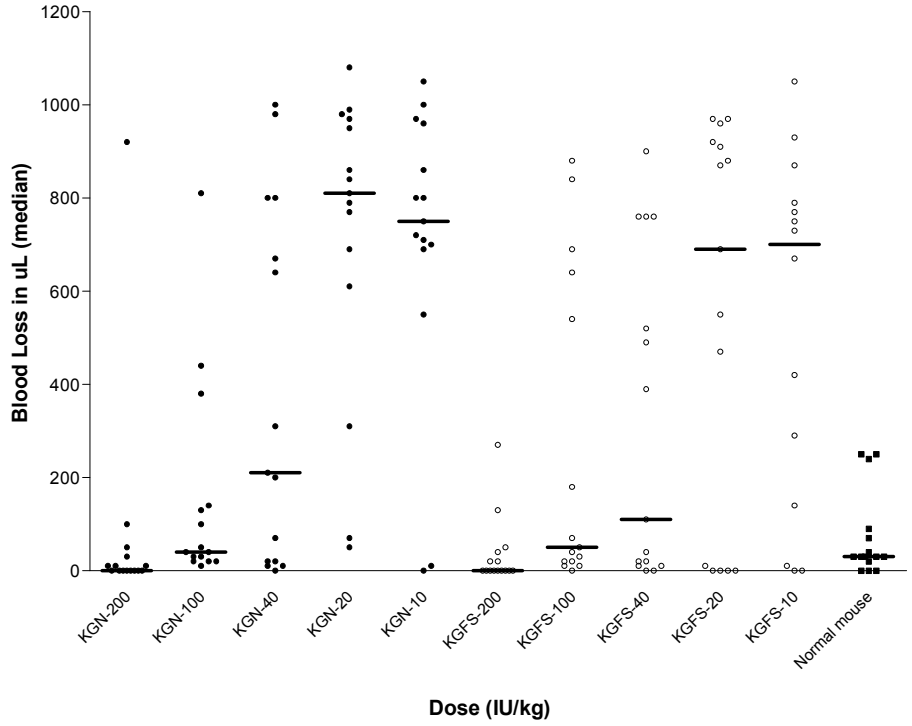


図 2.6.2.2- 3　BAY 94-9027（KGN）及び BAY 14-2222（KGFS）を 5 分前投与した血友病 A マウスにおける尾切断後の失血量

The solid horizontal lines are the median values for the groups while dots represent individual animals. Doses are indicated as -200, -100, -40, -20 and -10 for 200, 100, 40, 20 and 10 IU/kg, respectively.

表 2.6.2.2- 2　各用量群の平均失血量（平均±標準誤差）

Material	200 IU/kg	100 IU/kg	40 IU/kg	20 IU/kg	10 IU/kg	Normal Mouse blood loss
BAY 14-2222	35 ± 76	268 ± 347	319 ± 349	547 ± 439	530 ± 384	74 ± 93
BAY 94-9027	75 ± 243	150 ±231	383 ± 360	718 ± 336	705 ± 312	

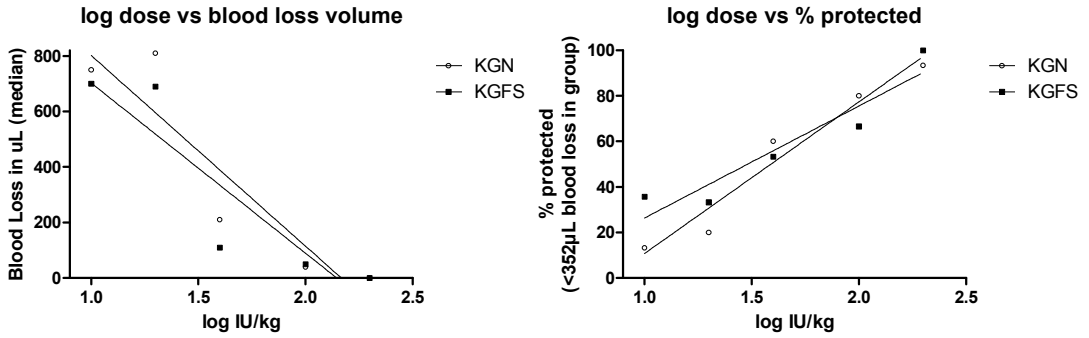


図 2.6.2.2- 4 血友病 A マウス尾切断出血モデルにおける BAY 94-9027（KGN）及び BAY 14-2222（KGFS）の急性効果（左図）、並びに出血傾向正常化率（右図）.

表 2.6.2.2- 3 各用量群の出血傾向正常化率（%、<352μL）と ED_{50}

Material	200 IU/kg	100 IU/kg	40 IU/kg	20 IU/kg	10 IU/kg	ED_{50}	normal C57BL/6 mice
BAY 14-2222	100.0%	66.6%	53.3%	33.3%	35.7%	30.3 IU/kg (95%CI: 9-63)	100%
BAY 94-9027	93.3%	80.0%	60.0%	20.0%	13.3%	39.0 IU/kg (95%CI: 24-61)	

以上の結果から、血友病 A マウス尾切断出血モデルにおける静脈内投与 5 分後の BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の急性効果はおおむね同等であり、両製剤間で明らかな差は認められなかった。薬物動態試験において、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 投与 5 分後の血漿中 FⅧ活性はほぼ同程度であった（図 2.6.2.2- 2）ことも、この結果と合致する。

2.6.2.2.2.3 血友病 A マウスの尾静脈切断モデルにおける BAY 94-9027 の効果

参照項目：4.2.1.1.4 CB-2010-12

血友病 A マウスの尾静脈切断（TVT）モデルを用いて、BAY 94-9027（ロット番号 949027T070209）の出血予防効果（止血効果の持続）を BAY 14-2222（ロット番号 27N1XL1T）と比較した。雄性血友病 A マウス（20 匹/群）に TVT の 24 時間前に BAY 14-2222 又は 48 時間前に BAY 94-9027 を、それぞれ 4、12、24、40 及び 60IU/kg 尾静脈より投与した。外側尾静脈を切断し、個別のケージにそれぞれ戻した後、24 時間にわたり動物の生存を効果の指標として観察した（図 2.6.2.2- 5 A～E）。TVT 後 24 時間時点の生存率（%）を投与量の対数に対してプロットし、線形回帰法により投与量-生存率曲線を求め、生存率 50%に相当する用量を外挿して ED_{50} を算出した（図 2.6.2.2- 5 F）。

ED_{50} は BAY 14-2222 で 15.2IU/kg、BAY 94-9027 で 13.9IU/kg であった。TVT48 時間前に投与した BAY 94-9027 は、TVT24 時間前に投与した BAY 14-2222 とほぼ同等の効果を示したことから、血友病 A マウス TVT モデルにおける BAY 94-9027 の効果は、BAY 14-2222 より約 2 倍持続することが示された。血友病 A マウスの薬物動態試験（2.6.2.2.2.1）においても、BAY 94-9027 投与

後 48 時間時点の FⅧ活性は、BAY 14-2222 投与後 24 時間時点の FⅧ活性と同程度であり、上述の結果と合致する。

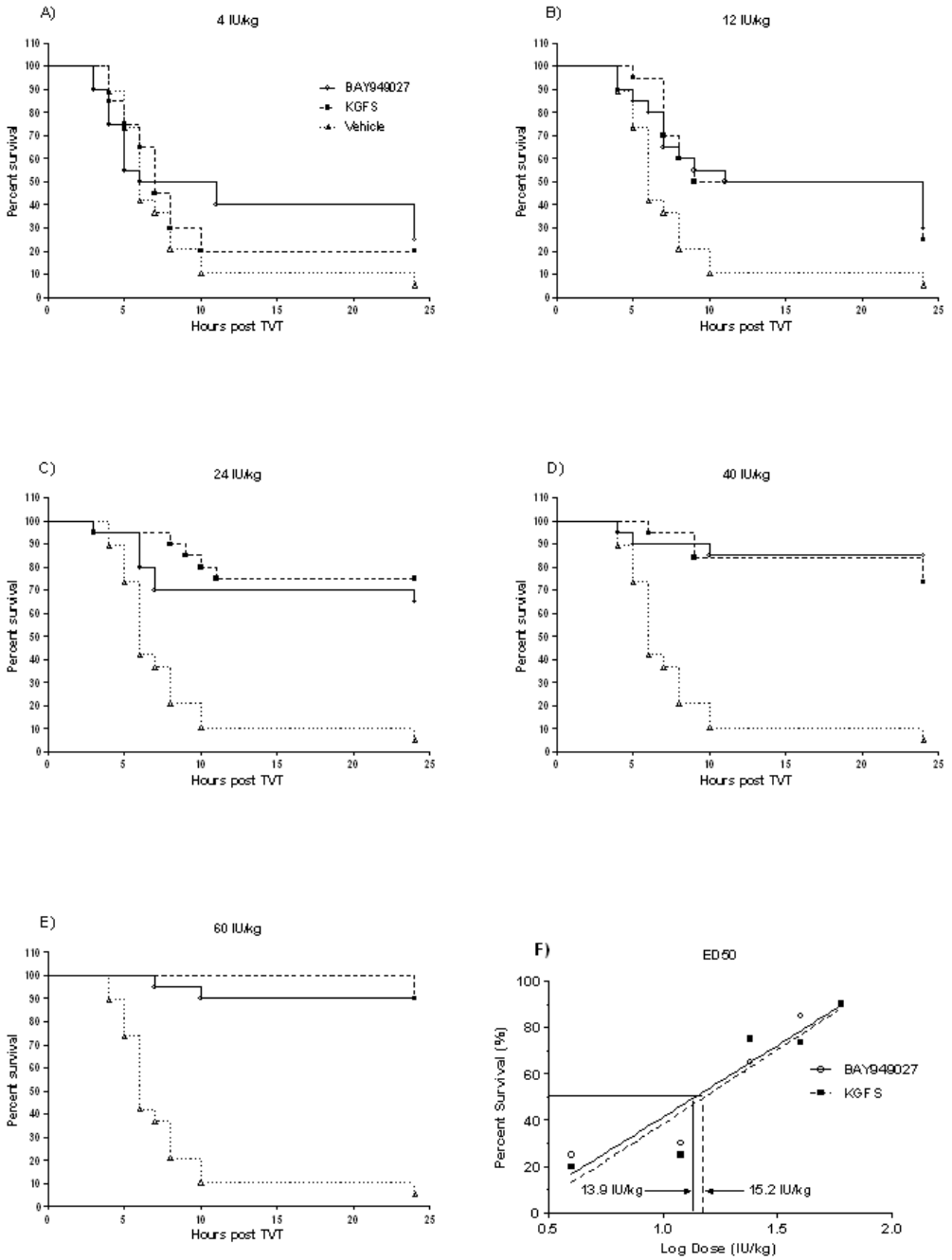


図 2.6.2.2- 5　BAY 94-9027 及び BAY 14-2222（KGFS）各投与量群の尾静脈切断後 24 時間までの生存率曲線と ED_{50}

A) 4 IU/kg, B) 12 IU/kg, C) 24 IU/kg, D) 40 IU/kg and E) 60 IU/kg
F) ED_{50}

2.6.2.2.2.4 血友病 A イヌにおける BAY 94-9027（研究用製剤）の薬物動態及び効果

参照項目：4.2.1.1.5 CB-2009-29

血友病 A イヌは十分に確立された血友病動物モデルである。BAY 94-9027（HKB11 細胞株産生の研究用製剤、ロット番号 2007.046-80 Early SP）及び B ドメイン欠失 rFVⅢ製剤（BDD-rFVⅢ）（HKB11 細胞株産生の研究用製剤、ロット番号 2007.076-01 QDP）の薬物動態及び効果を、2 群に無作為化した、まだいずれの実験にも使用されたことのないナイーブな 4 匹の血友病 A イヌを用いて検討した。各群 2 匹のイヌに BAY 94-9027 又は BDD-rFVⅢ（目標投与量：50IU/kg）を Day 1 に静脈内投与し、Day 5 まで採血と検査を行った。2 日間のウォッシュアウト後、各イヌをクロスオーバーし、Day 8 に BDD-rFVⅢ又は BAY 94-9027 を投与した。しかしながら、BAY 94-9027 を投与したイヌ 2 匹の内 1 匹、並びに BDD-rFVⅢを投与したイヌ 2 匹で、Day 9 には中和抗体が検出されたため、これらのイヌのクロスオーバー試験結果は解析から除外した。

薬物動態は、投与後 15 分～72 時間まで採取した血漿における Coatest で測定した血漿 FVⅢ活性、並びに酵素免疫測定法（ELISA）で測定した抗原レベルの両方により評価した。薬物動態の解析には WinNonlin を用いた。BAY 94-9027 及び BDD-rFVⅢに対する中和抗体はベセスダアッセイにより測定した。急性効果は、各製剤投与前 30 分及び投与後 30 分に測定した爪上皮出血時間（CBT）（総血液滴下数として測定）、全血凝固時間（WBCT）及び全血トロンボエラストグラフィ（TEG）により評価した。効果の持続は、WBCT 及び TEG の経時的変化により評価した。臨床血液学的パラメータ及び血液生化学パラメータもモニタリングしたが、投与後 5 日間の検査では正常であった。

BAY 94-9027 投与時の血漿中 FVⅢ活性の終末相における半減期（$t_{1/2}$）は 13.8±1.8 時間（平均±SD）であり、BDD-rFVⅢ投与時の 6.5±0.3 時間より長かった。BAY 94-9027 の平均滞留時間（MRT）は 19.1±2.8 時間で、BDD-rFVⅢの 8.9±0.3 時間の約 2 倍であった。更に、BAY 94-9027 のクリアランス（CL）は 2.4±0.6mL/hr/kg であり、BDD-rFVⅢの 5.7±0.3mL/hr/kg より小さかった（表 2.6.2.2- 4）。

爪切断後 15 分間の血液滴下数測定において、BAY 94-9027（139 滴から 16 滴に、及び 61 滴から 4 滴に）及び BDD-rFVⅢ（35 滴から 15 滴に、及び 87 滴から 2 滴に）投与後の失血量は、投与前に比べ減少した。血液滴数によりスコア 0（0 滴/min）、スコア 1（1 滴/min）、スコア 2（2～5 滴/min）、スコア 3（6～10 滴/min）、スコア 4（11～20 滴/min）、スコア 5（20 滴超/min）と定義した CBT スコアでも、各イヌで一貫して投与後に改善した。CBT スコアは、BAY 94-9027 を投与したイヌでは 34 から 6 及び 24 から 2 に、BDD-rFVⅢを投与したイヌでは 18 から 9 及び 34 から 2 にそれぞれ低下した（図 2.6.2.2- 6）。

表 2.6.2.2- 4 FVⅢ活性及び FVⅢ抗原に基づく BAY 94-9027 及び BDD-rFVⅢの薬物動態パラメータの要約

Treatment	Dog ID	Dose (IU/kg)	Analysed by FVIII Activity			Analysed by FVIII Antigen		
			$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	CL (mL/hr/kg)	$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	CL (mL/hr/kg)
BAY 94-9027	Joplin	37	15.0	21.1	2.0	14.7	20.4	2.3
	Tink	43	12.5	17.1	2.9	11.7	16.0	3.1
		mean±SD	13.8±1.8	19.1±2.8	2.4±0.6	13.2±2.1	18.2±3.1	2.7±0.6
BDD-rFVIII	ZZ	43	6.4	8.7	5.8	6.5	8.9	5.3
	Matteo	46	6.2	8.8	5.9	6.6	9.3	5.9
	Tink*	50	6.8	9.3	5.4	5.7	7.5	4.1
		mean±SD	6.5±0.3	8.9±0.3	5.7±0.3	6.2±0.5	8.5±1.0	5.3±1.2

*:crossover study

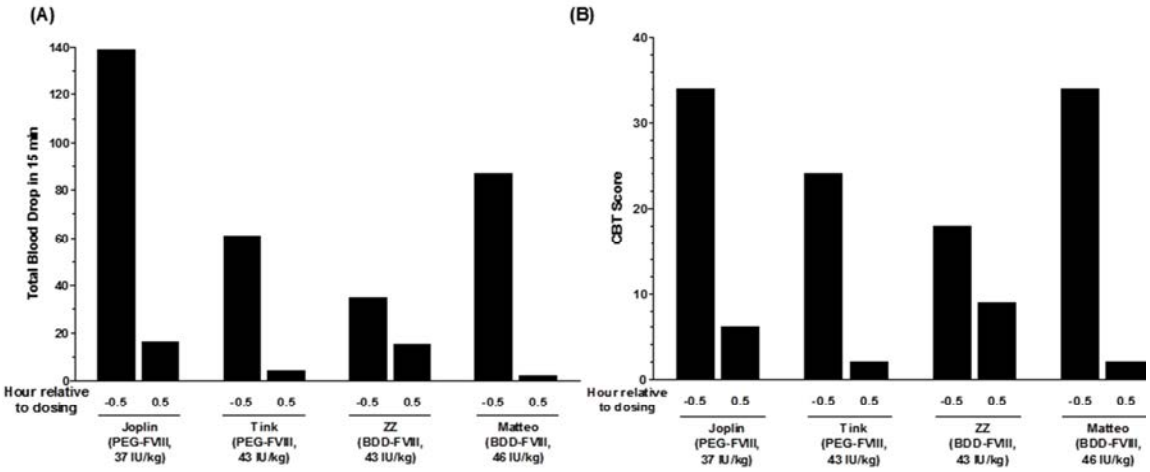


図 2.6.2.2- 6　血友病 A イヌ爪上皮出血モデルにおける BAY 94-9027 及び BDD-rFⅧの効果

(A) Total blood drops in 15 min and (B) CBT score.
Shown are values at indicated time before and after treatment for individual animals.
BDD-FVIII=BDD-rFVIII

図 2.6.2.2- 7 に示されるように、ナイーブ血友病 A イヌの WBCT は 11.5 分から 15.5 分まで様々であった。正常範囲は通常 2～6 分である。BAY 94-9027 投与後に、WBCT は 3.0±0.3 分及び 4.1±0.6 分に短縮した。同様に BDD-rFⅧを投与したイヌ 2 匹でも、WBCT は 6.0±0.1 分及び 3.9±0.6 分に正常化した。しかし、BDD-rFⅧ投与イヌの WBCT の改善（＜11.5 分）は 48 時間までであったのに対し、BAY 94-9027 投与イヌにおける WBCT の改善はより長く持続した。BAY 94-9027 投与イヌにおいて WBCT が 11.5 分未満であった時間は 72 時間及び 96 時間以上であった。

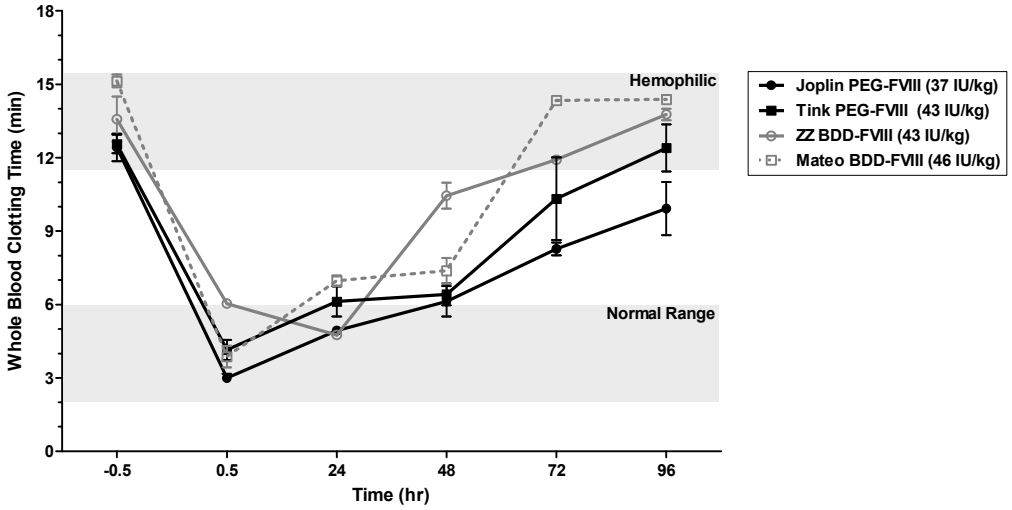


図 2.6.2.2- 7　血友病 A イヌにおける BAY 94-9027 及び BDD-rFⅧ投与後の全血凝固時間

WBCT in HemA dogs determined 0.5 before (-0.5) and 0.5, 24, 48, 72 and 96 hours (hr) post treatment with BAY 94-9027 or BDD-FVIII (BDD-rFVIII). Shown are individual dogs (Mean +/- SD from duplicated measurements at each point). The WBCT of naïve HemA dogs are indicated as grey bars named Normal Range and Hemophilic, respectively.

BDD-rFⅧと比較した BAY 94-9027 の効果を TEG で検討した。TEG は、凝固開始の反応時間（R、min）、R の終了から血栓粘性信号強度が 20mm に達するまでの時間である凝固速度（K、min）、K の間に形成される血栓の形成速度の傾きでありフィブリン形成の速度とリンクするアルファ角（度）、フィブリン塊の最大弾性度を示す最大振幅（MA、mm）を指標として評価した。ナイーブ血友病 A イヌでは、反応時間 R は 60.5～149.8min、凝固速度 K は 46.3～＞180min、アルファ角は 0～4.8 度、最大振幅 MA は 0～24.3mm であった。BAY 94-9027 及び BDD-rFⅧの投与により投与 30 分後の TEG パラメータは同等に改善し、投与後の R 及び K は投与前に比べ短縮した。更に、投与前のベースライン値に戻るまでの TEG パラメータの改善の持続時間は、BDD-rFⅧ投与イヌ 2 匹では 24 及び 48 時間であったが、BAY 94-9027 投与イヌでは 72 及び 96 時間であった（表 2.6.2.2- 5）。

以上を要約すると、血友病 A イヌにおける BDD-rFⅧの薬物動態プロファイルが部位特異的 PEG 化により、向上したと考えられる。CBT、CBT スコア、WBCT 及び TEG により評価した BAY 94-9027 の急性効果は BDD-rFⅧと同程度であった。更に、BAY 94-9027 の効果は BDD-rFⅧよりも長時間持続することが示唆された。本試験には HKB11 細胞株産生の BAY 94-9027 研究用製剤を用いたが、BHK21 細胞株産生の BAY 94-9027 製剤を用いた試験を再度実施している（2.6.2.2.2.5）。

表 2.6.2.2- 5 血友病 A イヌにおける BAY 94-9027 及び BDD-rFⅧ投与後の TEG パラメータ

Time (hr)	BAY 94-9027 Dog 1: Joplin Dose: 37 IU/kg				BAY 94-9027 Dog 2: Tink Dose: 43 IU/kg				BDD-rFVIII Dog 1: ZZ Dose: 43 IU/kg				BDD-rFVIII Dog 2: Matteo Dose: 46 IU/kg			
	R (min)	K (min)	Angle (degree)	MA (mm)	R (min)	K (min)	Angle (degree)	MA (mm)	R (min)	K (min)	Angle (degree)	MA (mm)	R (min)	K (min)	Angle (degree)	MA (mm)
-0.5	60.5	46.3	4.8	24.3	97.3	>180	0.6	2.6	121	>180	0	0	149.8	>180	0	0
0.5	20.2	10.3	19.2	42.2	22.4	8.7	24.1	49	20.3	7.2	27.5	47.2	16.7	6.7	29.9	53
24	24.5	10.3	22.6	53.7	22.8	8	26.7	57.3	25.9	11.4	21.6	59.1	26.1	8.8	24	53.7
48	16.5	6.4	33.4	63.1					24.3	8.4	28.3	66.7	23	>180	2.9	8
72	26.5	10	22.7	58.4	27.1	11.7	18.6	47.7	>180	>180	0	0	59.9	>180	1.2	2.4
96	27.4	8.5	27.2	67.1	67.1	54.6	0	24.3	119	>180	0	2.5	>180	>180	0	0
144	50.5	>180	2.5	3.9												

Note: Grey shading marks the time point when the value(s) of TEG parameter(s) are close to pre-treatment baseline.

Whole blood TEG parameter clot initiation time (R), clot formation time (K), fibrin build-up defined as the alpha-angle and the maximal clot size (MA) of individual dogs treated with BAY 94-9027 or BDD-rFVIII determined before (-0.5 hr) and after treatment

2.6.2.2.2.5 血友病 A イヌにおける BAY 94-9027 の薬物動態及び効果

参照項目: 4.2.1.1.6 CB-2012-10

BHK21 細胞株で産生された BAY 94-9027 製剤を用い、血友病 A イヌにおける 2 回目の試験を実施した。2 群に無作為割付けした計 4 匹のナイーブ血友病 A イヌを用いて、BAY 94-9027（ロット番号 27N27H0）及び BAY 14-2222（ロット番号 27N1XL）の薬物動態及び効果を検討した。各群に 50IU/kg の BAY 94-9027 又は BAY 14-2222 を Day 1 に静脈内投与した後、Day 4 まで採血・検査を行った。薬物動態は、投与後 0.25～96 時間までに採取した血漿において、Biophen FⅧ:C アッセイ（Hyphen BioMed）により測定した血漿 FⅧ活性によって評価した。薬物動態の解析には WinNonlin を用いた。急性効果は各製剤投与前 30 分及び投与後 30 分に測定した 15 分間の血液総滴下数として定義した爪上皮出血時間（CBT）及び CBT スコアで評価した。また WBCT 及び TEG

からも評価した。効果の持続は、WBCT 及び TEG の経時的変化で評価した。臨床血液学的パラメータ及び血液生化学パラメータもモニタリングした。

BAY 94-9027 投与動物における血漿中 FVⅢ活性の消失半減期（17.1±2.7 時間、平均±SD）は、BAY 14-2222 投与動物の消失半減期（3.4±0.6 時間）に比べ長かった。同様に、BAY 94-9027 の平均滞留時間（MRT）は 25.0±4.5 時間であり、BAY 14-2222 の 5.0±0.9 時間に比べ延長した。更に、BAY 94-9027 のクリアランス（CL）は 3.0±1.3mL/hr/kg であり、BAY 14-2222 の 11.3±4.7mL/hr/kg に比べ小さかった（表 2.6.2.2- 6）。

表 2.6.2.2- 6 BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の薬物動態パラメータの要約

Treatment	Dog ID	Analyzed by FVIII Activity		
		$t_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	CL (mL/hr/kg)
BAY 94-9027	Dog 1	19.0	28.2	2.0
	Dog 2	15.2	21.8	3.9
	Mean ± SD	17.1 ± 2.7	25.0 ± 4.5	3.0 ± 1.3
BAY 14-2222	Dog 1	2.9	4.3	8.0
	Dog 2	3.8	5.6	14.6
	Mean ± SD	3.4 ± 0.6	5.0 ± 0.9	11.3 ± 4.7

急性効果の観察において、BAY 94-9027 を投与したイヌ 2 匹における爪切断後の失血量は、46 滴から 34 滴、及び 261 滴から 7 滴にそれぞれ減少し（図 2.6.2.2- 8 A）、CBT スコア（定義は図 2.6.2.2- 8 の凡例参照）も、22 から 16 及び 61 から 3 にそれぞれ改善した（図 2.6.2.2- 8 B）。同様に、BAY 14-2222 を投与したイヌでは、失血量は 62 滴から 14 滴及び 115 滴から 42 滴にそれぞれ減少し（図 2.6.2.2- 8 A）、CBT スコアも 27 から 7 及び 42 から 10 にそれぞれ改善した（図 2.6.2.2- 8 B）。ナイーブ血友病 A イヌにおける CBT スコアのベースライン値には個体間のばらつきがみられるものの、BAY 14-2222 と同様に BAY 94-9027 投与による爪上皮出血に対する急性効果が確認された。

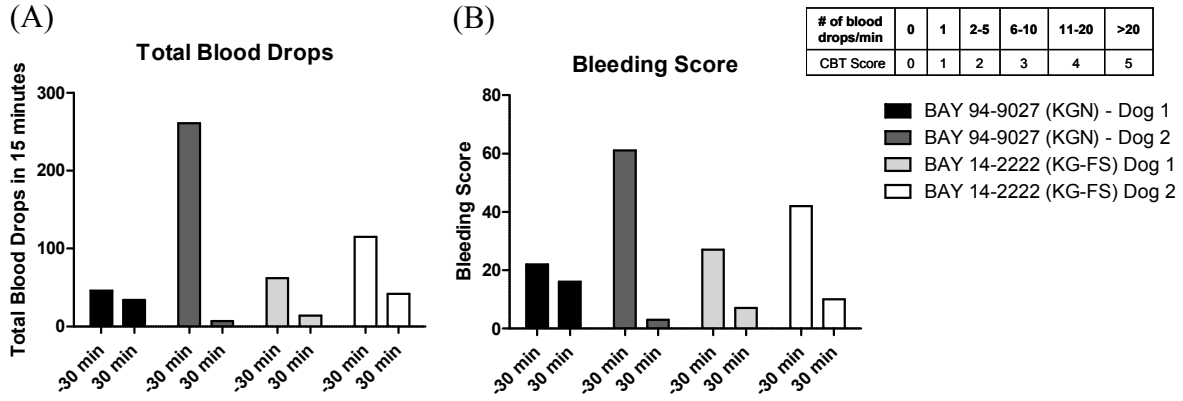


図 2.6.2.2- 8　血友病 A イヌ爪上皮出血モデルにおける BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の急性効果

(A) Total blood drops in 15 min and (B) CBT score.
Shown are values at indicated time before and after treatment for individual animals.

イヌの WBCT の正常範囲は通常 3～5 分であるが、ナイーブ血友病 A イヌの WBCT は 11.5～18 分であった（図 2.6.2.2- 9）。BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 はいずれも投与後 30 分の WBCT を完全に正常化し、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 投与 30 分後の WBCT は約 5 分に短縮した。しかし、

BAY 14-2222 を投与したイヌの WBCT が 96 時間までに血友病レベルまで戻ったのに対し、BAY 94-9027 を投与したイヌでは少なくとも 96 時間まで部分的改善が持続した（図 2.6.2.2- 9）。

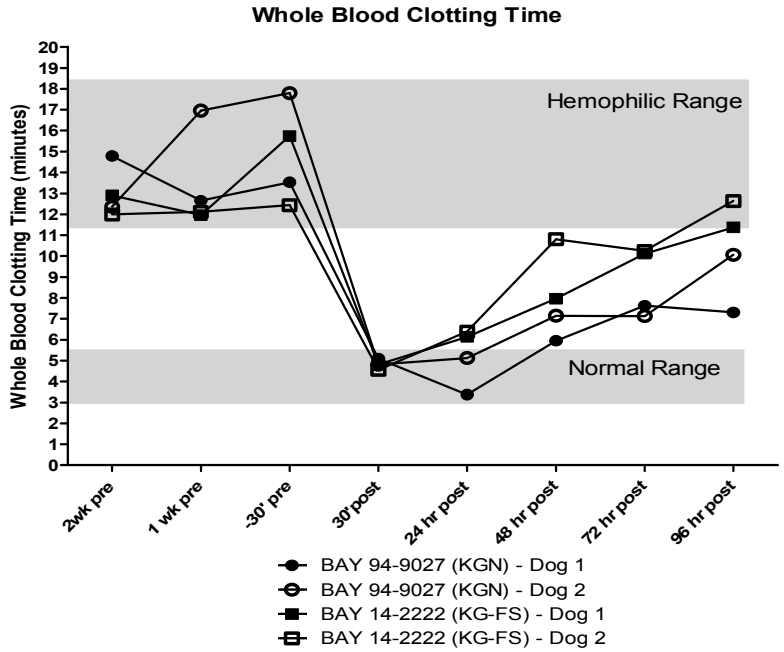


図 2.6.2.2- 9　血友病 A イヌにおける BAY 94-9027 投与後の全血凝固時間の正常化

WBCT was determined at 2 weeks, 1 week, and 30 min prior to, and then 30 min, 24, 48, 72, and 96 hr post treatment with BAY 94-9027 or BAY 14-2222 at specified dose in each individual dog. Grey shadings indicate the hemophilic and normal ranges of WBCT defined in the same colony.

BAY 14-2222 と比較した BAY 94-9027 の効果を全血 TEG で評価した。投与 30 分前のナイーブ血友病 A イヌの反応時間 R は長く 55.7～＞200min、フィブリン形成は遅くアルファ角は 0～1.4 度、最大振幅 MA は 0～11.5mm であった。BAY 94-9027 投与 30 分後の R は顕著に短縮し 22.3 及び 31.4min、アルファ角は上昇し 19 及び 14.1 度、MA も上昇し 48.4 及び 44.8mm となった。BAY 14-2222 投与動物では、R は 15.5 及び 16.8min、アルファ角 41.7 及び 33.8 度、MA は 54.9 及び 50.0mm であった（表 2.6.2.2- 7）。BAY 94-9027 投与動物の TEG パラメータの改善は少なくとも 48 時間持続したが、BAY 14-2222 の TEG パラメータの改善は 24 時間付近までであり、その後は投与前のベースライン値に復した。

表 2.6.2.2- 7 血友病 A イヌにおける BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 投与後の TEG パラメータ

	BAY 94-9027 Dog 1			BAY 94-9027 Dog 2			BAY 14-2222 Dog 1			BAY 14-2222 Dog 2		
time	R (min)	Angle (degree)	MA (mm)	R (min)	Angle (degree)	MA (mm)	R (min)	Angle (degree)	MA (mm)	R (min)	Angle (degree)	MA (mm)
2 wk pre	93.4	N/A	N/A	203.4	N/A	N/A	55.7	1.4	2.8	82.3	1.1	3.4
1 wk pre	202.2	N/A	2.1	200.9	N/A	N/A	108.5	N/A	N/A	75.5	N/A	11.5
- 30' pre	167.6	N/A	N/A	-	-	-	187.3	N/A	N/A	201.3	N/A	N/A
30' post	22.3	19	48.4	31.4	14.1	44.8	15.5	41.7	54.9	16.8	33.8	50.9
24 h post	19.3	26.7	56.5	37.8	4.8	8.7	18.1	6	12.2	93	0.6	2.1
48 h post	55	1.1	2.6	33.4	3	4.1	99	0.5	N/A	108.8	N/A	N/A
72 h post	199.5	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	155	0.9	N/A	100.3	N/A	N/A
96 h post	200.8	N/A	2	N/A	N/A	N/A	131.3	N/A	N/A	84.2	N/A	0.8

Note: N/A: sample failed to initiate clotting within the recording period (N/A was considered as "0");
pre: pretreatment; post: post treatment; Grey shading marks the time point when the value(s) of TEG parameter(s) are close to pre-treatment baseline.

要約すると、血友病 A イヌにおいて、BAY 94-9027 投与時の血漿中 FⅧ活性の消失半減期は BAY 14-2222 投与時よりも長かった。BAY 94-9027 投与動物における投与 30 分後の CBT 及び CBT スコアは投与前に比べ改善したことから急性効果が認められ、その効果は BAY 14-2222 とほぼ同等であった。急性効果が同等であることは、WBCT 及び TEG からも裏付けられた。また、WBCT 及び TEG の経時的変化から、BAY 94-9027 による効果は BAY 14-2222 よりも長時間持続することが示唆された。

2.6.2.2.3 探索的免疫原性試験

2.6.2.2.3.1 BAY 94-9027 に反応する抗 PEG 抗体のアイソタイプと反応性

参照項目: 4.2.1.1.7 PH-39382

2 系統の野生型雄性マウス（BALB/C 及び C57BL/6、5 匹/群）に BAY 94-9027（ロット番号 270LKKV 及び 270R4GJ）を投与し、PEG 化 FⅧ（BAY 94-9027）に反応する抗体の特性を検討した。本試験の目的は、BAY 94-9027 が抗薬物 IgM 反応を誘発するか否か、またその反応が T 細胞非依存性か否かを検討することであった。マウスに 0.1mg/kg（およそ 1000IU/kg に相当）の BAY 94-9027 を静脈内投与し、IgM 及び IgG 抗体価を半定量的に測定した。

BAY 94-9027 投与後 10 日までのマウス血漿を解析した結果、抗 PEG 抗体反応がみられたが、IgM アイソタイプのみであった。また、反復投与しても IgG アイソタイプへのクラススイッチは認められなかった（図 2.6.2.2- 10、両系統で同様な結果であったことから、BALB/C マウスの結果のみ示す）。この抗 PEG IgM 反応は、Toll 様受容体（TLR）リガンドである LPS 又は R848 の共存による炎症誘発下（免疫応答を活性化させるアジュバントとして機能すると考えられる）で認められた（ピークは投与後 2～4 日）。抗 PEG IgM 上昇がみられた TLR リガンド併用投与マウスにおいても、BAY 94-9027（単独）2 回目投与後の抗 PEG IgM 反応に、大幅な増強は認められなかった。一方、BAY 94-9027 の FⅧ部分に対する抗体反応は、TLR リガンド併用投与マウスでの BAY 94-9027（単独）2 回目投与で、IgG アイソタイプへのクラススイッチが生じ、反応も大幅に増強した（図 2.6.2.2- 11、同様に BALB/C の結果のみ示す）。また、8 ヵ月間の休薬後に再度

BAY 94-9027 を 10 日間に 4 回反復投与し、抗 PEG IgM 及び IgG 反応を測定した。その結果、抗 PEG IgM 反応が認められたが、新たな（de-novo）抗 IgM 産生及び IgG へのクラススイッチは認められなかった。これらの結果より、BAY 94-9027 の PEG 部分に対する IgM 反応は、IgG へクラススイッチしない T 細胞非依存性の反応であると推定され、IgM を高親和性 IgG へと抗体反応を増強、成熟させるメモリーB 細胞及びヘルパーT 細胞の活性化はないと考えられた。

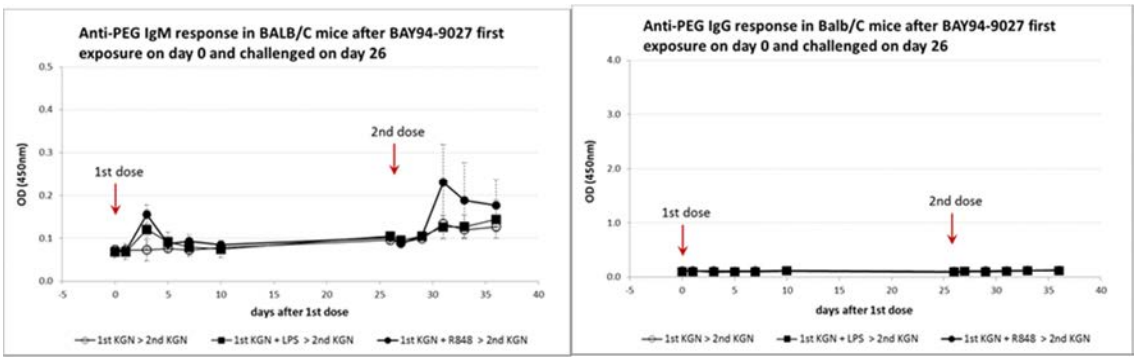


図 2.6.2.2- 10　BAY 94-9027 曝露後の PEG 応答性 IgM 反応（左）及び IgG 反応（右）

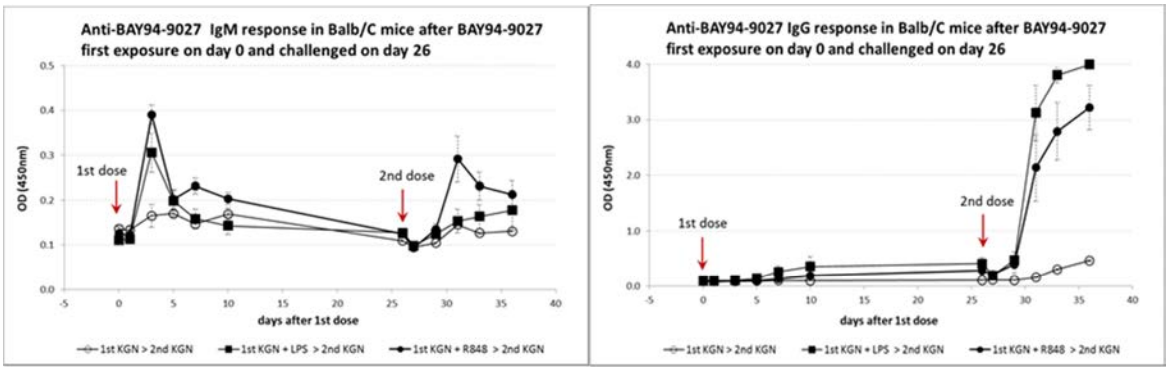


図 2.6.2.2- 11　BAY 94-9027 曝露後の BAY 94-9027 応答性 IgM 反応（左）及び IgG 反応（右）

2.6.2.2.3.2　探索的 BAY 94-9027 単回投与ミニブタ試験

参照項目：4.2.1.1.8 PH-39379

本試験の目的は、若齢ミニブタが様々な薬物動態や投与関連反応のモデルとして利用できるか否かを検討することであった。若齢ミニブタに BAY 94-9027（ロット番号 270R4GJ）を単回投与し、BAY 94-9027 の薬物動態及び投与部位反応、並びに抗 PEG 抗体産生、補体活性化、抗薬物抗体（ADA）産生の相互関係を検討した。

ナイーブ Goettingen 雄性ミニブタ 5 匹で、BAY 94-9027 単回投与後の薬物動態を評価した。Day 1 に耳静脈より BAY 94-9027 100IU/kg を投与し、Day 2（＝24 時間）まで血液を採取して解析した。薬物動態学的半減期は、内因性ブタ FⅧを除去した後、血漿中の BAY 94-9027 を抗 PEG 抗体で捕捉し、合成基質法で血漿中 FⅧ活性を求めることにより算出した。また試験期間を通して投与部位の観察を行った。

いずれのミニブタにおいても投与部位反応の徴候は認められなかった。主要評価項目（薬物動態、投与部位反応）に影響が認められなかったことから、副次的評価項目（抗 PEG 抗体、補体活性化、ADA）は測定しなかった。

若齢ミニブタを用いた本探索的試験において、BAY 94-9027 に対する投与部位反応は認められなかった。本モデルは、臨床試験でみられた過敏症反応等（2.5.5.3.3.3.2）を再現しないと考えられたことから、本モデルを用いた更なる検討は実施しなかった。

2.6.2.2.3.3 BAY 94-9027 の免疫原性プロファイル検討のための試験

参照項目: 4.2.1.1.9 PH-39381

In vitro 及び *in vivo* 機序検討試験により、PEG 化 FVⅢである BAY 94-9027（ロット番号：949027T070209）の免疫原性について検討した。

健康成人（8 例）の末梢血単核細胞（PBMC）由来の樹状細胞（DC）4×10^6/mL を FVⅢ（3.5nmol）と 30 分間インキュベート後、DC 内から回収された FVⅢを ELISA キットで定量し、DC による FVⅢ取込みを評価した。その結果、ヒト DC による BAY 94-9027 の取込みは、非 PEG 化 FVⅢである BAY 14-2222 及び BDD-rFVⅢの取込みに比べて低かった（図 2.6.2.2- 12 左図）。次に、インヒビターを有する血友病 A 患者由来の 2 つの T 細胞株（1×10^4/well）を用いて、FVⅢを取り込ませたヒト DC（1×10^3/well）と 24 時間インキュベートし、FVⅢ特異的 T 細胞の活性化〔^{3}H-チミジン取込みを指標とした細胞増殖、並びにインターフェロンγ（IFNγ）産生〕を評価した。その結果、BAY 94-9027 による T 細胞活性化も非 PEG 化 FVⅢ（BAY 14-2222 及び BDD-rFVⅢ）より弱かった（図 2.6.2.2- 13）。血友病 A マウス脾臓由来の DC を用いた検討（6 回の試験）においても、BAY 94-9027 の取込みは、非 PEG 化 FVⅢに比べ低いことが確認された（図 2.6.2.2- 12 右図）。

雄性血友病 A マウス（12 匹/群）を用いた *in vivo* 試験において、PEG 化 FVⅢである BAY 94-9027 及び非 PEG 化 FVⅢである BAY 14-2222 を 13～200IU/kg 週 1 回 5 週間反復投与し、結合抗体及び中和抗体の産生（頻度及び力価）を測定（21 及び 36 日目）した結果、BAY 14-2222 投与群に比べ BAY 94-9027 投与群での結合抗体及び中和抗体産生は低かった。200IU/kg を週 1 回 4 週間反復投与したフォローアップ試験（12 匹/群）の結果を図 2.6.2.2- 14 A に示す。BAY 14-2222 投与群の 21 日目の抗 FVⅢ結合抗体価は BAY 94-9027 投与群の約 7 倍であり、抗体価の平均±SE は、それぞれ 165±73 及び 22±20 であった。4 回目投与 3 日後に採取した脾臓 T 細胞の *ex vivo* 解析において、^{3}H-チミジンの取込みで測定した T 細胞の Stimulation Index（SI、FVⅢ刺激／溶媒刺激）の平均値は、BAY 14-2222 投与群の FVⅢ（BAY 14-2222）刺激時のみ陽性の域値 2.0 を上回った（平均±SE は 3.0±0.7、灰色四角、図 2.6.2.2- 14 B）。これに対し、BAY 94-9027 投与群の T 細胞は FVⅢ（BAY 14-2222、灰色丸）及び PEG 化 FVⅢ（BAY 94-9027、白丸）のいずれの刺激に対しても反応を示さなかった（SI はそれぞれ 1.4±0.1 及び 1.1±0.1）ことから、BAY 94-9027 を反復投与しても、FVⅢ特異的 T 細胞の増殖は低く維持されることが示唆された。抗 FVⅢ結合抗体価が高かった BAY 14-2222 投与群の 6 匹は、T 細胞の SI もおおむね高いことから（図 2.6.2.2- 14 A 及び B）、抗体価と T 細胞活性化は相関していることが示唆された。BAY 94-9027 を投与したマウスの T 細胞は、PEG 化 FVⅢ（BAY 94-9027）刺激に対して弱い反応しか示さなかった。前述の *in vitro* で確認されたマウス DC による PEG 化 FVⅢ（BAY 94-9027）の取込みの低さが、*in vivo* での免疫原性の低下に影響していると考えられた。

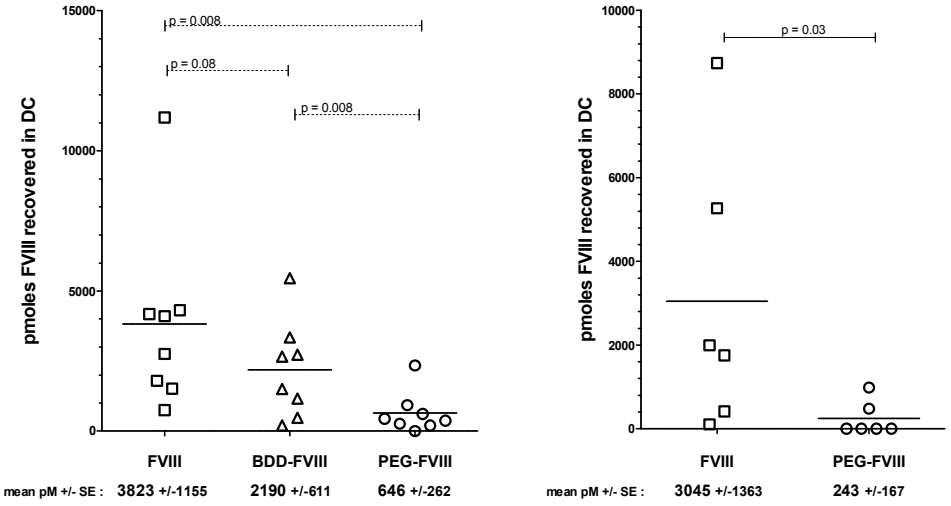


図 2.6.2.2- 12 健康成人 PBMC（左図）及び血友病 A マウス脾臓（右図）由来の樹状細胞による FⅧ、BDD-rFⅧ及び PEG-FⅧの取込み

Statistical analysis: Student's t-test,
PEG-FVIII=BAY 94-9027, FVIII=BAY 14-2222, BDD-FVIII=BDD-rFVIII

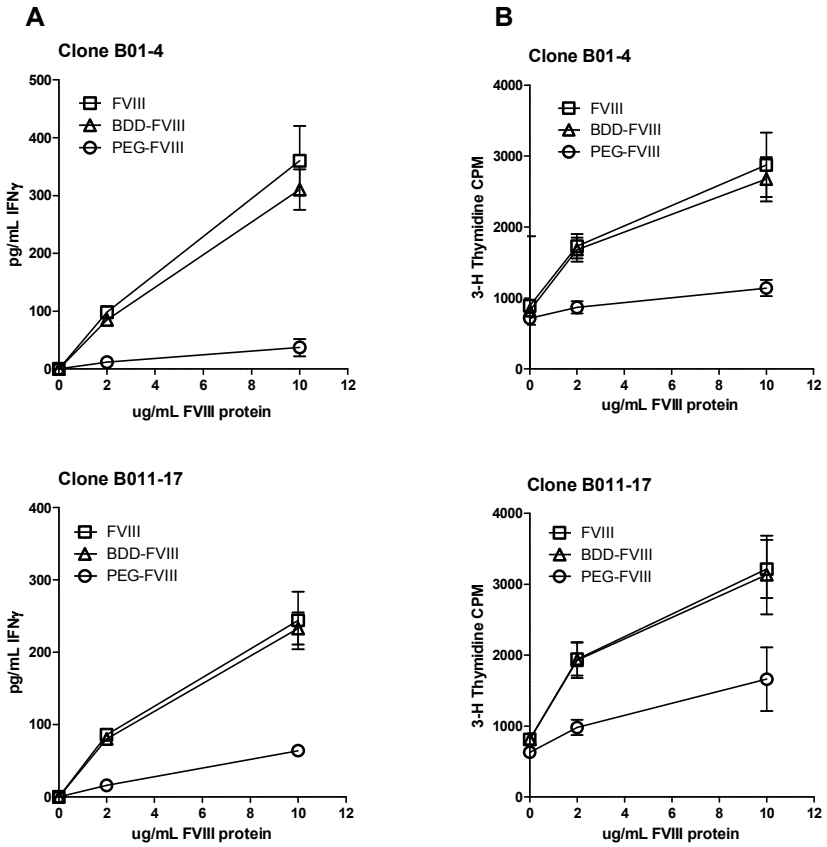


図 2.6.2.2- 13 FⅧインヒビター患者由来のヒト T 細胞の活性化

Mean +/- SD of triplicate wells,
PEG-FVIII=BAY 94-9027, FVIII=BAY 14-2222, BDD-FVIII=BDD-rFVIII.

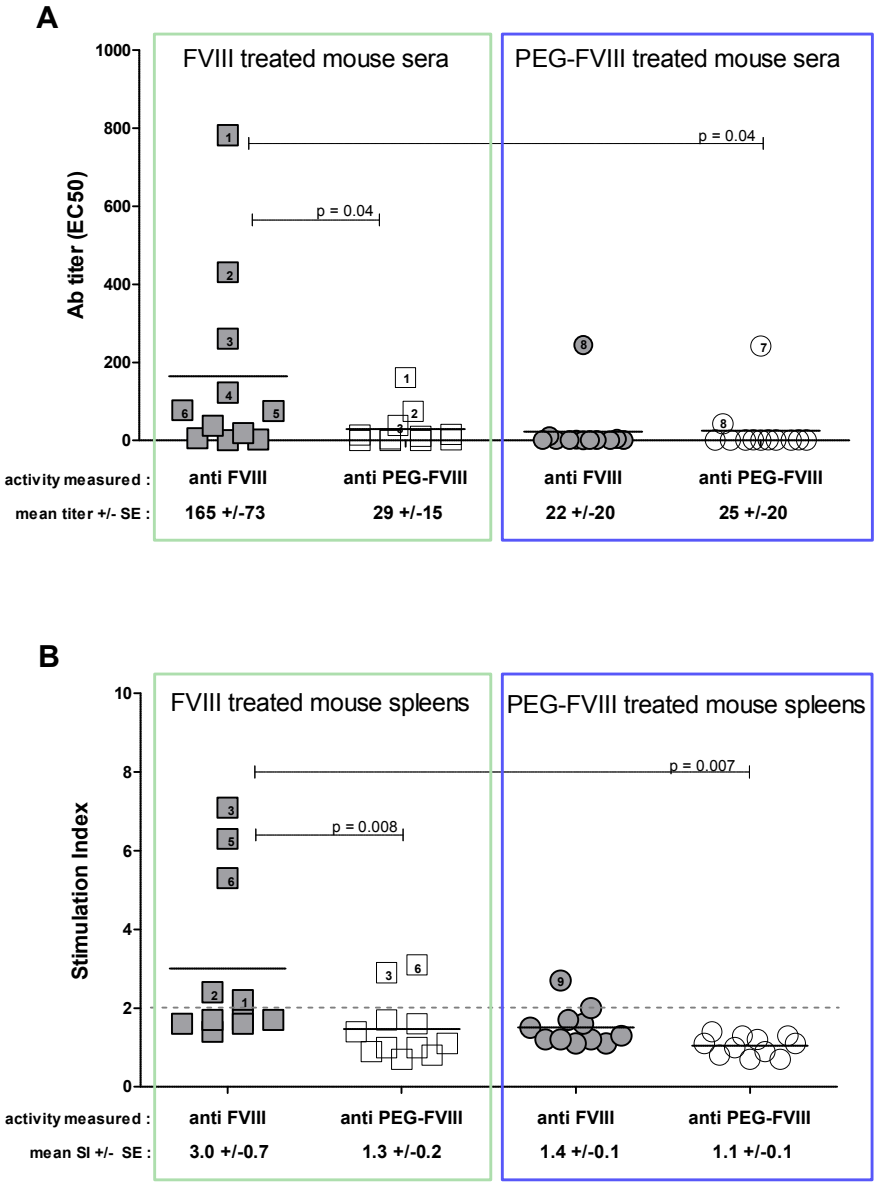


図 2.6.2.2- 14　FⅧ（左図）又は PEG-FⅧ（右図）投与血友病 A マウスの抗薬物抗体産生（A）及び脾臓 T 細胞応答性（B）

(A) ADA formation in FVIII- and PEG-FVIII–treated mouse sera.
Titers were expressed as median effective concentration (EC50; calculated using nonlinear regression of anti-FVIII positive control signal as the upper constraint).
(B) T-cell responsiveness in FVIII- and PEG-FVIII–treated mouse spleens
The dotted line (SI = 2) represents the threshold for positive responses
Statistical analysis: Mann- Whitney U-test,
PEG-FVIII=BAY 94-9027, FVIII=BAY 14-2222

2.6.2.3 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

類薬等の知見が十分あることから、生命維持に重要な器官系に対する BAY 94-9027 の影響を詳細に検討する独立した安全性薬理試験の実施は必要ないと考えられたため、中枢及び末梢神経系、並びに腎機能の安全性薬理パラメータ測定をラット 2 週間反復投与毒性試験に組み込み評価した。投与経路は、臨床投与経路に準じ静脈内投与とした。

BAY 94-9027 は、治療歴のある血友病 A 患者を対象とする補充療法に用いられる予定の PEG 化高分子たん白質である。rFⅧ及び PEG は広範な非臨床試験成績と市販後の臨床経験を有するよく知られた分子であり、rFⅧ及び PEG のいずれも、中枢及び末梢神経系、心血管系、並びに呼吸器系などの生命維持に重要な器官系に対し影響を及ぼさないと考えられている。このため、ICH S6(R1)ガイドラインも踏まえ、BAY 94-9027 に関する独立した安全性薬理試験は実施しなかった。

BAY 94-9027 の rFⅧたん白質部分は、PEG が結合するアミノ酸（システイン）及び B ドメインの欠失を除き、既承認の rFⅧ製剤である BAY 14-2222 及び BAY 81-8973（コバールトリイ、2.6.1）と同じアミノ酸配列を有する。BAY 81-8973 の麻酔ビーグル犬における心血管系の安全性薬理試験及び覚醒・非拘束ラットにおける呼吸器系の安全性薬理試験において、臨床的に問題となるような影響は認められていない。また、PEG の曝露・毒性関係については、動物試験において十分検討されており、生物製剤のたん白質部分に結合された PEG は特別な懸念をもたらさず、ヒトに対するリスクを示さないことが報告されている[1)]。PEG の安全性については、2.6.6.8.6 にも要約されている。更に、ペグインターフェロンアルファ-2a[2)]及びエポエチンベータペゴル[3)]のサル又はイヌにおける心血管系及び呼吸器系の安全性薬理試験成績において、影響は無修飾の親化合物で認められたものと同様であり、PEG 化は PEG 分子に関わる特定の有害事象を示さないことが明らかにされている。

2.6.2.4.1 中枢神経系

表 2.6.2.4- 1 中枢神経系に対する BAY 94-9027 の影響の評価

Test System (incl. Species/ Strain)	Method of Administration, Vehicle Formulation	Doses (Dose Volumes)	Gender and No. per Group	Noteworthy findings	Report Number	GLP (yes/ no)
Comparative 2-week toxicity study (administration: every other day with a 4 weeks recovery period) (rat/Sprague Dawley)	IV (2.4 mL/min)		Males N＝10	CNS endpoints were assessed after administration on day 1:	4.2.3.2.1 A48103	yes
	Vehicle (excipients*)	0 (vehicle*) (~5.6 mL/kg)				
	BAY 94-9027	75 IU/kg (~0.2 mL/kg)				
		750 IU/kg (~1.9 mL/kg		No findings		
		2250 IU/kg (~5.6 mL/kg)				
	Reference compound: BAY 14-2222**	2250 IU/kg (~5.6 mL/kg)		No findings		

*: 20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm Polysorbate 80
**: Kogenate FS (full length rFVIII)

BAY 94-9027 0（溶媒）、75、750 及び 2250IU/kg をラットに 2 週間反復投与した毒性試験（隔日投与後、4 週間の回復期間）において、Day 1 の静脈内投与後の雄性ラットで、中枢及び末梢神経系機能に対する BAY 94-9027（ロット番号 949027T070209）の影響を検討した。また、比較対照として BAY 14-2222（ロット番号 27N1XL1T）を投与した。薬剤又は溶媒投与 15 分後、4 及び、24 時間後に、中枢神経系、自律神経系、神経筋及び感覚運動系、並びに生理機能の各パラメータ（例、行動、自発運動、歩行、筋緊張、伸筋及び屈筋の痙攣、眼瞼下垂、カタレプシー、運動協調性、握力、直腸温、痛覚、立ち直り反射、瞳孔反射、角膜反射、耳介反射、呼吸）について評価した（表 2.6.2.4- 1）。

最高用量まで、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 投与動物に溶媒投与と比べ特記すべき影響は認められなかった。

2.6.2.4.2 腎機能

表 2.6.2.4- 2 腎機能に対する BAY 94-9027 の影響の評価

Test System (incl. Species/ Strain)	Method of Administration, Vehicle Formulation	Doses (Dose Volumes)	Gender and No. per Group	Noteworthy findings	Report Number	GLP (yes/ no)
Comparative 2-week toxicity study (administration: every other day with a 4 weeks recovery period) (rat/Sprague Dawley)	IV (2.4 mL/min)		Males N＝10	Renal function endpoints were assessed after administration on day 3:	4.2.3.2.1 A48103	yes
	Vehicle (excipients*)	0 (vehicle*) (~5.6 mL/kg)				
	BAY 94-9027	75 IU/kg (~0.2 mL/kg)				
		750 IU/kg (~1.9 mL/kg)		No findings		
		2250 IU/kg (~5.6 mL/kg)				
	Reference compound: BAY 14-2222**	2250 IU/kg (~5.6 mL/kg)		No findings except for slight increase in osmolar clearance due to increased K^+ excretion		

*: 20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm Polysorbate 80
**: Kogenate FS (full length rFVIII)

前項と同様にラット 2 週間反復投与毒性試験（14 日間隔日投与後、4 週間の回復期間）において、Day 3 の BAY 94-9027 静脈内投与後の雄性ラットで、腎機能に対する BAY 94-9027 の影響を検討した。また、比較対照として BAY 14-2222 を投与した。静脈内投与後 5 時間までの尿を採取し、蓄尿の最後に、各動物から血液を採取した。尿量、電解質（Na^+、K^+）排泄、クレアチニン排泄、N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ（NAG）、総たん白、クレアチニンクリアランス、血清中尿素及び血清中クレアチニン濃度、浸透圧クリアランス等のパラメータを測定した（表 2.6.2.4- 2）。

検討したすべての用量で BAY 94-9027 は、尿量及び電解質（Na^+、K^+）排泄量、クレアチニンクリアランス、浸透圧クリアランスに統計学的に有意な影響を及ぼさなかった（Dunnet-test）。糸球体及び尿細管障害のマーカーと考えられる総たん白と NAG の尿中排泄も増加しなかった。BAY 14-2222 を投与した動物では、カリウム排泄亢進による浸透圧クリアランスのわずかな上昇がみられたことを除き、腎機能に変化は認められなかった。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用

[redacted]において、鎮痛剤との薬力学的薬物相互作用の可能性について言及があったことから、以下のように既知の情報や文献検索情報に基づき考察した。

μ-、δ-、又はκ-オピオイド受容体に結合し中枢神経系の薬理作用を発揮するフェンタニル、モルヒネ、コデイン、ペチジン、アルフェンタニル及びスフェンタニルなどの鎮痛剤は、がんや外科的手術における痛みなどの疼痛緩和に使用される。一方、BAY 94-9027 は、導入システイン残基（K1804C）に、分子量 60kDa の分枝型 PEG を部位特異的に結合させた B ドメイン欠失遺伝子組換えヒト FVⅢであり、循環血液中に投与されることで、血液凝固能を回復させる。したがって、鎮痛剤と BAY 94-9027 の薬理作用は全く異なる生理作用に対して機能することから、それらの間の薬力学的薬物相互作用は予想されない。また、*in vitro* の組織交差反応性試験においても、PEG 化 FVⅢである BAY 94-9027 と非 PEG 化 FVⅢである BAY 14-2222 の結合性に差は認められなかったことから（2.6.6.8.4）、BAY 94-9027 は BAY 14-2222 と同じ挙動を示すと考えられ、予想外の薬力学的薬物相互作用が生じる可能性は低い。

上記の考察に加え、市販の PEG 化製剤（ペグインターフェロンアルファ-2a、ペグインターフェロンアルファ-2b、エポエチンベータペゴル、ペグフィルグラスチム、ペガプタニブナトリウム、セルトリズマブペゴル等）に関する文献検索を行った。メサドン（鎮痛剤）維持療法を受けている慢性 C 型肝炎患者、並びに C 型肝炎及び HIV 同時感染患者のペグインターフェロンアルファ-2b の臨床試験において、メサドンとペグインターフェロンアルファ-2b の明らかな薬物相互作用は認められなかったこと[4,5]、また、メサドン維持療法を受けている慢性 C 型肝炎患者において、ペグインターフェロンアルファ-2a の投与はメサドンの薬物動態に影響を及ぼさず、メサドンとペグインターフェロンアルファ-2a の薬物相互作用は生じないこと[6]を示した報告はあったが、鎮痛剤と PEG 化製剤の間の薬力学的薬物相互作用を示唆する報告はなかった。また、*in vitro* 胃モデルにおいて、モルヒネ遊離における PEG の影響を検討した結果、モルヒネの遊離に PEG は影響しないことが報告されている[7]。

以上のように、鎮痛剤と市販の PEG 化製剤又は PEG との間で薬物相互作用が認められていないことから、本剤の薬力学的薬物相互作用試験は必要ないと判断し、試験は実施しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

BAY 94-9027 の *in vitro* 凝固活性は、合成基質法及び凝固一段法で確認されている（2.3.P.2.2.3.11）。BAY 94-9027 の *in vivo* 有効性については、モデル動物を用いた効力を裏付ける試験で評価した。血友病 A マウスを用いた試験には、毒性試験（GLP）や第Ⅰ相臨床試験に使用されている BHK21 細胞株産生製剤を用いて実施した。血友病 A イヌを用いた試験は、HKB11 細胞株産生製剤（研究用製剤）及び BHK 細胞株産生製剤（臨床試験用製剤）を使用した。

血友病 A マウス尾切断出血モデルにおける BAY 94-9027 の急性効果は、BAY 14-2222〔コージネイト FS（既承認の完全長 rFⅧ製剤）〕と同等であった。血友病 A マウス TVT モデルで検討した BAY 94-9027 の出血予防効果は、消失半減期の延長とも合致し、BAY 14-2222 よりも長時間持続した。また、BAY 94-9027 は血友病 A イヌにおいても、出血に対して急性効果を示すとともに、BAY 14-2222 に比べ出血予防効果の延長が示唆された。

BAY 94-9027 は内因系凝固カスケードにおいて補助因子として機能する。これは既承認の rFⅧ製剤である BAY 14-2222 と同じ機序であるが、BAY 94-9027 は BAY 14-2222 よりも長時間、循環血液中に有効なレベルで維持される。PEG 化による BAY 94-9027 の活性低下はなく、動物モデルで確認されたように出血時補充療法に BAY 94-9027 を使用可能であることが裏付けられた。また、循環血液中での消失半減期の延長により、BAY 14-2222 と比較して出血予防効果が延長（止血効果が持続）していることから、BAY 94-9027 の定期補充療法としての有用性が期待できる。

BAY 94-9027 の臨床試験で認められた過敏症反応と有効性の欠如について（2.5.5.3.3.3.2）検討するための探索的免疫原性試験を実施した。ミニブタを用いた探索試験においては、静脈内投与に関連する反応が認められなかったことから、ミニブタモデルは BAY 94-9027 の影響の検討には適切ではないと判断した。野生型マウス（2 系統）を用いた試験において PEG 化 FⅧである BAY 94-9027 に対する ADA 反応を検討した結果、BAY 94-9027 の PEG 部分に対する IgM 反応が認められ、これは T 細胞非依存性であった。また、IgG アイソタイプへのクラススイッチは示唆されなかった。BAY 94-9027 の免疫原性プロファイルを検討する機序試験では、血友病 A マウスの *in vivo* 免疫原性試験（2.6.6.8.2）と同様の結果が確認され、更に、血友病 A マウスにおける BAY 94-9027 に対する抗体反応の低減及び遅延は、樹状細胞への PEG 化 FⅧの取込みの低さによるものである可能性が高いことが示唆された。

rFⅧ及び PEG はいずれも、広範な非臨床試験成績と市販後の臨床経験を有するよく知られた分子である。ともに生命維持に重要な器官系に対して影響を及ぼさず、安全と考えられている。したがって、BAY 94-9027 に関して独立した安全性薬理試験は実施しなかったが、中枢神経系及び腎機能に関する安全性薬理学的パラメータを、BAY 94-9027 のラットにおける 2 週間反復投与毒性試験（14 日間隔日投与後、4 週間の回復期間）に組み込み評価した。中枢神経系、自律神経系、神経筋系及び感覚運動系、並びに生理機能の各パラメータに対する影響は認められず、尿量及び電解質（Na^+、K^+）排泄などの腎機能パラメータにも影響はみられなかった。更に、クレアチニンクリアランス、総たん白及び N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ排泄などの糸球体及び尿細管機能のマーカーの上昇も認められなかった。

以上より、BAY 94-9027 は急性効果及び長期予防効果を有しており、また安全性薬理の観点からも、臨床的に問題となるような所見は認められなかった。

2.6.2.7　図表

図及び表は本文中に記載した。

引用文献一覧

1) Webster R et al., Drug Metab Dispos 2007:35:9-16　(4.3.1)

2) FDA, Pharmacology/Toxicology Review of PEGASYS for hepatitis C, 2001, http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm094465.pdf, Accessed 2017 Jun (4.3.2)

3) FDA, Pharmacology/Toxicology Review and Evaluation, product Mircera, 2007, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/125164s000_PharmR_P1.pdf, Accessed 2017 Jun (4.3.3)

4) Berk SI et al., Clin Ther 2007:29:131-138 (4.3.4)

5) Gupta SK et al., J Clin Pharmacol 2007:47:604-612 (4.3.5)

6) Sulkowski M et al., Clin Pharmacol Ther 2005:77:214-224 (4.3.6)

7) Hodgman M et al., J Med Toxicol 2016:12:391-395 (4.3.7)

2.6.3.1 薬理試験： 一覧表

Test Articles: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Type of Study	Test System	Lots used	Drug products GLP lot (yes/no)	Reference/ Report
Primary Pharmacodynamics				
In vitro				
Assessment of effects of BAY 94-9027 on clotting in diluted normal plasma of dog, rabbit, and human using the aPTT assay	Dog, Rabbit, Human	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[1]: 27N1XL1T	Yes	4.2.1.1.1 CB-2011-07
In vivo				
Pharmacokinetics of BAY 94-9027 in a hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[1]: 27N1XL1T	Yes	4.2.1.1.2 CB-2010-10
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 in the tail clip bleeding model of hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[1]: 27N1XL1T	Yes	4.2.1.1.3 CB-2010-11
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 in the tail vein transection model of hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[1]: 27N1XL1T	Yes	4.2.1.1.4 CB-2010-12
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94-9027 in hemophilia A dogs	Hemophilia A Dog	BAY 94-9027: 2007.046-80 Early SP BDD-rFVIII[2]: 2007.076-01 QDP	No	4.2.1.1.5 CB-2009-29
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94-9027	Hemophilia A Dog	BAY 94-9027: 27N27H0 BAY 14-2222[1]: 27N1XL	Yes	4.2.1.1.6 CB-2012-10
Exploratory Immunogenicity				
Anti-PEG antibody response to BAY 94-9027 is IgM isotype and transient	Mouse	BAY 94-9027: 270LKKV and 270R4GJ	Yes	4.2.1.1.7 PH-39382
Exploratory BAY 94-9027 single dose mini pig study	Mini pig	BAY 94-9027: 270R4GJ	Yes	4.2.1.1.8 PH-39379
Mechanistic in vitro and in vivo studies indicate reduced immunogenicity profile for PEG-FVIII, BAY 94-9027	Mouse, human	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[1]: 27N1XL1T	Yes	4.2.1.1.9 PH-39381

Type of Study	Test System	Lots used	Drug products GLP lot (yes/no)	Reference/ Report
Secondary Pharmacology	ND	-	-	-
Safety Pharmacology				
Effects on central or peripheral nervous system, renal function and metabolism incl. systemic exposure	Rats	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[1]: 27N1XL1T	Yes	4.2.3.2.1 A48103
Pharmacodynamic Drug Interaction	ND	-	-	-

[1] BAY 14-2222/ KG-FS/FVIII is Kogenate FS, full length unmodified rFVIII
[2] BDD-rFVIII is B-domain deleted rFVIII
ND: Not done

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Primary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD (Report Number)
Primary Pharmacodynamics				
In vitro				
Assessment of effects of BAY 94-9027 on clotting in diluted normal plasma of dog, rabbit, and human using the aPTT assay	Dog, Rabbit, Human	In vitro	Bayer US (Richmond, CA, US)	4.2.1.1.1 (CB-2011-07)
In vivo				
Pharmacokinetics of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in a hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	iv bolus	Bayer US (Richmond, CA, US)	4.2.1.1.2 (CB-2010-10)
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in the tail clip bleeding model of hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	iv bolus	Bayer US (Richmond, CA, US)	4.2.1.1.3 (CB-2010-11)
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in the tail vein transection model of hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	iv bolus	Bayer US (Richmond, CA, US)	4.2.1.1.4 (CB-2010-12)
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 2007.046-80 Early SP in hemophilia A dogs	Hemophilia A Dog	iv bolus	Bayer US (Richmond, CA, US)	4.2.1.1.5 (CB-2009-29)
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 27N27H0	Hemophilia A Dog	iv bolus	Bayer US (San Francisco, CA, US)	4.2.1.1.6 (CB-2012-10)
Exploratory Immunogenicity				
Anti-PEG antibody response to BAY 94-9027 is IgM isotype and transient	Mouse	iv bolus	Bayer US (San Francisco, CA, US)	4.2.1.1.7 (PH-39382)
Exploratory BAY 94-9027 single dose mini pig study	Mini pig	Intravenous	Bayer US (San Francisco, CA, US)	4.2.1.1.8 (PH-39379)

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Primary Pharmacodynamics – Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD (Report Number)
Mechanistic in vitro and in vivo studies indicate reduced immunogenicity profile for PEG-FVIII, BAY 94-9027	Mouse, human	iv bolus, in vitro	Bayer US (San Francisco, CA, US)	4.2.1.1.9 (PH-39381)

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222

Primary Pharmacodynamics – in vitro study

Type of study	Species	Method	Doses [IU/kg]	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report No.)
Assessment of effects of BAY 94-9027 on clotting in diluted normal plasma of dog, rabbit, and human using the aPTT assay	Dog, Rabbit, Human	aPPT with plasma	BAY 94-9027: 0.078-10 IU/mL BAY 14-2222[1]: 0.078-10 IU/mL	BAY 94-9027 compared to BAY 14-2222: dose-dependent and equal reduction of the clotting time of rabbit, dog and human plasma clotting potential of BAY 94-9027 and BAY 14-2222 on plasma: human> rabbit > dog	4.2.1.1.1 (CB-2011-07)

[1] BAY 14-2222 is Kogenate FS, full length unmodified rFVIII

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Primary Pharmacodynamics – in vivo studies

Type of study	Species	Method of Administration	Doses [IU/kg]	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report No.)
Pharmacokinetics of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in a hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	iv bolus	BAY 94-9027: 167 IU/kg BAY 14-2222[1]: 210 IU/kg	BAY 94-9027 showed improvement in pharmacokinetic parameters and exhibits a 1.7 fold longer time to threshold compared to BAY 14-2222	4.2.1.1.2 (CB-2010-10)
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in the tail clip bleeding model of hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	iv bolus	BAY 94-9027: 10, 20, 40, 100, 200 IU/kg BAY 14-2222[1]: 10, 20, 40, 100, 200 IU/kg	Acute efficacy on blood loss: comparable between BAY 94-9027 and BAY 14-2222	4.2.1.1.3 (CB-2010-11)
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in the tail vein transection model of hemophilia A mice	Hemophilia A Mouse	iv bolus	BAY 94-9027: 4, 12, 24, 40, and 60 IU/kg BAY 14-2222[1]: 4, 12, 24, 40, and 60 IU/kg	Survival after injury: BAY 94-9027 is efficacious for twice as long as BAY 14-2222	4.2.1.1.4 (CB-2010-12)

[1] BAY 14-2222 is Kogenate FS, full length unmodified rFVIII

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Primary Pharmacodynamics – in vivo studies

Type of study	Species	Method of Administration	Doses [IU/kg]	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report No.)
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 2007.046-80 Early SP in hemophilia A dogs	Hemophilia A Dog	iv bolus	BAY 94-9027: target 50 IU/kg BDD-rFVIII[2]: target 50 IU/kg	Pharmacokinetic: BAY 94-9027 showed improvement in pharmacokinetic parameters compared to BDD-rFVIII Acute efficacy (CBT) of BAY 94-9027 vs BDD-rFVIII: Comparable reduction of number of blood drops Comparable improvement of the CBT score Acute and prolonged efficacy (WBCT) of BAY 94-9027 vs BDD-rFVIII: Comparable improvement in WBCT 30 min after administration Improved WBCT for up to 48 hours by BDD-rFVIII Improved WBCT for up to 96 hours by BAY 94-9027 Acute and prolonged efficacy (whole blood TEG) of BAY 94-9027 vs BDD-rFVIII: Comparable improvement in TEG parameter 30 min after administration Improved TEG parameter for up to 48 hours by BDD-rFVIII Improved TEG parameter for up to 96 hours by BAY 94-9027	4.2.1.1.5 (CB-2009-29)

[2] BDD-rFVIII is B-domain deleted rFVIII

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Primary Pharmacodynamics – in vivo studies

Type of study	Species	Method of Administration	Doses [IU/kg]	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report No.)
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94 9027 lot 27N27H0	Hemophilia A Dog	iv bolus	BAY 94-9027: target 50 IU/kg BAY 14-2222[1]: target 50 IU/kg	Pharmacokinetic: BAY 94-9027 showed significant improvement in pharmacokinetic parameters compared to BAY 14-2222 Acute efficacy (CBT) of BAY 94-9027 vs BAY 14-2222: Comparable reduction of number of blood drops Comparable improvement of the CBT score Acute and prolonged efficacy (WBCT) of BAY 94-9027 vs BAY 14-2222: Comparable improvement in WBCT 30 min after administration Improved WBCT for up to 72 hours by BAY 14-2222 Improved WBCT for up to 96 hours by BAY 94-9027 Acute and prolonged efficacy (whole blood TEG) of BAY 94-9027 vs BAY 14-2222: Comparable improvement in TEG parameter 30 min after administration Improved TEG parameter for around 24 hours by BAY 14-2222 Improved TEG parameter for up to at least 48 hours by BAY 94-9027	4.2.1.1.6 (CB 2012-10)

[1] BAY 14-2222 is Kogenate FS, full length unmodified rFVIII

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII

Exploratory Immunogenicity – in vivo and in vitro studies

Type of study	Species	Method of Administration	Doses [IU/kg]	Noteworthy Findings	Location in CTD (Report No.)
Anti-PEG antibody response to BAY 94-9027 is IgM isotype and transient	C57BL/6J; BALB/cJ	iv bolus	BAY 94-9027: 0.1 mg/kg (~1000 IU/kg)	IgM response to PEG in BAY94-9027 does not switch to IgG isotype even after repeated exposures. Anti-PEG IgM response is enhanced in proinflammatory conditions mimicked by TLR ligands.	4.2.1.1.7 (PH-39382)
Exploratory BAY 94-9027 (KGN) single dose mini pig study	Mini pig	iv	BAY 94-9027: 100 IU/kg	None The model was considered to not reproduce reactions seen in clinical trials	4.2.1.1.8 (PH-39379)
Mechanistic in vitro and in vivo studies indicate reduced immunogenicity profile for PEG-FVIII, BAY 94-9027	Hemophilia A Mouse	iv bolus	In vivo: BAY 94-9027: 200 IU/kg BAY 14-2222[1] 200 IU/kg	Reduced immunogenicity of PEGylated FVIII (BAY 94-9027) in vivo due to lower uptake by dendritic cells and activation of FVIII specific T cells in both mouse and human systems.	4.2.1.1.9 (PH-39381)
	Human PBMC	in vitro	in vitro: BAY 94-9027, BAY 14-2222[1], BDD-rFVIII[2] each 3.5 nmol		

[1] BAY 14-2222 is Kogenate FS, full length unmodified rFVIII
[2] BDD-rFVIII is B-domain deleted FVIII

2.6.3.3 副次的薬理試験

No secondary pharmacodynamics studies were conducted.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222

Safety Pharmacology - Overview

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD (Report Number)
Effects on central or peripheral nervous system, renal function and metabolism incl. systemic exposure	Rats	intravenous (i. v.)	Bayer AG, Berlin, Germany	4.2.3.2.1 (A48103)

Test Article: BAY 94-9027

Safety Pharmacology - *In-vitro* studies

No in vitro studies were conducted.

Test Article: BAY 94-9027, BAY 14-2222

Safety Pharmacology - *In-vivo* studies

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Admin.	Doses [a] [IU/kg]	Gender (No. per Group)	Noteworthy Findings	GLP	Location in CTD (Report No.)
Central nervous system							
Behavior, locomotor activity, gait, muscular tone, extensor and flexor spasm, ptosis, catalepsy, motor coordination, grip strength, rectal temperature, pain sensitivity, righting reflex, pupillary, corneal and pinna reflex, respiration	Rat/ HSD: Sprague Dawley SD	i.v.	BAY 94-9027 0 (vehicle) -75 – 750 – 2250	male (10)	None	Yes	4.2.3.2.1 (A48103)
			Reference compound BAY 14-2222: 2250		None		
Systemic exposure							
C_{max}[IU/L]					BAY 94-9027: 1641 – 14443 – 34640 BAY 14-2222: 11447		
Renal / urinary system							
Urine volume, electrolyte excretion (Na^+, K^+), creatinine excretion, N-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG), total protein, creatinine clearance, serum urea and creatinine concentration, osmolar clearance			2nd administration on day 3		BAY 94-9027: None BAY 14-2222: enhanced K^+ excretion, slightly elevated osmolar clearance		

a single dose unless specified otherwise

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

No pharmacodynamics interaction studies have been conducted.