イスパロクト静注用 500/1000/1500/2000/3000
（ツロクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え））に関する資料

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はノボ ノルディスク ファーマ株式会社に
帰属するものであり、当該情報を適正使用以外の営利目的に利用することはできません。

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

ツロクトコグ アルファ 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
図目次 2
表目次 2
略語一覧 3
2.6.1 緒言 7
2.6.1.1 名称 7
2.6.1.2 医薬品の構造及び特性 7
2.6.1.3 薬剤学的特性 8
2.6.1.4 効能又は効果、用法及び用量 8
2.6.1.5 単位及び国際単位 9
2.6.1.6 IU、μg 及び pmol の換算 9

図目次

ページ

図 2.6.1-1 活性化前後の N8-GP の概略 8

表目次

ページ

表 2.6.1-1 IU 及び対応する μg・pmol の投与量 9

略語一覧

略語一覧は Module 2.6 を通して用いられる。したがって、略語の中には本 Module には関連しないものも含まれる可能性がある。

^{125}I	:	iodine-125（^{125} ヨード）
^{3}H	:	tritium/hydrogen-3（トリチウム/水素-3）
40 kDa PEG	:	40 kilodalton methoxypolyethylene glycol polymer（40 キロダルトンメトキシポリエチレングリコールポリマー）
40 kDa PEGylated FIX	:	nonacog beta pegol（ノナコグ ベータ ペゴル）
40K	:	40 kilodalton（40 キロダルトン）
ADME	:	absorption, distribution, metabolism and excretion（吸収、分布、代謝、排泄）
AMD	:	age-related macular degeneration（加齢黄斑変性）
ANOVA	:	analysis of variance（分散分析）
APC	:	activated protein C（活性化プロテイン C）
APTT	:	activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AS	:	ankylosing spondylitis（強直性脊椎炎）
AUC	:	area under the curve（曲線下面積）
$AUC_{0\text{-}24h}$	:	area under the curve from time zero to 24 h（投与開始時から投与後 24 時間の AUC）
$AUC_{0\text{-}72h}$	:	area under the curve from time zero to 72 h（投与開始時から投与後 72 時間の AUC）
BLA	:	biologics license application（生物学的製剤承認申請）
C57Bl/6	:	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）
CD	:	Crohn’s disease（クローン病）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human Use（ヒト用医薬品委員会）
CHO	:	Chinese hamster ovary cells（チャイニーズハムスター卵巣細胞）
Chrom. Act.	:	chromogenic activity assay（発色性合成基質法）
CI	:	confidence interval（信頼区間）
CL	:	clearance（クリアランス）
C_{max}	:	maximum concentration（最高血中濃度）
[redacted]	:	[redacted]
CNS	:	central nervous system（中枢神経系）
CSF	:	cerebrospinal fluid（脳脊髄液）
CV	:	cardiovascular（循環器系）
DNA	:	deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DP	:	drug product（製剤）
DS	:	drug substance（原薬）

ECG	:	Electrocardiography（心電図検査）
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EOSL	:	end-of-shelf-life（有効期間内）
EPAR	:	European Public Assessment Report（公開医薬品審査報告書）
eq	:	equivalent（等価量）
EU	:	European Union（欧州連合）
F	:	female(-s)（雌）
F8-KO	:	coagulation factor eight gene knockout (mouse)（血液凝固第 VIII 因子ノックアウト（マウス））
FDA	:	U.S. Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
$FeCl_3$	:	ferric chloride（塩化鉄）
FIX	:	coagulation factor nine（血液凝固第 IX 因子）
FIXa	:	activated coagulation factor nine（活性型血液凝固第 IX 因子）
FVIII	:	coagulation factor eight（血液凝固第 VIII 因子）
FVIIIa	:	activated coagulation factor eight（活性型血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	coagulation factor ten（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	activated coagulation factor ten（活性型血液凝固第 X 因子）
FXIa	:	activated coagulation factor eleven（活性型血液凝固第 XI 因子）
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の非臨床安全性試験の実施の基準）
h	:	hour(-s)（時間）
HA	:	haemophilia A（血友病 A）
HCP	:	host cell protein（宿主細胞タンパク質）
HED	:	human equivalent dose（ヒト等価用量）
HMWP	:	high molecular weight protein（高分子タンパク質）
HPLC	:	high performance liquid chromatography（高速液体クロマトグラフィー）
i.a.	:	intra-arterial(-ly)（動脈内）
ICH	:	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IHC	:	immunohistochemistry（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(-ly)（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
K_{cat}	:	first-order rate constant（一次速度定数）
K_d	:	dissociation constant（解離定数）
kDa	:	kilodalton（キロダルトン）
K_m	:	Michaelis constant（ミカエリス定数）
LLOQ	:	lower limit of quantification（定量下限値）
M	:	male(-s)（雄）
min	:	minute(-s)（分）

MRT	:	mean residence time（平均滞留時間）
N, n	:	number（番号）
N7-GP	:	eptacog alfa pegol (activated), 40 kDa PEGylated rFVIIa（エプタコグアルファ ペゴル（活性型）、40 kDa PEG 化 rFVIIa）
N8	:	turoctocog alfa, NovoEight®（ツロクトコグ アルファ、ノボエイト®）
N8-GP	:	turoctocog alfa pegol, 40 kDa PEGylated rFVIII（ツロクトコグ アルファ ペゴル、40 kDa PEG 化 rFVIII）
N9-GP	:	nonacog beta pegol, 40 kDa PEGylated rFIX（ノナコグ ベータ ペゴル、40 kDa PEG 化 rFIX）
N/A	:	not applicable（該当なし）
nAb	:	neutralising antibody（中和抗体）
NC	:	not calculable （計算不可）
NCA	:	noncompartmental analysis（ノンコンパートメント解析）
ND	:	not detected（不検出）
NHP	:	normal human plasma（正常ヒト血漿）
nM	:	Nanomolar（ナノモル）
NMR	:	nuclear magnetic resonance（核磁気共鳴法）
NOAEL	:	no observed adverse effect level（無毒性量）
NZW	:	New Zealand White (rabbit)（ニュージーランド白色種（ウサギ））
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
PD	:	pharmacodynamic(-s)（薬力学）
PDCO	:	Paediatric Committee（小児委員会）
PEG	:	polyethylene glycol（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）
pmol	:	Picomol（ピコモル）
ppm	:	parts per million（百万分率）
PsA	:	psoriatic arthritis（乾癬性関節炎）
[redacted]	:	[redacted]
QWBA	:	quantitative whole body autoradiography（定量的全身オートラジオグラフィ）
R^2	:	coefficient of regression（回帰係数）
RA	:	rheumatoid arthritis（関節リウマチ）
rFIX	:	recombinant coagulation factor nine（遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFVIIa	:	recombinant activated coagulation factor seven（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
rFVIII	:	recombinant coagulation factor eight（遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）
rFVIIIa	:	activated recombinant coagulation factor eight（活性型遺伝子組換え血液凝固

		第 VIII 因子）
RIA	:	Radioimmunoassay（ラジオイムノアッセイ）
RP-HPLC	:	reversed phase high performance liquid chromatography（逆相高速液体クロマトグラフィー）
s	:	second(-s)（秒）
SBA	:	Summary Basis of Approval（新医薬品承認審査概要）
SD	:	standard deviation（標準偏差）
SE-HPLC	:	size exclusion high performance liquid chromatography（サイズ排除高速液体クロマトグラフィー）
sec	:	second(-s)（秒）
SEM	:	standard error of the mean（標準誤差）
SPRD	:	Sprague Dawley (rat)（Sprague Dawley（ラット））
SWP	:	safety working party（安全性ワーキング・パーティー）
$t_{1/2}$	:	terminal half-life（終末相半減期）
TGA	:	thrombin generation assay（トロンビン生成測定法）
TK	:	toxicokinetic(-s)（トキシコキネティクス）
TTC	:	threshold of toxicological concern（毒性学的懸念の閾値）
turoctocog alfa	:	Novo Nordisk recombinant coagulation factor eight (NovoEight®)（ノボ ノルディスク社製遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（ノボエイト®））
turoctocog alfa pegol	:	Novo Nordisk 40 kilodalton PEGylated recombinant coagulation factor eight (N8-GP)（ノボ ノルディスク社製 40 キロダルトン PEG 化遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（N8-GP））
U	:	unit（単位）
μ CT	:	micro-computed tomography（マイクロコンピュータ断層撮影）
USP	:	United States Pharmacopeia（米国薬局方）
V_{ss}	:	volume of distribution at steady state（定常状態分布容積）
VWF	:	von Willebrand factor（von Willebrand 因子）
WBCT	:	whole blood clotting time（全血凝固時間）
WHO	:	World Health Organization（世界保健機関）

2.6.1　緒言

2.6.1.1　名称

ノボ ノルディスク社は 40 kDa PEG 化遺伝子組換え型血液凝固第 VIII 因子製剤として、一般名ツロクトコグ アルファ ペゴル（国際一般名（INN）：turoctocog alfa pegol）（以下、N8-GP）を開発した。

開発期間中、N8-GP、LA-FVIII、40K PEG-N8、40K-O-N8、40K PEG-rFVIII、RP 0212、NNC0129-0000-1003、NNC0129-1003 等を含むツロクトコグ アルファ ペゴルの別名が複数用いられた。非臨床試験報告書においてはこれらの別名を同義語として用いる。

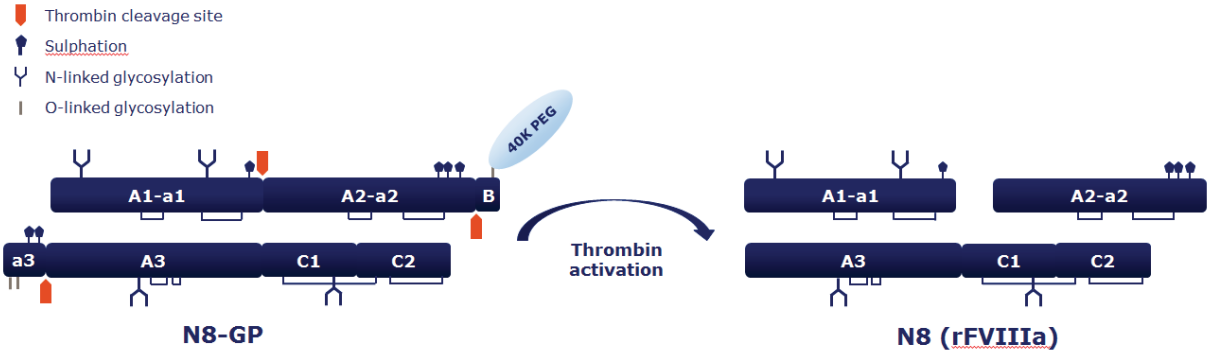
一部の薬理試験及び薬物動態試験において、非 PEG 化 rFVIII との比較を行った。本比較においては、アドベイト®、ReFacto®及びノボエイト®（N8）を相互に使用した。

2.6.1.2　医薬品の構造及び特性

N8-GP は半減期延長型 rFVIII であり、標準的な FVIII 製剤に対して、治療の有効性を高め負担を軽減することが可能である。

N8-GP は、B ドメイン切断型遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（ツロクトコグ アルファ、以下 N8）が 1 つの 40 kDa ポリエチレングリコール（PEG）分子と O-結合型糖鎖（主として 21 アミノ酸から成る B ドメインの Ser750）上で非共有結合しており、それにより、1 分子形態から成る製剤が作製される（図 2.6.1-1）。酵素的修飾反応による PEG 化により、O 型糖鎖構造の末端シアル酸は、グリシン系リンカーを介し、切断型 2x20 kDa PEG と結合した別のシアル酸で置換される。N8 の O 型糖鎖が切断型 B ドメイン分子内に存在するため、本化合物の重要な特性であるトロンビンによる活性化後、N8-GP は天然型 FVIIIa へ変換される。本過程において、PEG 化切断型 B ドメインが遊離する。活性化血小板において、活性型血液凝固第 VIII 因子（FVIIIa）／活性型血液凝固第 IX 因子（FIXa）複合体が第 X 因子（FX）を活性型血液凝固第 X 因子（FXa）へ変換し、そこでトロンビンが活性型血液凝固第 VIII 因子（FVIIIa）の FIXa 補因子機能を活性化する。

N8-GP の分子量は 216 kDa である。N8-GP のタンパク質部分（N8）の分子量は 166 kDa（翻訳後修飾及び PEG 成分を除く）であり、非共有相互作用により結合したポリペプチドの 87 kDa の H 鎖及び 79 kDa の L 鎖を含有する。N8-GP 分子の PEG 部分は分子量 40 kDa である。



Note: The heavy chain (A1-a1 and A2-a2) and light chain (A3-C1-C2) are held together by noncovalent interactions.
Abbreviations: 40K = 40 kilodalton; rFVIIIa = activated recombinant coagulation factor eight.

図 2.6.1-1　活性化前後の N8-GP の概略

N8-GP は遺伝子組換え製剤であり、動物起源の成分を使用していないことから、ウイルス性疾患及び他の血液媒介感染性疾患のリスクは事実上除かれている。細胞株〔チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞〕以外の動物由来の成分は製造過程において使用していない。N8-GP 製剤内のウイルスを含む CHO 起源の物質を除去し、不活性化するために、製造過程において精製手順が実施される。したがって、感染性物質伝播のリスクは除かれている。

2.6.1.3　薬剤学的特性

N8-GP は含量の異なる 5 製剤（500 IU/バイアル、1000 IU/バイアル、1500 IU/バイアル、2000 IU/バイアル及び 3000 IU/バイアル）が開発されている。本剤は凍結乾燥粉末であり、溶解し静脈内注射に使用する。5 製剤（500～3000 IU）は、有効成分含量を除き、同一組成である。

予定する市販用製剤に使用する添加物は、他の静脈内投与用医薬品で使用前例がある。

2.6.1.4　効能又は効果、用法及び用量

N8-GP の効能又は効果、並びに用法及び用量を以下のように設定した。

［効能又は効果］

血液凝固第 VIII 因子欠乏患者における出血傾向の抑制

［用法及び用量］

本剤を添付の専用溶解液全量で溶解し、1～2mL/分で緩徐に静脈内に注射する。

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、12 歳以上の患者には、通常、1 回体重 1kg 当たり 50 国際単位を 4 日毎に投与する。なお、患者の状態に応じて、1 回体重 1kg 当たり 50 国際単位を週 2 回、又は 1 回体重 1kg 当たり 75 国際単位を週 1 回投与することもできる。

12 歳未満の小児には、通常、1 回体重 1kg 当たり 60 国際単位を週 2 回投与する。なお、患者の状態に応じて、1 回体重 1kg 当たり 50～75 国際単位を週 2 回又は 3 日毎に投与することもできる。

2.6.1.5 単位及び国際単位

N8-GP の力価は欧州薬局方（Ph. Eur.）に従って、[redacted]法で測定し WHO の第 8 次国際標準物質を用いて国際単位（IU）で表記される。

非臨床開発プログラムにおいて、用量及び薬物動態の値は単位（U）で表記される。U は多くの非臨床試験報告書に用いられている。1U の N8-GP が 1IU の FVIII に相当することから、本概要書に IU を用い、臨床概要書と一致させる。

2.6.1.6 IU、μg 及び pmol の換算

N8-GP タンパク質は 1mg あたり最大 9500 IU を含有し、N8（糖質を除くタンパク質骨格）の分子量は最大 166 kDa であり、また、PEG の分子量は最大 40 kDa である。N8-GP は 1mol あたり 1mol の N8 及び 1mol の PEG を含有する。IU、μg 及び pmol の換算を表 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1　IU 及び対応する μg・pmol の投与量

N8-GP (IU)	N8 (μg)	PEG (μg)	Corresponding (pmol)
9500	1000	241[b]	6024[a]
150	16	3.8	96
100	11[c]	2.5	66
75	8	2	48
50	5	1.3	30

[a](1000 μg divided by 166000 μg/μmol) = 0.006 μmol = 6.024 nmol = 6024 pmol. [b](40 kDa divided by 166 kDa) multiplied by 1000 μg = 241 μg. [c](100 IU divided by 9500 IU/mg)*1000 = 11 μg.

ツロクトコグ アルファ 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 9
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 12
2.6.2.2.1 N8-GP の構造及び機能 12
2.6.2.2.2 *In vitro* 薬理試験 13
2.6.2.2.2.1 N8-GP の von Willebrand 因子への結合（Table 2.6.3.2、211190） 13
2.6.2.2.2.2 N8-GP の補因子活性、活性化速度及び不活化速度の特性解析（Table 2.6.3.2、216130 及び 209276） 14
2.6.2.2.3 FVIII 測定法 15
2.6.2.2.3.1 N8 及び N8-GP を使用したトロンビン生成測定法精度の特性解析（Table 2.6.3.2、[redacted]及び[redacted]） 16
2.6.2.2.3.2 F8-KO マウス全血を用いた TEG におけるアドベイト®及び N8-GP の濃度反応関係の比較（Table 2.6.3.2、[redacted]） 17
2.6.2.2.3.3 *In vitro* 試験の結論 19
2.6.2.2.4 *In vivo* 薬理試験 19
2.6.2.2.4.1 尾出血 F8-KO マウスにおける N8-GP 及びアドベイト®の用量反応関係（Table 2.6.3.2、[redacted]） 19
2.6.2.2.4.2 F8-KO マウス伏在静脈出血モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®の用量反応関係（Table 2.6.3.2、[redacted]） 20
2.6.2.2.4.3 F8-KO マウス尾静脈切断出血モデルにおける N8-GP 及び N8 の用量反応関係（Table 2.6.3.2、[redacted]） 22
2.6.2.2.4.4 F8-KO マウスにおけるアドベイト®と比較した N8-GP の止血効果延長（Table 2.6.3.2、[redacted]） 23
2.6.2.2.4.5 F8-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®の効果（Table 2.6.3.2、[redacted]） 25
2.6.2.2.4.6 F8-KO マウス関節出血モデルにおける N8-GP の止血効果の延長（Table 2.6.3.2、[redacted]） 26
2.6.2.2.4.7 血友病 A マウス膝関節出血誘発モデルにおける関節症発現に対する N8-GP 予防投与の効果（Table 2.6.3.2、301242） 28

2.6.2.2.4.8　血友病 A イヌにおける N8-GP 及び N8 の薬力学及び薬物動態試験（Table 2.6.3.2、[redacted]）.....30
2.6.2.3　副次的薬理試験.....33
2.6.2.3.1　非臨床安全性評価に用いる動物種の適切性.....33
2.6.2.3.2　[redacted] 実生産工程への変更を支持するための N8-GP の VWF 結合能の検討.....35
2.6.2.3.2.1　[redacted] 実生産工程及び[redacted]実生産工程で製造された N8-GP のチロシン硫酸化及び VWF への結合（Table 2.6.3.2、[redacted]）.....35
2.6.2.3.3　血友病 A 血漿中における N8-GP の *in vitro* 安定性（Table 2.6.3.2、209278）.....36
2.6.2.3.4　クリアランス受容体への結合（Table 2.6.3.2、209338）.....36
2.6.2.4　安全性薬理試験.....38
2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験.....38
2.6.2.6　考察及び結論.....38
参考文献.....40

図目次

ページ

図 2.6.2-1　活性化前後の N8-GP.....13
図 2.6.2-2　TF による誘発時の血友病 A 血漿における N8-GP 及び N8 のトロンビン生成量（[redacted]）.....17
図 2.6.2-3　FXIa による誘発時の血友病 A 血漿における N8-GP 及び N8 のトロンビン生成量.....17
図 2.6.2-4　F8-KO マウス全血を用いた TEG（ROTEM®）によるアドベイト®及び N8-GP の比較　18
図 2.6.2-5　尾切断 F8-KO マウスの総出血時間及び出血量に関する N8-GP 及びアドベイト®の投与反応曲線.....20
図 2.6.2-6　F8-KO マウス伏在静脈出血モデルにおける平均出血量.....21
図 2.6.2-7　総出血時間及び総出血量に対する N8-GP 及び N8 の用量反応曲線.....23
図 2.6.2-8　F8-KO マウスにおける N8-GP 及びアドベイト®（200 U/kg）の効果持続.....24
図 2.6.2-9　F8-KO マウス塩化鉄損傷モデルにおけるアドベイト®と比較した N8-GP（280 IU/kg）の急性期における効果持続時間の延長.....26
図 2.6.2-10　F8-KO マウス関節出血モデルにおける N8-GP の効果の延長.....27
図 2.6.2-11　膝関節損傷 F8-KO マウスの膝関節直径に対する N8-GP の作用.....29
図 2.6.2-12　膝関節損傷 F8-KO マウスの滑膜炎発現、鉄沈着及びマイクロ CT に対する N8-GP の作用.....29
図 2.6.2-13　血友病 A イヌにおける PK/PD プロファイル.....31

図 2.6.2-14　血友病 A イヌにおける PK 及び PD の相関関係.....32
図 2.6.2-15　N8-GP 添加後の正常なヒト、ラット及びカニクイザルの血漿におけるトロンビン生成測定法による代表的なトロンボグラム（[redacted]）.....34
図 2.6.2-16　血友病 A 血漿における反応時間と FVIII 活性値.....36
図 2.6.2-17　N8-GP 及び N8 のセンサーグラム.....37

表目次

ページ

表 2.6.2-1　薬理試験の概要.....9
表 2.6.2-2　補因子活性、活性化速度及び不活化速度に関する *in vitro* 特性解析（209276）.....15
表 2.6.2-3　VWF 存在下及び非存在下におけるトロンビン触媒による FVIII 活性化速度（216130）.....15
表 2.6.2-4　N8-GP の VWF への結合における K_d 値.....35
表 2.6.2-5　LRP と N8-GP 及び N8 の結合における結合定数.....37

略語一覧

略語一覧は Module 2.6 を通して用いられる。したがって、略語の中には本 Module には関連しないものも含まれる可能性がある。

^{125}I	:	iodine-125（^{125}ヨード）
^{3}H	:	tritium/hydrogen-3（トリチウム/水素-3）
40 kDa PEG	:	40 kilodalton methoxypolyethylene glycol polymer（40 キロダルトンメトキシポリエチレングリコールポリマー）
40 kDa PEGylated FIX	:	nonacog beta pegol（ノナコグ ベータ ペゴル）
40K	:	40 kilodalton（40 キロダルトン）
ADME	:	absorption, distribution, metabolism and excretion（吸収、分布、代謝、排泄）
AMD	:	age-related macular degeneration（加齢黄斑変性）
ANOVA	:	analysis of variance（分散分析）
APC	:	activated protein C（活性化プロテイン C）
APTT	:	activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AS	:	ankylosing spondylitis（強直性脊椎炎）
AUC	:	area under the curve（曲線下面積）
$AUC_{0\text{-}24h}$	:	area under the curve from time zero to 24 h（投与開始時から投与後 24 時間の AUC）
$AUC_{0\text{-}72h}$	:	area under the curve from time zero to 72 h（投与開始時から投与後 72 時間の AUC）
BLA	:	biologics license application（生物学的製剤承認申請）
C57Bl/6	:	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）
CD	:	Crohn’s disease（クローン病）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human Use（ヒト用医薬品委員会）
CHO	:	Chinese hamster ovary cells（チャイニーズハムスター卵巣細胞）
Chrom. Act.	:	chromogenic activity assay（発色性合成基質法）
CI	:	confidence interval（信頼区間）
CL	:	clearance（クリアランス）
C_{max}	:	maximum concentration（最高血中濃度）
[redacted]	:	[redacted]
CNS	:	central nervous system（中枢神経系）
CSF	:	cerebrospinal fluid（脳脊髄液）
CV	:	cardiovascular（循環器系）
DNA	:	deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DP	:	drug product（製剤）
DS	:	drug substance（原薬）

ECG	:	Electrocardiography（心電図検査）
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EOSL	:	end-of-shelf-life（有効期間内）
EPAR	:	European Public Assessment Report（公開医薬品審査報告書）
eq	:	equivalent（等価量）
EU	:	European Union（欧州連合）
F	:	female(-s)（雌）
F8-KO	:	coagulation factor eight gene knockout (mouse)（血液凝固第 VIII 因子ノックアウト（マウス））
FDA	:	U.S. Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
$FeCl_3$	:	ferric chloride（塩化鉄）
FIX	:	coagulation factor nine（血液凝固第 IX 因子）
FIXa	:	activated coagulation factor nine（活性型血液凝固第 IX 因子）
FVIII	:	coagulation factor eight（血液凝固第 VIII 因子）
FVIIIa	:	activated coagulation factor eight（活性型血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	coagulation factor ten（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	activated coagulation factor ten（活性型血液凝固第 X 因子）
FXIa	:	activated coagulation factor eleven（活性型血液凝固第 XI 因子）
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の非臨床安全性試験の実施の基準）
h	:	hour(-s)（時間）
HA	:	haemophilia A（血友病 A）
HCP	:	host cell protein（宿主細胞タンパク質）
HED	:	human equivalent dose（ヒト等価用量）
HMWP	:	high molecular weight protein（高分子タンパク質）
HPLC	:	high performance liquid chromatography（高速液体クロマトグラフィー）
i.a.	:	intra-arterial(-ly)（動脈内）
ICH	:	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IHC	:	immunohistochemistry（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(-ly)（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
K_{cat}	:	first-order rate constant（一次速度定数）
K_d	:	dissociation constant（解離定数）
kDa	:	kilodalton（キロダルトン）
K_m	:	Michaelis constant（ミカエリス定数）
LLOQ	:	lower limit of quantification（定量下限値）
M	:	male(-s)（雄）
min	:	minute(-s)（分）

MRT	:	mean residence time（平均滞留時間）
N, n	:	number（番号）
N7-GP	:	eptacog alfa pegol (activated), 40 kDa PEGylated rFVIIa（エプタコグアルファ ペゴル（活性型）、40 kDa PEG 化 rFVIIa）
N8	:	turoctocog alfa, NovoEight®（ツロクトコグ アルファ、ノボエイト®）
N8-GP	:	turoctocog alfa pegol, 40 kDa PEGylated rFVIII（ツロクトコグ アルファ ペゴル、40 kDa PEG 化 rFVIII）
N9-GP	:	nonacog beta pegol, 40 kDa PEGylated rFIX（ノナコグ ベータ ペゴル、40 kDa PEG 化 rFIX）
N/A	:	not applicable（該当なし）
nAb	:	neutralising antibody（中和抗体）
NC	:	not calculable （計算不可）
NCA	:	noncompartmental analysis（ノンコンパートメント解析）
ND	:	not detected（不検出）
NHP	:	normal human plasma（正常ヒト血漿）
nM	:	Nanomolar（ナノモル）
NMR	:	nuclear magnetic resonance（核磁気共鳴法）
NOAEL	:	no observed adverse effect level（無毒性量）
NZW	:	New Zealand White (rabbit)（ニュージーランド白色種（ウサギ））
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
PD	:	pharmacodynamic(-s)（薬力学）
PDCO	:	Paediatric Committee（小児委員会）
PEG	:	polyethylene glycol（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）
pmol	:	Picomol（ピコモル）
ppm	:	parts per million（百万分率）
PsA	:	psoriatic arthritis（乾癬性関節炎）
[redacted]	:	[redacted]
QWBA	:	quantitative whole body autoradiography（定量的全身オートラジオグラフィ）
R^2	:	coefficient of regression（回帰係数）
RA	:	rheumatoid arthritis（関節リウマチ）
rFIX	:	recombinant coagulation factor nine（遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFVIIa	:	recombinant activated coagulation factor seven（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
rFVIII	:	recombinant coagulation factor eight（遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）
rFVIIIa	:	activated recombinant coagulation factor eight（活性型遺伝子組換え血液凝固

		第 VIII 因子）
RIA	:	Radioimmunoassay（ラジオイムノアッセイ）
RP-HPLC	:	reversed phase high performance liquid chromatography（逆相高速液体クロマトグラフィー）
s	:	second(-s)（秒）
SBA	:	Summary Basis of Approval（新医薬品承認審査概要）
SD	:	standard deviation（標準偏差）
SE-HPLC	:	size exclusion high performance liquid chromatography（サイズ排除高速液体クロマトグラフィー）
sec	:	second(-s)（秒）
SEM	:	standard error of the mean（標準誤差）
SPRD	:	Sprague Dawley (rat)（Sprague Dawley（ラット））
SWP	:	safety working party（安全性ワーキング・パーティー）
$t_{1/2}$	:	terminal half-life（終末相半減期）
TGA	:	thrombin generation assay（トロンビン生成測定法）
TK	:	toxicokinetic(-s)（トキシコキネティクス）
TTC	:	threshold of toxicological concern（毒性学的懸念の閾値）
turoctocog alfa	:	Novo Nordisk recombinant coagulation factor eight (NovoEight®)（ノボ ノルディスク社製遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（ノボエイト®））
turoctocog alfa pegol	:	Novo Nordisk 40 kilodalton PEGylated recombinant coagulation factor eight (N8-GP)（ノボ ノルディスク社製 40 キロダルトン PEG 化遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（N8-GP））
U	:	unit（単位）
μCT	:	micro-computed tomography（マイクロコンピュータ断層撮影）
USP	:	United States Pharmacopeia（米国薬局方）
V_{ss}	:	volume of distribution at steady state（定常状態分布容積）
VWF	:	von Willebrand factor（von Willebrand 因子）
WBCT	:	whole blood clotting time（全血凝固時間）
WHO	:	World Health Organization（世界保健機関）

2.6.2.1　まとめ

ツロクトコグ アルファ ペゴル（N8-GP）は半減期延長型遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）であり、標準的な FVIII 製剤に対して治療の有効性を高め負担を軽減することを目的として開発された。

N8-GP は、遺伝子組換え B ドメイン切断型第 VIII 因子（ツロクトコグ アルファ、N8）に、B ドメインにおける固有の O 型糖鎖を介して 40kDa ポリエチレングリコール（PEG）分子を共有結合させた分子構造を有している。

分岐型 PEG〔2x20 kDa（40 kDa PEG）〕は N8 の B ドメインにおける固有の O 型糖鎖と共有結合している。血管傷害部位において活性化されると、切断型 PEG 化 B ドメインが除去され、N8-GP は内因性の活性型 FVIII（FVIIIa）と同一の構造及び同等の機能を有する分子に変換される。薬理試験の目的は、非 PEG 化 rFVIII 製剤（アドベイト®及び N8 等）との比較における N8-GP の薬理学的特性及び効果持続時間を明らかにすることである。

実施した薬理試験の概要を表 2.6.2-1 に示す。*In vitro* 試験の大多数において、対照薬として N8 及びアドベイト®を使用した。*In vivo* 試験においては、主にアドベイト®を用いて、使用動物数を最小限に抑えた。

表 2.6.2-1　　薬理試験の概要

Discipline	Type of study	Method of administration	Study ID
Primary pharmacodynamics			
In vitro	Binding of N8-GP to von Willebrand factor: comparison with Advate® and the influence of PEG size	N/A	211190
	Quantification of rate of thrombin-catalysed activation of N8-GP with and without von Willebrand factor	N/A	216130
	Quantification of N8-GP cofactor activity in FIXa-catalysed FX activation and rates of thrombin-catalysed N8-GP activation and activated protein C-catalysed inactivation of activated N8-GP	N/A	209276
	Utilising design of experiment to characterise sensitivity of the thrombin generation assay using N8 and N8-GP	N/A	[redacted]
	Characterising sensitivity of the thrombin generation assay using N8 and N8-GP with FXIa as the trigger	N/A	[redacted]
	Comparison of the concentration response relationship for Advate® and N8-GP on the thromboelastographic response in blood from F8-KO mice	N/A	[redacted]
In vivo	Dose response relationships of N8-GP and Advate® on tail bleeding in F8-KO mice	i.v.	[redacted]

Discipline	Type of study	Method of administration	Study ID
	Dose response of N8-GP and Advate® in a vena saphena bleeding model in F8-KO mice	i.v.	[redacted]
	Dose response of N8-GP and N8 in a tail vein transection bleeding model in F8-KO mice	i.v.	[redacted]
	Prolonged haemostatic effect of N8-GP in F8-KO mice compared to Advate®	i.v.	[redacted]
	Effect of N8-GP and Advate® in an $FeCl_3$-induced injury model in F8-KO mice	i.v.	[redacted]
	Prolonged haemostatic effect of N8-GP on joint bleeds in F8-KO mice	i.v.	[redacted]
	Effect of prophylactic treatment with N8-GP on the development of arthropathy in a haemophilia A mouse model of induced knee bleeding	i.v.	301242
	Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of N8-GP and N8 in haemophilia A dogs	i.v.	[redacted]
Secondary pharmacodynamics			
In vitro species qualification	Binding of N8-GP to von Willebrand factor	N/A	209272
	In vitro thrombin generation assay in human, rat and cynomolgus monkey plasma to identify relevant toxicity species	N/A	[redacted]
Others	Binding of von Willebrand factor to N8-GP produced for the pivotal trial and in commercial scale	N/A	[redacted]
	In vitro stability of N8-GP in haemophilia A plasma	N/A	209278
	Binding to clearance receptors	N/A	209338
Safety pharmacology	Safety pharmacology end points (respiratory, CV, CNS and kidney) included in pivotal GLP 2-week repeat-dose toxicity study in male cynomolgus monkeys	i.v.	209350
Pharmacodynamic drug interactions	No studies performed	N/A	N/A

Abbreviations: CNS = central nervous system; CV = cardiovascular; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; FIXa = activated coagulation factor nine; FX = coagulation factor ten; FXIa = activated coagulation factor eleven; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous(-ly); N/A = not applicable.

In vitro 生化学的特性解析から、FIXa 触媒による FX 活性化反応において、N8-GP 及び rFVIII 製剤の補因子活性が類似していることが示された。また、活性化プロテイン C（APC）触媒による抑制速度も N8-GP 及び rFVIII 製剤で同等であった。トロンビン触媒による活性化速度は、von Willebrand 因子（VWF）の有無に関わらず、N8-GP、アドベイト®及び N8 は同様であった。結合試験から、アドベイト®及び N8 と同様、N8-GP も VWF へ結合可能であると示された。N8-GP とクリアランス受容体〔低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）及び超低

密度リポタンパク質受容体（VLDLR）〕との結合は、N8 と比較して約 1/3 に減少した。N8-GP 結合の減少が主として結合速度の低下に起因する一方、解離速度にはほとんど影響はみられなかった。このことから、PEG 化によって N8-GP 及びクリアランス受容体間の相互作用が遮断される可能性が示唆された。

発色性合成基質法、トロンビン生成測定法（TGA）及びトロンボエラストグラフィー法（TEG）を用いて N8-GP の FVIII:C 活性を測定したところ、N8-GP と非 PEG 化 rFVIII 製剤間において同等の力価及び活性が示された。しかしながら、PEG 化は、凝固一段法に用いる活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）試薬の数種類を阻害し、力価の過小評価につながると考えられた。

N8-GP 及び rFVIII 製剤の *in vivo* 効果を評価するため、様々な損傷モデル（尾切断出血モデル、尾静脈切断出血モデル、塩化鉄誘発膝関節損傷モデル、針穿孔誘発膝関節損傷モデル）の FVIII ノックアウトマウス（F8-KO マウス）を使用した。すべてのモデルにおいて、N8-GP 及び rFVIII 製剤は同等の止血効果を示し、さらに N8-GP では効果持続時間の延長がみられた。血友病 A イヌにおける N8-GP 及び N8 の薬力学的作用の検討は、PK 試験の一部として全血凝固時間及び TEG パラメータの評価よって実施し、N8-GP の効果持続時間の延長が示された。

In vitro 及び *in vivo* 試験で示されたとおり、N8-GP と rFVIII 製剤の生物学的活性は概して同等であったが、N8-GP では効果持続時間の延長が認められた。

カニクイザルにおける反復投与毒性試験〔医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適合試験〕に、安全性薬理評価項目（血圧、心電図検査、呼吸数、体温、神経学的／CNS 評価項目及び尿検査）を組込んだ。その結果、2500 IU/kg までの用量で、いずれの安全性パラメータにおいても影響が認められなかったことから、当該用量が無毒性量（NOAEL）であると考えられた。

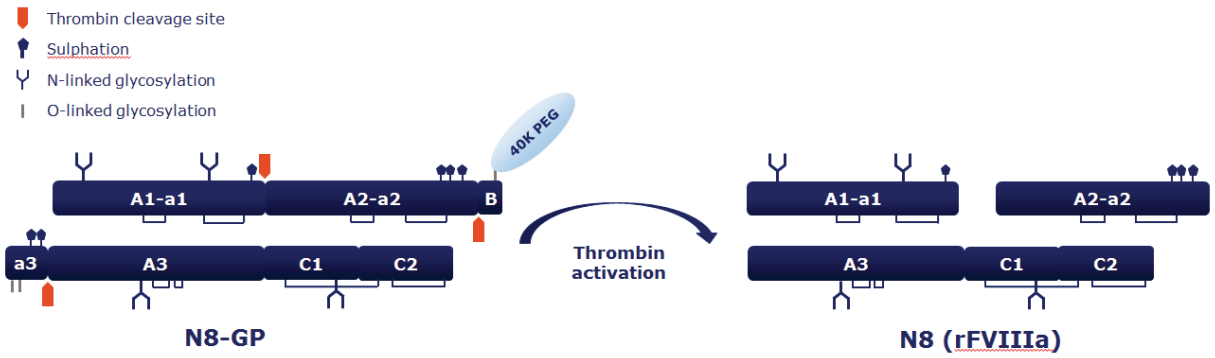
2.6.2.2　効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1　　N8-GP の構造及び機能

血友病 A は補因子である FVIII の欠乏又は欠損に起因する。FVIII は血液凝固に不可欠であるため、その欠乏により再発性の出血が引き起こされる。トロンビンは、活性化血小板表面において活性型血液凝固第 IX 因子（FIXa）の補因子である FVIIIa を活性化し、FVIIIa/FIXa 複合体が血液凝固第 X 因子（FX）を活性型 FX（FXa）へと変換させる。FVIII は大型糖タンパク質（280 kDa）であり、肝臓で合成され、VWF と非共有結合による複合体を形成し循環している。VWF と複合体を形成することにより FVIII はクリアランス受容体及びリン脂質表面との結合から保護されている。VWF と複合体を形成した FVIII の血漿中半減期は、ヒトにおいて約 12 時間である。

ヒト FVIII 遺伝子は、シグナルペプチド A1-A2-B-A3-C1-C2 というドメイン構造を有する 2351 アミノ酸残基の前駆体をコードする。分泌中、シグナルペプチドは開裂し、さらに、プロセシングによって前駆体が重鎖（A1-A2-B）及び軽鎖（A3-C1-C2）から成る二本鎖分子へと変換される。二本鎖は金属イオン（Ca^{++}等）により結合している。そのため、循環している内因性 FVIII の最小形は、740 アミノ酸残基から成る重鎖及び 684 アミノ酸残基から成る軽鎖の複合体で構成されている。FVIII 機能における B ドメインの重要性に関する検討が行われているが、FVIII 機能に B ドメインは必須ではないと推測されている[1]。大型 B ドメインを切断した FVIII 分子（N8 等）は完全な生物学的活性を保有している[2]。FVIII を有効な FIXa 補因子とするには、トロンビンによって FVIIIa へと活性化させる必要がある（当該反応の結果、A1、A2 及び A3 に C1 及び C2 を加えたドメインから成るヘテロトリマーが形成される）。活性化後は B ドメインのサイズに関わらず、FVIIIa と同一の構造となる。

N8-GP は遺伝子組換え技術により製造したヒト FVIII であり、O-結合型糖鎖（主として 21 アミノ酸 B ドメインの Ser750）が特異的に PEG 化されている。B ドメイン固有の O-結合型糖鎖と共有結合している PEG のサイズは 40 kDa である。酵素的修飾反応による部位特異的 PEG 化により、O-結合型糖鎖構造の末端シアル酸は、グリシンリンカーを介し、PEG ポリマーと結合した別のシアル酸で置換される。特筆すべきは、N8 分子の B ドメインの O-結合型糖鎖を選択的に修飾する部位特異的手法により、半減期の長い分子が生成されることである。PEG 化 B ドメイン及び a3 領域は、生理活性物質であるトロンビン又は FXa による活性化により除去され、N8-GP は N8 及びアドベイト®と同様に、内因性 FVIIIa と同一の構造及び同等の機能を有する分子に変換される（図 2.6.2-1）。



Note: The heavy chain (A1-a1 and A2-a2) and light chain (A3-C1-C2) are held together by noncovalent interactions.
Abbreviations: 40K = 40 kilodalton; rFVIIIa = activated recombinant coagulation factor eight.

図 2.6.2-1　活性化前後の N8-GP

2.6.2.2.2　*In vitro* 薬理試験

2.6.2.2.2.1　N8-GP の von Willebrand 因子への結合（Table 2.6.3.2、211190）

［目的］

FVIII はその担体タンパクである VWF と複合体を形成し、血漿中を循環している。VWF は循環中の FVIII の安定性及び半減期に重要であることから、PEG 化による影響を評価するため、精製ヒト VWF を用いた結合分析〔酵素免疫吸着測定法（ELISA）〕により、N8-GP 及び VWF の相互作用を解析し、非 PEG 化 rFVIII 製剤（アドベイト®及び N8）との比較を行った。

［方法］

ウェル型マイクロタイタープレート（96 ウェル）を精製ヒト VWF でコーティングし、濃度範囲 0.03～4 nmol/L の N8-GP、N8 又はアドベイト®を含有する試料を添加した。ウェルを洗浄し、ビオチン化抗 FVIII 抗体を加え FVIII との結合を可能にした。

620 nm をリファレンス波長とし、450 nm における吸光度を測定した。吸光度は、ヒト VWF と結合する FVIII の量に比例する。結合等温線を作成し、GraFit®ソフトウェアを用いて各種 FVIII 製剤と VWF 間の解離定数（K_d）を算出した。

［結果］

N8-GP、N8 及びアドベイト®の解離定数はそれぞれ 0.30 ± 0.03 nmol/L、0.20 ± 0.02 nmo/L、0.23 ± 0.05 nmol/L であった。

［結論］

本試験の結果、N8-GP はヒト VWF に対して nmol/L 以下の解離定数の結合親和性を有することが示され、循環中において投与後の N8-GP は N8 及びアドベイト®と同様に内因性 VWF と結合することが示唆された。

2.6.2.2.2.2　N8-GP の補因子活性、活性化速度及び不活化速度の特性解析（Table 2.6.3.2、216130 及び 209276）

［目的］

FIXa 触媒による FX 活性化における N8-GP の反応促進能を、精製成分を含む試験系で定量化し、他の 2 種の rFVIII（N8 及びアドベイト®）との比較を行った（216130）。さらに、トロンビン触媒による FVIII 活性速度及び活性化プロテイン C（APC）触媒による FVIIIa 不活化速度を測定し、N8-GP の反応促進能を N8 及びアドベイト®と比較した（209276）。

［方法］

FVIIIa の補因子活性を、FX 活性化速度が FVIIIa 添加量と直線関係を示し測定中安定である量のリン脂質小胞、ヒト FIXa 及びヒト FX の存在下で、FIXa 触媒による FX 活性化速度を測定し評価した。全ての反応速度は 37°C の温度条件下で測定した。FVIII のトロンビン活性は、FVIIIa 生成の初期速度として定量化した。活性化プロテイン C（APC）による FVIIIa の不活化は、プロテイン S の存在下において検討した。

N8-GP と N8 又はアドベイト®間で、分散分析（ANOVA）を用いて測定値を比較した。ANOVA での平均値に有意差が認められた場合、Tukey の HSD 検定（TukeyHSD）を実施した。

［結果］

検討したパラメータの概要を表 2.6.2-2 及び表 2.6.2-3 に示す。FIXa 触媒による FX 活性化における N8-GP の補因子活性について、膜結合型 FVIIIa-FIXa 複合体の解離（K½FIXa）に対する見かけの K_d 及び FX 活性化の K_m／k_{cat} のいずれにおいても、N8 及びアドベイト®との間に有意差は認められなかった。活性化プロテイン C 触媒による活性型 40K PEG N8 の不活化速度においても、N8 及びアドベイト®との間に有意差はみられなかった（209276）。

トロンビン触媒による N8-GP 活性化速度を ANOVA により比較したが、VWF の存在下及び非存在下いずれにおいても N8-GP、アドベイト®及び N8 の間に有意差は認められなかった（216130）。

表 2.6.2-2　補因子活性、活性化速度及び不活化速度に関する *in vitro* 特性解析（209276）

Test	N8-GP (activated)	N8 (activated)	Advate® (activated)
K_d of FVIIIa binding to FIXa (nmol/L)	0.94 (0.66 – 1.22)	0.78 (0.64 – 0.93)	0.76 (0.60 – 0.92)
K_m of FX activation (nmol/L)	4.9 (4.8 – 5.0)	5.1 (4.8 – 5.5)	4.8 (4.5 – 5.1)
K_{cat} of FX activation (s^{-1})	5.0 (4.1 – 6.0)	6.5 (5.2 – 7.8)	5.5 (4.9 – 6.2)
Rate of FVIIIa inactivation by APC (min^{-1})	0.22 (0.19 – 0.24)	0.23 (0.20 – 0.25)	0.19 0.17 – 0.21)

Note: Means and 95% CI; n=10-13.
Abbreviations: APC = activated protein C; CI = confidence interval; FVIIIa = activated coagulation factor eight; FIXa = activated coagulation factor nine; FX = coagulation factor ten; Kcat = first-order rate constant; Kd = dissociation constant; Km = Michaelis constant.

さらに、VWF の存在下及び非存在下において、トロンビン触媒による FVIII 活性化速度を測定した（表 2.6.2-3）。

表 2.6.2-3　VWF 存在下及び非存在下におけるトロンビン触媒による FVIII 活性化速度（216130）

Test	N8-GP	N8	Advate®
Rate of thrombin-mediated FVIII activation without VWF (pM x min^{-1})	5.3 ± 3.6	4.0 ± 0.5	3.9 ± 0.5
Rate of thrombin-mediated FVIII activation with 50 nM VWF (pM x min^{-1})	17.7 ± 2.8	14.7 ± 1.3	14.5 ± 3.4

Note: Means ± SD; n=10.
Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight; VWF = von Willebrand factor.

［結論］

FIXa 触媒による FX 活性における N8-GP の補因子活性、APC 触媒による活性型 N8-GP の不活化速度及びトロンビン触媒による N8-GP 活性化速度は、N8 及びアドベイト®の測定値と同様の値を示した。

2.6.2.2.3　FVIII 測定法

FVIII:C 活性の測定は、凝固一段法（APTT に基づく）又は二段階発色性合成基質法（発色基質の FXa 開裂による発色）を用いて行った。

欧州薬局方（Ph. Eur.）に従い、N8-GP の力価は発色性合成基質法で測定し WHO 第 8 国際規格を用いて IU で表記される。

PEG 化タンパク質の PEG 成分が凝固一段法に使用する APTT 試薬に干渉し、測定結果が使用試薬に依存する可能性が報告されている[3]。そのため、PEG 化タンパク質活性は異なる凝固活性測定法で評価することが重要である。

複数の長時間作用型 rFVIII タンパク質の検査測定では、様々な凝固一段法において、FVIII の *in vitro* 回収率に、使用した APTT 試薬に依存した差異が確認されたことが報告されている[3]。N8-GP を含む試料中の FVIII:C を測定するにあたり、現在市販されている APTT に基づく凝固一段法の精確性を二施設試験で評価した[4]。本試験の概括的な結果として、Siemens 社製 FVIII 欠損血漿でルーチン分析を行ったところ、評価した APTT 試薬の多数（Actin®、Actin® FS、Actin® FSL、Pathromtin® SL、DG-APTT Synth、SynthAFax®及び SynthASil®）の回収率において、rFVIII 製剤の PEG 化による著しい影響はみられないことが示唆された。しかしながら、APTT SP®では N8-GP の回収率が著しく過小評価となった。投与後観察を行った詳細データ及び測定法に関する試験結果は Module 2.5.2.4 に記述する。

2.6.2.2.3.1 N8 及び N8-GP を使用したトロンビン生成測定法精度の特性解析（Table 2.6.3.2、[redacted]及び[redacted]）

［目的］

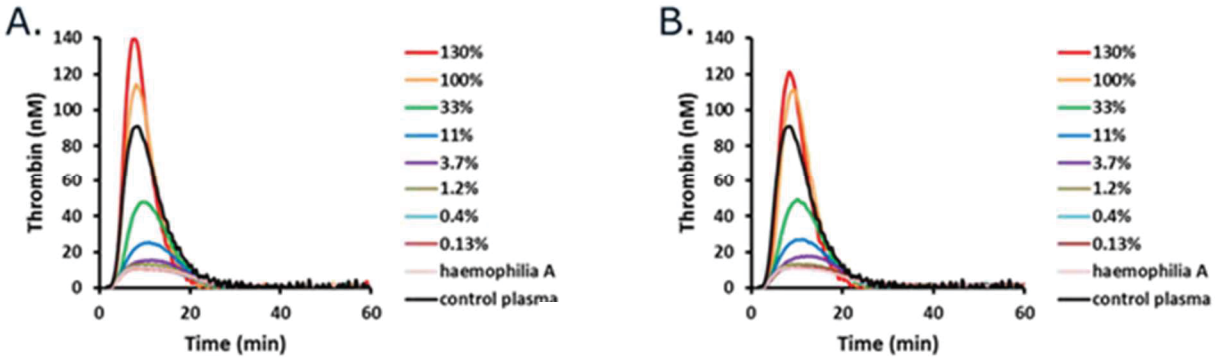
N8-GP 及び N8 のトロンビン生成能を、血友病 A 患者血漿を用いた添加試験で TGA により評価した。

［方法］

濃度範囲 0.13～130%（100% = 1 IU/mL）の血友病 A 血漿に N8-GP 及び N8 を添加した。組織因子（TF）又は FXIa 添加による活性化開始後に、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］

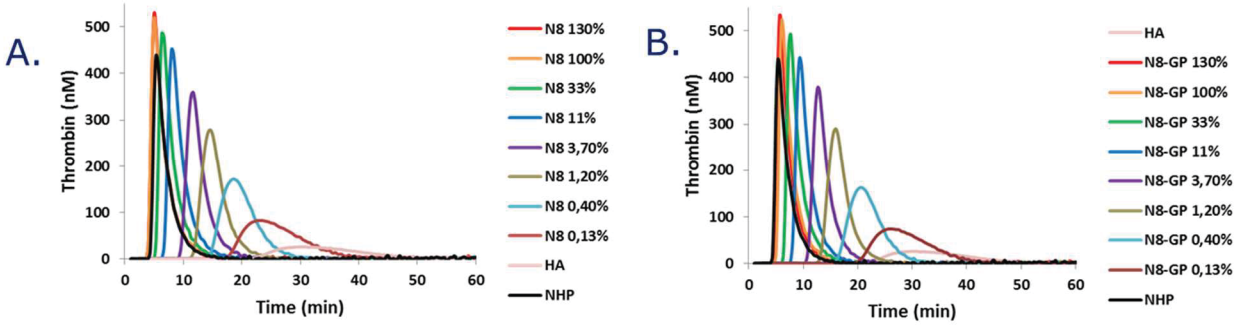
TF による誘発時の代表的な TGA プロファイルを図 2.6.2-2 に示す。最大トロンビン生成量には濃度依存性が示された（[redacted]）。



Note: Representative thrombin generation curves for N8 (A) and N8-GP (B), respectively. Control plasma: commercial normal human plasma. 100% equals 1 U/mL N8 or N8-GP.

図 2.6.2-2　TF による誘発時の血友病 A 血漿における N8-GP 及び N8 のトロンビン生成量（[redacted]）

FXIa による誘発時の代表的な TGA プロファイルを図 2.6.2-3 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、N8-GP と N8 で同様の濃度依存的な効果が認められた（[redacted]）。



Note: Representative thrombin generation curves for N8 (A) and N8-GP (B), respectively. 100% equals 1 U/mL N8 or N8-GP.
Abbreviations: HA = haemophilia A; NHP = normal human plasma.

図 2.6.2-3　FXIa による誘発時の血友病 A 血漿における N8-GP 及び N8 のトロンビン生成量

［結論］

血友病 A 血漿では、TF 又は FXIa による誘発時のトロンビン生成量は、N8-GP 及び N8 添加時で同程度であることが確認された。

2.6.2.2.3.2　F8-KO マウス全血を用いた TEG におけるアドベイト®及び N8-GP の濃度反応関係の比較（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

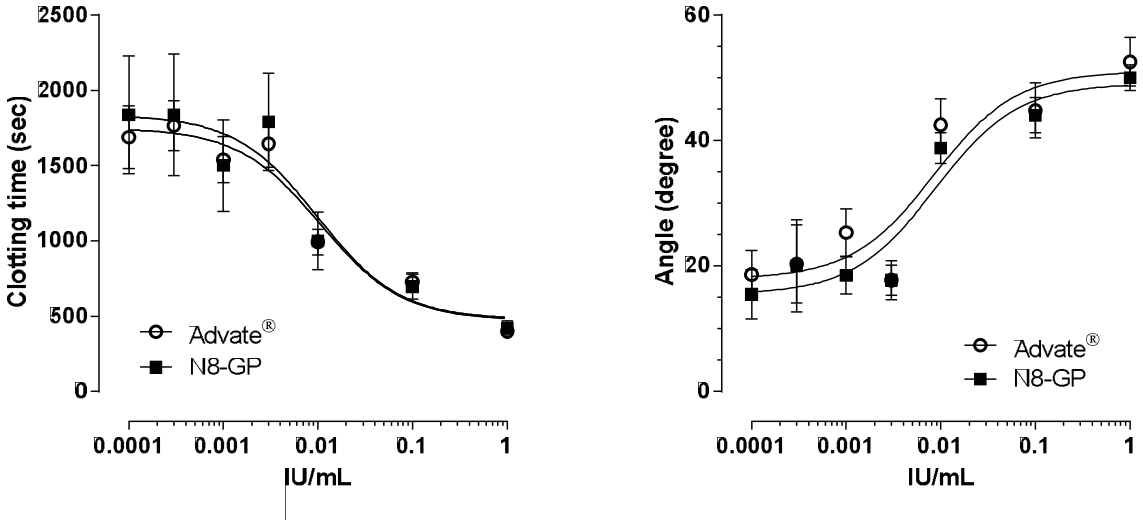
TEG は全血を用いて、止血栓形成凝固時間、止血栓形成（アングル）及び止血栓安定性の反応速度に関する情報が得られる国際的に汎用されている凝固検査であり、TEG を用いて F8-KO マウス全血中におけるアドベイト®及び N8-GP の濃度反応関係を測定した。

［方法］

イソフルラン麻酔下で F8-KO マウス（12～16 週齢の雌雄）から採血した検体にクエン酸塩を加え、各種濃度の N8-GP 及びアドベイト®を添加した。ROTEM®（ROTEM 社、Munich, Germany）により TEG プロファイルを収集した。試料にカルシウム再添加後、濃度範囲 0.0003～1.0 IU/mL の N8-GP 又はアドベイト®添加時の凝固時間とアングルに関する濃度反応関係を検討した。活性の測定は、Chromogenic®アッセイで測定した活性値に基づき、医療統計解析プログラム GraphPad Prism version 5.0（La Jolla 社、CA, USA）を用いデータを分析した。

［結果］

F8-KO マウス全血中におけるアドベイト®及び N8-GP の TEG プロファイルの比較を図 2.6.2-4 に示す。凝固時間及びアングルの EC_{50} 平均値は、両化合物において 0.009 IU/mL （95% CI: 0.004～0.02、p=0.97; F-test）であった。



Note: Concentration response relationship on clot formation parameters (clotting time - left) and rate of clot propagation (angle - right) comparing Advate® and N8-GP. Data are means ± SEM; n=4.

図 2.6.2-4　F8-KO マウス全血を用いた TEG（ROTEM®）によるアドベイト®及び N8-GP の比較

［結論］

F8-KO マウスの全血中で、N8-GP はアドベイト®と同等の力価を示すことが確認された。

2.6.2.2.3.3 *In vitro* 試験の結論

要約すると、各種 *in vitro* 系における評価結果から、N8-GP の補因子活性は、VWF との結合も含め N8 又はアドベイト®と類似していることが確認され、PEG 化は N8-GP の生物学的機能に影響を及ぼさないことが示唆された。TGA、発色性合成基質法又は TEG を用いて測定した N8-GP の FVIII 活性から、N8-GP 及び非 PEG 化 rFVIII の活性が類似していることが示された。凝固一段法においても、力価が過小評価になった一部の APTT 試薬を除いて、大部分の APTT 試薬で良好な回収率が認められた。

2.6.2.2.4 *In vivo* 薬理試験

N8-GP の *in vivo* での効果を、3 種類の F8-KO マウス出血モデル（尾切断出血モデル、尾静脈切断出血モデル、伏在静脈出血モデル）を用いて評価した。さらに、血友病 A イヌを用いて、N8-GP の薬力学（PD）及び薬物動態（PK）プロファイルを検討した。

2.6.2.2.4.1 尾出血 F8-KO マウスにおける N8-GP 及びアドベイト®の用量反応関係（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

F8-KO マウス尾切断出血モデルにおいて、N8-GP 及びアドベイト®の薬理作用を検討した。

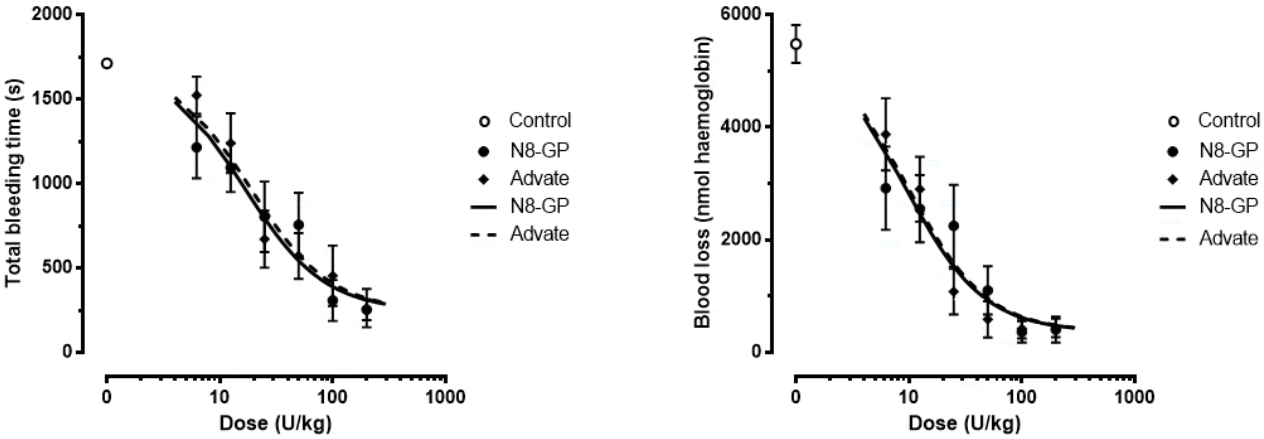
［方法］

イソフルランで麻酔した、F8-KO マウス（Taconics 社、Ry, Denmark）12 匹（雌雄各 6 匹）／群に対し、尾切断前 5 分に 0、6.25、12.5、25、50、100 及び 200 IU/kg の用量で被験物質（N8-GP 又はアドベイト®）を静脈内投与した。また、対照群の F8-KO マウスには溶媒（3 g/L ショ糖；1.5 g/L L-ヒスチジン；18 g/L 塩化ナトリウム；0.1 g/L Tween 80；0.25 g/L 塩化カルシウム、pH 約 7.3）を投与した。

被験物質投与後 5 分に、先端から 4mm の位置で尾を生理食塩液中で切断し、出血を 30 分間視覚的に観察した後、採取した血液を遠心し、ヘモグロビン濃度測定後に出血量〔ヘモグロビン量（nmol）〕を測定した。SAS ver 9.2（SAS Institute 社、Cary, NC, USA）の非線形回帰分析により、総出血時間及び出血量の投与反応曲線をフィッティングした。

［結果］

N8-GP 及びアドベイト®投与群の総出血時間の ED_{50} 値（有効用量中央値、力価）はそれぞれ 16.6 ± 5.9 IU/kg 及び 18.7 ± 5.7 IU/kg と推定され、効力比は 1.12（0.66−1.92, 95% CI）であった。出血量の ED_{50} 値は 9.3 ± 2.8 IU/kg 及び 9.8 ± 2.4 IU/kg と推定され、効力比は 1.06（0.63−1.78, 95% CI）であった（図 2.6.2-5）。



Note: Data are means ± SEM; n=12. Control is the vehicle group.

図 2.6.2-5　尾切断 F8-KO マウスの総出血時間及び出血量に関する N8-GP 及びアドベイト®の投与反応曲線

［結論］

N8-GP 及びアドベイト®は、尾切断 F8-KO マウスの出血に対し同程度の効力を示した。

2.6.2.2.4.2　F8-KO マウス伏在静脈出血モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®の用量反応関係（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

溶媒投与 F8-KO マウス及び正常マウス（C57/Bl6）との比較により、F8-KO マウス伏在静脈出血モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®の薬理作用を検討した。

［方法］

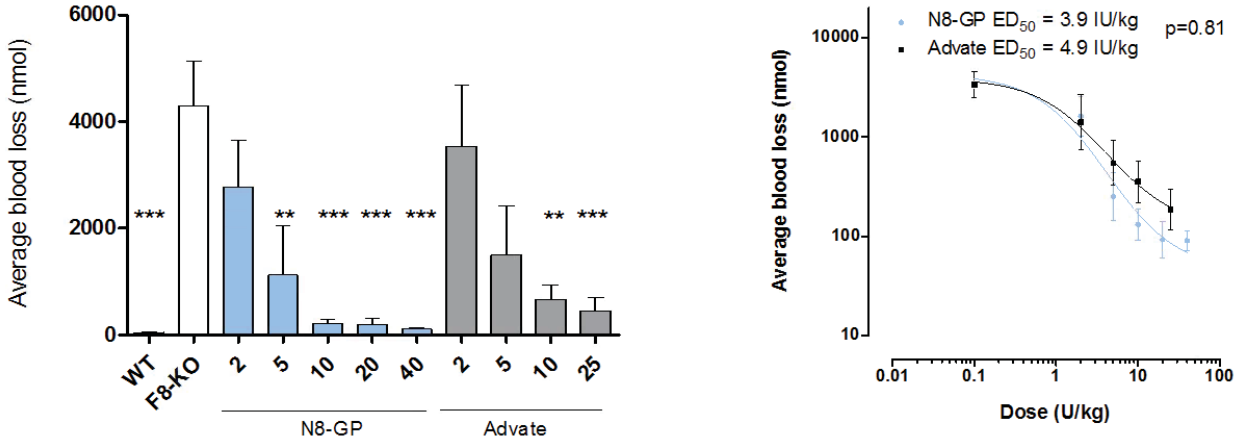
F8-KO マウス（Taconic M&B 社、Denmark）8 匹（雌雄各 4 匹）／群〔ただし、アドベイト®10 U/kg 投与群では、雌 1 匹で適正に投与が行われなかったため、7 匹（雄 4 匹、雌 3 匹）／群〕をイソフルランで麻酔し、2、5、10、20 及び 40 IU/kg の用量で被験物質（N8-GP 又はアドベイト®）を尾静脈に投与した。また、対照群として F8-KO マウス及び C57/Bl6 マウス（Taconic M&B 社、Denmark）8 匹（雄雌各 4 匹）／群に対し、アドベイト®溶媒（38 mg/mL マンニトール；1.9 mg/mL L-ヒスチジン；12

mmol/L トリス；6.3 mg/mL 塩化ナトリウム；0.1 mg/mL グルタチオン；0.15 mg/mL ポリソルベート 80；10 mg/mL トレハロース；0.28 mg/mL 塩化カルシウム；pH 約 7.3）を投与した。

被験物質投与後 5 分に右伏在静脈を切断し、止血が起こるまで 20 秒ごとに緩徐に血液を拭き取りヘモグロビン分析に供した。切断後 30 分間、この手順を繰り返した。データは SAS ver 9.2（SAS Institute 社、Cary, NC, USA）を用いて分析した。投与群間の比均質分散及び変量効果を検討するため、ANOVA 及び Tukey 法による多重比較検定を行った。曲線を E_{max} シグモイド投与反応モデルにフィッティングし、ED_{50} 値を F 検定（Prism 5.0、GraphPad Software, Inc.社、USA）を用いて比較した。

［結果］

野生型（C57/Bl6）マウスにおける平均出血量は、溶媒投与 F8-KO マウスと比較し著しく低かった（$p<0.001$）。10 IU/kg 以上の用量では、N8-GP 及び Advate®は溶媒と比べ総出血量を著しく減少させた（$p<0.05$）。N8-GP の 10 IU/kg 投与群及びアドベイト®の 25 IU/kg 投与群では野生型マウスと比較し平均出血量に統計学的差異は認められなかった。両被験物質の ED_{50} に統計学的有意差はみられなかった（$p=0.81$）（図 2.6.2-6）。



Note: Data are means ± SEM; n=7-8. Blood loss is determined as nmol haemoglobin. Statistical analysis of blood loss (left figure): ANOVA accounting for the possible heterogeneous variation between groups, and random effects were applied and adjusted for multiple comparisons by Tukey-adjustment. **: $p<0.01$, ***: $p< 0.001$ compared to the F8-KO group. Numbers on x-axis (left figure) are doses in U/kg. Statistical analysis of ED_{50} (right figure): ED_{50} values were compared by F-test.
Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; ED_{50} = median effective dose (potency estimate); F8-KO = coagulation factor eight gene knockout mice (receiving vehicle); WT = wild-type mice (C57/Bl6).

図 2.6.2-6　F8-KO マウス伏在静脈出血モデルにおける平均出血量

［結論］

伏在静脈出血モデルにおいて、N8-GP 及びアドベイト®はいずれも用量依存的に血液凝固を改善し、ED_{50} は同程度であり、10 IU/kg 以上の用量で正常動物と有意差のないレベルに達した。

2.6.2.2.4.3　F8-KO マウス尾静脈切断出血モデルにおける N8-GP 及び N8 の用量反応関係（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

F8-KO マウス尾静脈切断出血モデルを用いて N8-GP 及び N8 の薬理作用を検討した。標準的な尾切断出血モデルでは腹側動脈を含む尾先端のすべての血管を切断するが、近年、投与部位を外側尾静脈に限局した新たな F8-KO マウス尾静脈切断出血モデルが確立されたことから、N8 を対照薬とし、新たな出血モデルにおける各種用量の N8-GP による効果を検討した[5]。

［方法］

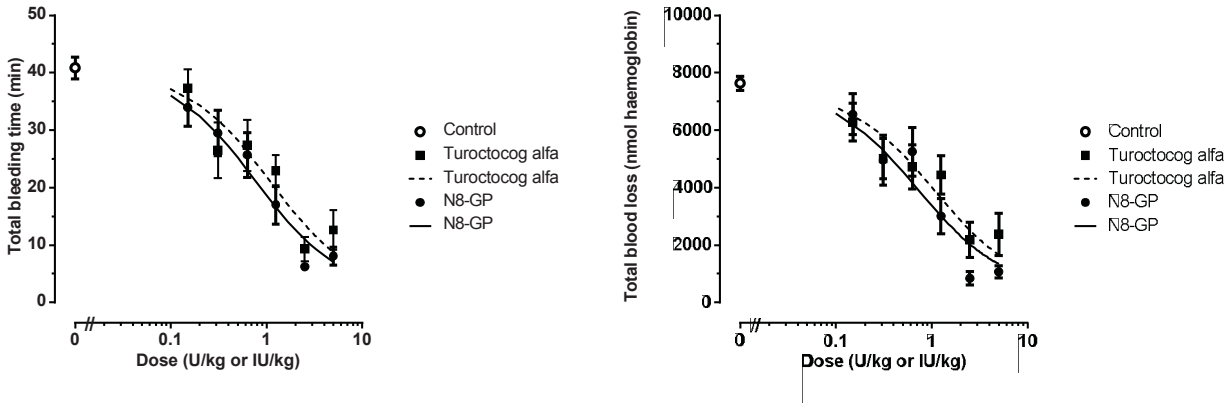
F8-KO マウス（Taconics 社、Ry, Denmark）12 匹（雌雄各 6 匹）／群、対照群では 6 匹（雌雄各 3 匹）／群をイソフルランで麻酔し、尾を 37°C の生理食塩液に浸した。被験物質（N8-GP 又は N8）を 0.15、0.31、0.63、1.25、2.5 及び 5 IU/kg の用量で右外側尾静脈に投与した。また、対照群の F8-KO マウスには溶媒（3 g/L ショ糖；1.5 g/L L-ヒスチジン；18 g/L 塩化ナトリウム；0.1 g/L Tween 80；0.25 g/L 塩化カルシウム、pH 約 7.3）を投与した。投与後 5 分に尾の直径が 2.5 mm となる部位で左外側尾静脈を切断し、出血プロファイルを 60 分間視覚的に記録した。出血量は採取血液中のヘモグロビン量として測定した。

データは、グラフ化のため医療統計解析プログラム GraphPad Prism 6.0（GraphPad Software 社、San Diego California, USA）に、統計分析のため SAS 9.2（SAS Institute 社、Cary, NC, USA）に入力した。N8-GP 投与群及び N8 投与群と溶媒投与群間の差異を Dunnett 検定による一元配置 ANOVA で解析した。N8-GP 投与群及び N8 投与群間の差異は二元配置 ANOVA により解析し、Tukey 法による多重比較検定を行った。非線形回帰により逆用量反応方程式をデータにフィッティングし、N8-GP 投与群及び N8 投与群における総出血時間及び出血量の投与反応曲線を作成し、ED_{50} 推定値及び 95%信頼区間を推定した。

［結果］

N8-GP 及び N8 の用量増加に伴う、総出血量及び総出血時間の減少が認められた（図 2.6.2-7）。総出血時間に対する N8-GP 及び N8 の ED_{50} 推定値はそれぞれ 0.76 IU/kg（0.11–1.41）及び 1.07 IU/kg

（0.086–2.04）であった。また、総出血量に対する N8-GP 及び N8 の ED_{50} 推定値はそれぞれ 0.71 IU/kg（0.15–1.28）及び 1.06 IU/kg（0.073–2.05）であった。この結果から、総出血時間及び総出血量に対する効力比（N8／N8-GP）は、それぞれ 1.40（0.85–2.29）及び 1.49（0.85–2.61）と算出された。両パラメータに対する効力比間に差異は認められなかった。



Note: Data are means ± SEM; n=12. Control is the vehicle group. Turoctocog alfa: N8

図 2.6.2-7　総出血時間及び総出血量に対する N8-GP 及び N8 の用量反応曲線

［結論］

F8-KO マウス尾静脈切断モデルにおいて、出血誘発前 5 分の N8-GP 又は N8 投与により、用量依存的な総出血時間及び総出血量の減少が認められた。両化合物の用量反応関係間に有意差は示されなかった。

2.6.2.2.4.4　F8-KO マウスにおけるアドベイト®と比較した N8-GP の止血効果延長（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

F8-KO マウス尾出血モデルを用いて、N8-GP とアドベイト®の効果持続時間を比較した。

［方法］

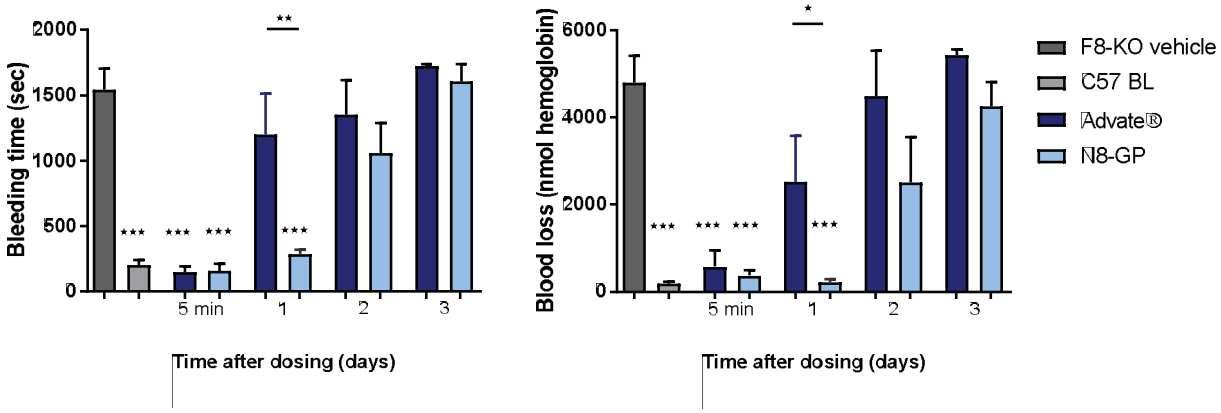
溶媒 5 mL/kg を C57Bl マウス 8 匹（雌雄各 4 匹）及び F8-KO マウス 12 匹（雌雄各 6 匹）に、N8-GP を 200 IU/kg の用量で F8-KO マウス 24 匹（雌雄各 12 匹）に、アドベイト®を 200 IU/kg の用量で F8-KO マウス 24 匹（雌雄各 12 匹）に対し、それぞれ尾静脈内投与した。マウスをイソフルランで麻酔し、温熱パッド上で体温を維持した。尾を 37°C の生理食塩液中で 10 分間予熱した。投与後 5 分ならびに 1、2 及び 3 日に、メスで尾先端部から 4 mm を切断し出血させた。

出血時間及び出血量を 30 分間観察した。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の時間の総和とした。出血量は生理食塩液中のヘモグロビン濃度測定値から、ヘモグロビン量（nmol）として測定した。さらに、FVIII 発色性合成基質法による測定を行い、血漿試料中 FVIII:C を ILS（国際血漿標準品）血漿による検量線に基づき算出した。検出限界は 0.5 mIU/mL であった。

医療統計解析プログラム GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software 社、Inc. USA)を計算及び統計学的検定のために使用した。結果は、両側一元配置 ANOVA 及び Bonferroni 法による多重比較検定を行った。曲線を E_{max} シグモイド用量反応モデルにフィッティングし、EC_{50} は F 検定を用いて比較した。

［結果］

両化合物とも止血誘発能を有し、出血を正常化した（図 2.6.2-8）。投与後 1 日において、N8-GP による止血効果の正常化が維持された一方で、アドベイト®の止血効果は消失し、両化合物投与群間で出血時間及び出血量に有意差がみられた。投与後 3 日において、両化合物の止血効果は消失した（図 2.6.2-8）。



Note: Data are means ± SEM; n=6-12. Left figure shows bleeding time, and right figure shows blood loss. p<0.05 (*), p<0.01 (**) and p<0.001 (***) compared to F8-KO negative control/wild-type mice (C57 BL) positive control at 5 minutes or between N8-GP or Advate® at specific time points.
Abbreviations: C57 BL (C57Bl/6) = C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout mice.

図 2.6.2-8　F8-KO マウスにおける N8-GP 及びアドベイト®（200 U/kg）の効果持続

血漿試料中 FVIII:C 活性を、試験終了時（損傷後 35 分ならびに 1、2 及び 3 日）に発色性合成基質法により測定した。投与後すべての時点において、N8-GP の活性はアドベイト®より有意に高かった。急性期の出血時間及び出血量を正常化する N8-GP 及びアドベイト®の濃度はそれぞれ 2.24±0.24 及び 1.52±0.14 IU/mL であった（p<0.001）。投与後 1 日の、N8-GP 投与群における FVIII 濃度は 0.74±0.13 IU/mL であり、出血を正常化した一方、アドベイト®投与群における FVIII 濃度は 0.10±0.02 IU/mL であ

り、ごくわずかな止血効果を有するのみであった（p<0.01）。正常な C57Bl マウスの FVIII 活性値は 0.91±0.09 IU/mL であった。N8-GP 投与群及びアドベイト®投与群における血漿中 FVIII 濃度の対数関数として出血時間及び出血量の曲線をフィッティングしたところ、EC_{50} 値が類似していることが確認された。出血時間の EC_{50} 値は N8-GP 及びアドベイト®双方で 0.143 IU/mL であり（p=0.996）、出血量の EC_{50} 値は N8-GP 及びアドベイト®でそれぞれ 0.132 IU/mL 及び 0.111 IU/mL であった（p=0.829）。

［結論］

損傷前 5 分の N8-GP 及びアドベイト®の 200 IU/kg 投与により、血友病 A マウスの尾出血は両化合物により正常化された。また、アドベイト®と比較し N8-GP の効果はより長時間維持され、アドベイト®よりも効果持続時間が延長していることが裏付けられた。

2.6.2.2.4.5 F8-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®の効果（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

F8-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルを用いて、N8-GP の効果持続時間をアドベイト®と比較した[6]。損傷は野生型マウス（C57Bl/6）では血管閉塞を惹起するが、F8-KO マウスでは血管閉塞が発現しない。

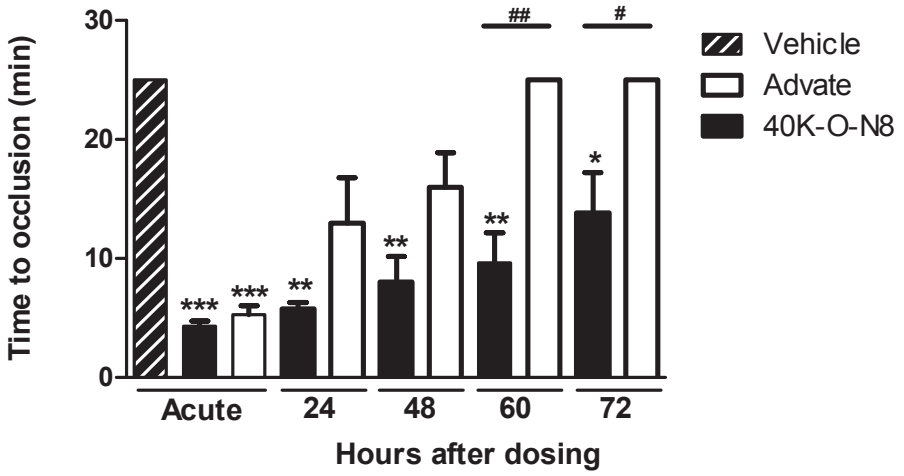
［方法］

F8-KO マウス（Taconic M&B 社、Ry, Denmark）6～10 匹/群に N8-GP 又はアドベイト®を 280 IU/kg の用量で尾静脈内投与した。また、F8-KO マウス対照群にはアドベイト®溶媒（38 g/L マンニトール；1.9 g/L L-ヒスチジン；12 mmol/L トリス；6.3 g/L 塩化ナトリウム；0.1 g/L グルタチオン；0.15 g/L Tween 80；10 g/L トレハロース；0.28 g/L 塩化カルシウム、pH 約 7.3）を投与した。投与後 5 分ならびに 24、48、60 及び 72 時間に、10%塩化鉄溶液に浸したフィルターペーパー（2 x 5 mm）を頸動脈に 3 分間当てることにより血管損傷を惹起した。塩化鉄浸潤フィルターペーパー除去後 25 分間、ソフトウェア Chart5（version 5.5.5.20、AD instruments 社）を用いて血流を記録し、血管閉塞までの時間を測定した。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。血管閉塞時間は、Kruskal-Wallis 検定及び Dunn 法による多重比較検定により比較した。

［結果］

N8-GP 及びアドベイト®を投与したすべての F8-KO マウスにおいて投与後 5 分に血管閉塞が認められ、平均血管閉塞時間はそれぞれ 4.3 ± 0.4 及び 5.2 ± 0.7 分であった。投与後 5 分ならびに 24～72 時間における N8-GP 投与群の平均血管閉塞時間は溶媒投与群と比較し統計学的に有意に短かった（p<0.05）。

一方、アドベイト®投与群では、投与後 5 分でのみ溶媒投与群との有意差がみられた（図 2.6.2-9）。N8-GP 投与群の平均血管閉塞時間は、24 時間時点の 5.8 ± 0.5 分から 72 時間時点で 13.8 ± 3.4 分まで増加した。一方、アドベイト®投与群の平均血管閉塞時間は 24 時間時点の 13.0 ± 3.4 分から 48 時間時点で 15.9 ± 2.9 分まで増加したが、60 及び 72 時間時点では血管閉塞は認められなかった。



Note: Means ± SEM of 6-10 mice per group are shown. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 compared to vehicle. #: p<0.05; ##: p<0.01 comparing to Advate® to N8-GP at individual time points. Acute is 5 minutes.
Abbreviations: 40K-O-N8 = N8-GP.

図 2.6.2-9　F8-KO マウス塩化鉄損傷モデルにおけるアドベイト®と比較した N8-GP（280 IU/kg）の急性期における効果持続時間の延長

さらに、N8-GP を投与したすべてのマウス（100%）において 24 時間時点で血管閉塞が示されたが、アドベイト®においてはわずか 67%であった。N8-GP 投与群では 72 時間後において血管閉塞が確認されたが、アドベイト®投与群では 60 及び 72 時間後に血管閉塞は認められなかった。

［結論］

F8-KO マウス塩化鉄誘発損傷モデルにおける N8-GP の効果は、急性期においてはアドベイト®と類似しているが、持続時間は有意に延長されていることが示された。

2.6.2.2.4.6　F8-KO マウス関節出血モデルにおける N8-GP の止血効果の延長（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

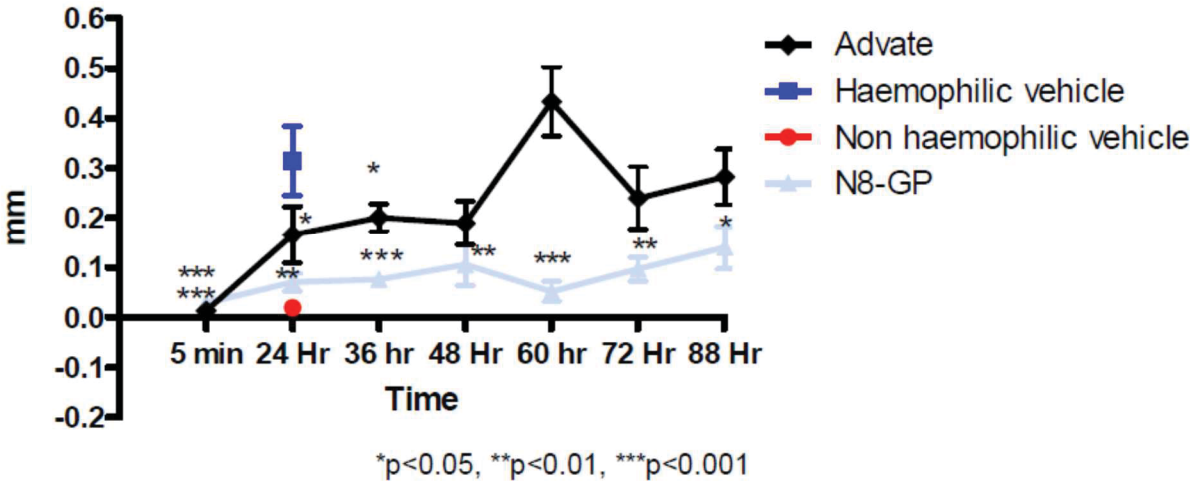
F8-KO マウス針穿孔誘発関節出血モデルを用いて、N8-GP とアドベイト®の止血効果及び効果持続時間を比較した。

［方法］

試験 0 日に F8-KO マウス（Taconic M&B 社、Ry, Denmark）9～15 匹/群に 280 IU/kg の用量で N8-GP 又はアドベイト®を尾静脈内投与した。また、対照群として、F8-KO マウス 8 匹（雌雄各 4 匹）又は C57/Bl マウス 10 匹（雌雄各 5 匹、いずれも Taconic M&B 社、Ry, Denmark）に溶媒（3 g/L ショ糖；1.5 g/L L-ヒスチジン；18 g/L 塩化ナトリウム；0.1 g/L Tween 80；0.25 g/L 塩化カルシウム、pH 約 7.3）を投与した。投与後 5 分ならびに 24、36、48、60、72 及び 88 時間に、膝関節を 30G 針で穿孔し出血させた。関節出血誘発後 24 時間にマウスを安楽死処置し関節の直径を記録した。データは ANOVA により解析し、GraphPad Prism 5（GraphPad Software, Inc.社、USA）を使用してグラフを作成した。

［結果］

アドベイト®投与群では、関節の直径の増大は 36 時間までしか抑制されなかった（図 2.6.2-10）。溶媒投与群の F8-KO マウスと比較し、N8-GP 投与群ではすべての時点で関節の直径の増大が統計的に有意に少ないことが示された。



Note: N8-GP or Advate® were administered intravenously to the mice at 280 U/kg, and needle-induced joint bleeding in the knee induced at 5 minutes, 24, 36, 48, 60, 72 and 88 hours after dosing. Change in joint diameter was measured. Data are mean and SEM of 10 mice per group at time points 5 minutes, 24 hours, 72 hours and 88 hours, and 15 mice per group at 36 to 60 hours after injury. Haemophilic vehicle: F8-KO mice. Nonhaemophilic vehicle: Normal mice (C57Bl/6). Both haemophilia and nonhaemophilic mice were treated with vehicle. *p <0.05, **p <0.01 and ***p<0.001 indicate significant difference between treated and nontreated FVIII-deficient mice[7].
Abbreviations: C57Bl/6 = C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout.

図 2.6.2-10　F8-KO マウス関節出血モデルにおける N8-GP の効果の延長

［結論］

F8-KOマウス関節出血モデルを用いて関節腫脹及び関節内出血に対する効果をアドベイト®と比較した結果、N8-GPの効果持続時間は有意に延長されていることが示された。

2.6.2.2.4.7　血友病Aマウス膝関節出血誘発モデルにおける関節症発現に対するN8-GP予防投与の効果（Table 2.6.3.2、301242）

［目的］

血友病動物モデルにおける膝関節出血誘発後に、N8-GPの投与による関節症発現抑制効果を検討した。

［方法］

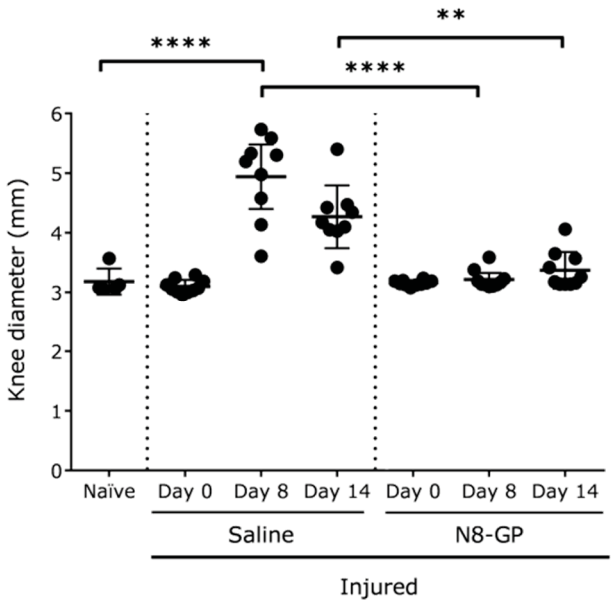
試験0及び7日に、雌雄F8-KOマウス（Taconic M&B社、Denmark）にN8-GP（n=10）500 IU/kg又は溶媒（0.9%生理食塩液、n=10）を静脈内投与した後、針穿刺によって膝関節出血を誘発した。また、出血誘発を行わないnaïve F8-KOマウス（n=5）を対照群として設定した。試験0、7、8及び14日に膝関節腫脹を観察した。試験14日にnaïve膝関節及び損傷膝関節をマイクロCTでスキャンし、病理組織学的検査を実施した。マイクロCTで検知された骨変化の評点を記録し、切断面をValentinoスコア及び血友病性関節症スコアで病理組織学的に評価した。

Valentinoスコアは、滑膜過形成、血管分布、ヘモジデリン、血液の有無、絨毛形成及び軟骨びらんを測定する複合スコアであり、冠状切断面に対して用いた[8]。

統計分析はGraphpad Prism 7.03（GraphPad Software, Inc.社、San Diego, USA）を使用して行った。膝関節の直径変化に関する統計分析は、反復測定一元配置ANOVA（Sidakの多重比較検定）により行った。病理組織学的評価及びマイクロCTによる骨再形成測定は、Welch補正での単独観測による対応のないt検定で解析した。Pearson線形相関係数を用い、Valentinoスコアの観察者間における一致性を評価した。FVIII抗体結合の結果は、両側状況変異分析及びFisherの正確確率検定を用いて比較した。

［結果］

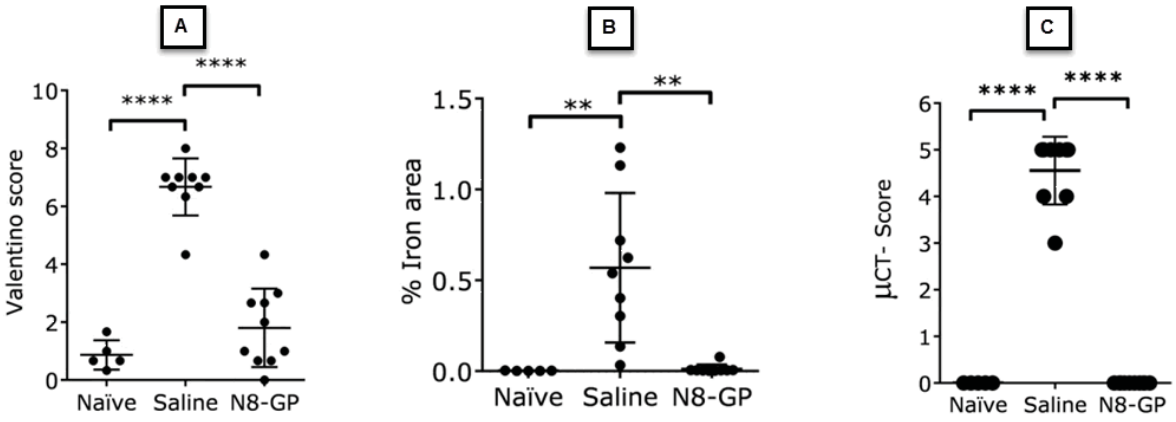
血漿中曝露分析から、すべてのN8-GP投与マウスにおける適正な投与が確認された。抗N8-GP中和抗体を形成するF8-KOマウスはみられなかった。生理食塩液投与F8-KOマウスにおいて、1匹（動物番号49）に重度の体重減少が認められたことから安楽死処置し、以降の解析には使用しなかった。残りの9匹において、膝関節出血誘発が著しい腫脹を惹起し、試験14日まで関節の直径増大が測定された。N8-GPの予防投与によって、生理食塩液投与マウスと比較して膝関節の直径が試験8日（$p<0.0001$）及び試験14日（$p=0.0011$）のいずれにおいても有意に減少した（図 2.6.2-11）。



Note: Knee diameter measured on days 0, 8 and 14 after injection of N8-GP or saline to F8-KO mice. Single observations, data are means ± SD, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test, **p<0.01 and ****p<0.0001.
Abbreviations: ANOVA = analysis of variance.

図 2.6.2-11　膝関節損傷 F8-KO マウスの膝関節直径に対する N8-GP の作用

損傷前に N8-GP を投与したところ、滑膜炎発現の減少（p<0.0001）（図 2.6.2-12A）、ヘモジデリン沈着の抑制（p=0.0036）（図 2.6.2-12B）、及び骨病態の完全予防（p<0.0001）（図 2.6.2-12C）が認められた。



Note: (A) Histopathological Valentino score. Single observations, mean ± SD unpaired t-test with Welch's correction. (B) Automated image analysis showed a significant reduction in hemosiderin deposition measured as % iron area in the N8-GP-treated mice compared to saline treatment. The bone marrow was excluded in the analysis. Single observations, means ± SD, unpaired t-test with Welch's correction. (C) Visual µCT of injured joints at day 14 (20 µm resolution). Single observations, mean ± SD, unpaired t-test, with Welch's correction. **p<0.01. ****p<0.0001.

図 2.6.2-12　膝関節損傷 F8-KO マウスの滑膜炎発現、鉄沈着及びマイクロ CT に対する N8-GP の作用

［結論］

F8-KO マウス血友病性関節症モデルに対する N8-GP の予防投与により、膝関節出血誘発後の関節腫脹及び滑膜炎が減少し、病理学的な骨再形成が完全に抑制された。

2.6.2.2.4.8　血友病 A イヌにおける N8-GP 及び N8 の薬力学及び薬物動態試験（Table 2.6.3.2、[redacted]）

［目的］

血友病 A（HA）イヌを用いて、N8-GP 及び N8 の PK 及び *ex vivo* PD プロファイルを比較した[9]。

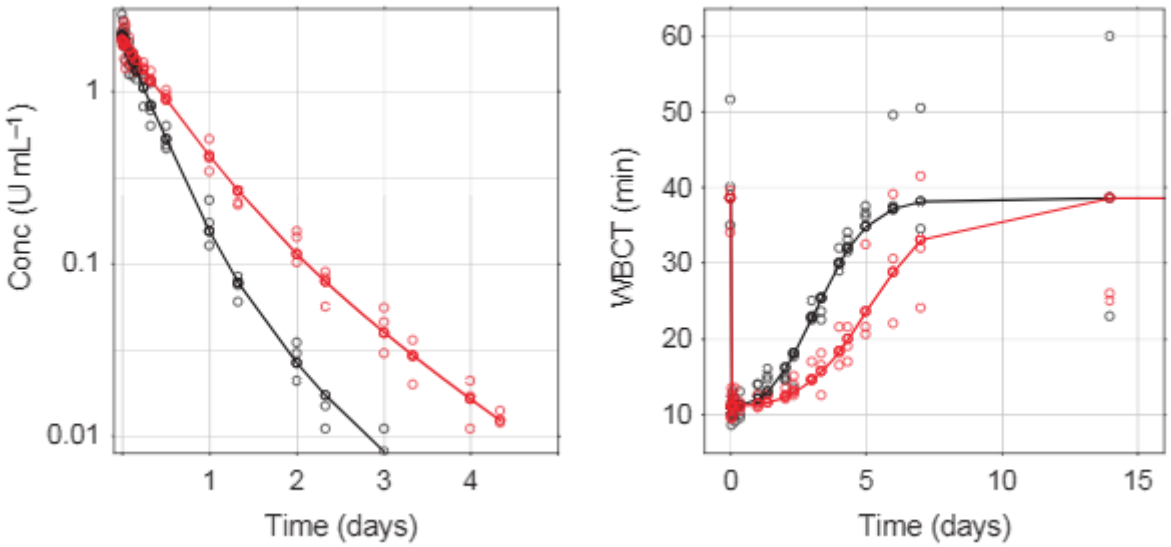
［方法］

HA イヌ 3 頭/群に N8 又は N8-GP を静脈内投与し、血漿中 FVIII 濃度を測定し両化合物の PK プロファイルを評価した。さらに、全血凝固時間（WBCT）及び TEG プロファイルを効果の代理マーカーとして評価した。PK データの詳細は Module 2.6.4.3.1 に記述する。

［結果］

N8 又は N8-GP を投与したイヌの個体間変動は、概してごくわずかであった。N8-GP 投与後の血漿中濃度プロファイルを N8 と比較した結果、N8-GP では、FVIII 測定法の種類に依存することなく血漿中半減期の延長が示された。N8-GP 投与群ではクリアランスが N8 投与群の 1/2 に減少していることが確認され、その減少は消失半減期にも反映されていた。両化合物の分布容積は同程度であった。血漿中 FVIII:C 値と同様に、WBCT 及び TEG パラメータ（R 値＝凝固時間、アングル＝凝血塊形成）も個体間変動はわずかであった。両被験物質とも、125 IU/kg 投与により WBCT、R 値及びアングルを正常化した。また、N8-GP 投与群では、血漿中半減期の延長が効果持続時間の延長に反映されていた（図 2.6.2-13）。

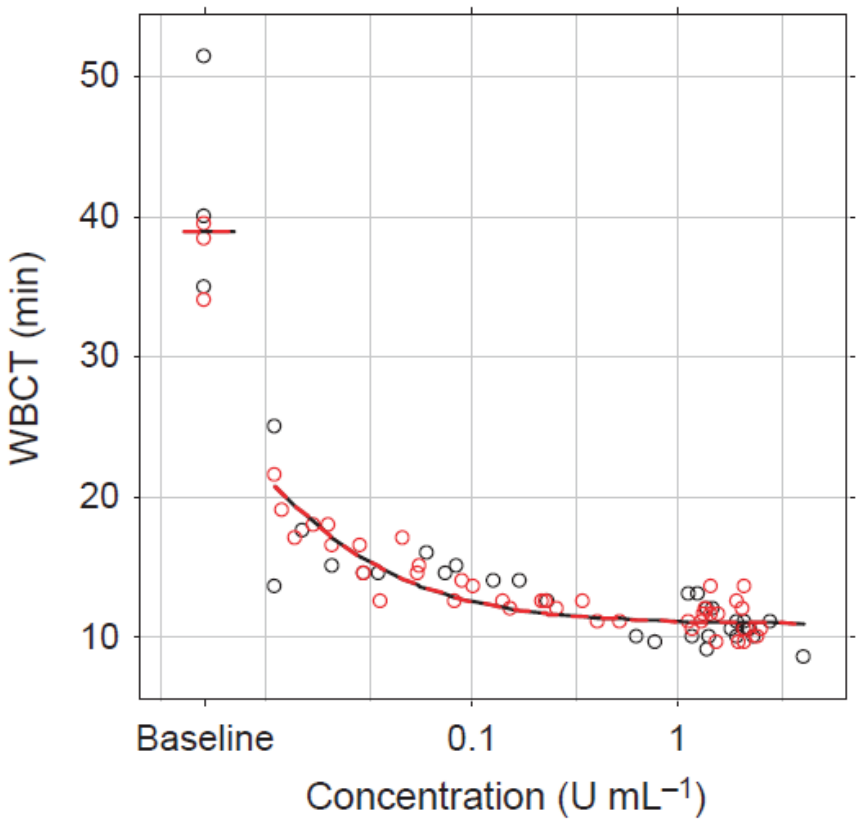
投与 5～15 分後の WBCT 値を比較した結果、両化合物とも HA イヌで観察されたベースラインにおける延長（> 40 分）を 8～12 分の正常範囲まで正常化した。同様に、両化合物は R 値及びアングルも正常化した。5 分時点で、R 値のベースライン値（40～60 分）は正常範囲である 6～9 分まで減少した。また、当該時点でのアングル値も正常であることが示された。



Note: Plasma concentration based on FVIII:C vs time (left figure), WBCT vs time (right figure); N8 (black) and N8-GP (red). Lines represent model fit, open circles the individual observed plasma concentration levels. Note the different scales on the X-axis. Figure adapted from [9].
Abbreviations: WBCT = whole blood clotting time.

図 2.6.2-13　血友病 A イヌにおける PK/PD プロファイル

PK 及び PD の相関関係を評価するため、血漿中濃度測定値に対し、代理 PD パラメータとして WBCT をプロットし PK 及び PD の直接的関係を評価した。その結果、N8 と N8-GP との差異はごくわずかであった（図 2.6.2-14）。



Note: WBCT (PD parameter) plotted against the observed concentration of N8 (black) and N8-GP (red) based on FVIII:C (PK parameter). Lines represent model fit. Figure adapted from [9].
Abbreviations: FVIII:C = factor eight coagulant activity; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s); WBCT = whole blood clotting time.

図 2.6.2-14　血友病 A イヌにおける PK 及び PD の相関関係

［結論］

N8-GP 及び N8 のいずれも、HA イヌへの 125 U/kg 投与により WBCT、R 値及びアングルを正常化した。N8-GP では、血漿中半減期の延長が TEG 及び WBCT で確認された効果持続時間の延長に反映されている。N8 及び N8-GP の PK/PD パラメータ相関関係から、両化合物が同等の効果及び力価を有することが示唆された。

2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　　非臨床安全性評価に用いる動物種の適切性

動物における *in vivo* 試験の結果を解釈するためには、N8-GP の内因性 VWF への結合及び複数の動物種において補因子機能（FVIII 活性）が保持されていることが不可欠である。

カニクイザル、ラット、イヌ及びヒトの血漿試料において、N8-GP は類似した VWF 結合能を示した。F8-KO マウスの血漿は野生型マウスの血漿より多くの N8-GP を吸収したようにみえたが、このことは、F8-KO マウスにおいて VWF が内因性 FVIII に占有されていないことに起因するものと推測された。結論として、N8-GP は、非臨床試験に用いた各種動物種の内因性 VWF への結合能を有していた（Table 2.6.3.2、209272）。

F8-KO マウスの全血において N8-GP はアドベイト®と類似した濃度反応関係を示し、F8-KO マウスにおいて薬理学的作用を有することが確認された（Table 2.6.3.2、[redacted]）。

毒性試験に用いたラット及びサルにおける薬理学的作用を確認するため、包括的なアッセイをトロンビン生成測定法により実施し、ラット、カニクイザル及びヒトにおける血漿中 N8-GP の活性を比較した（図 2.6.2-15）。トロンビン生成測定法から、N8-GP がヒト、ラット及びカニクイザルのすべての血漿において用量依存的な反応を惹起することが示され、このことから、ラット及びカニクイザルの凝固系における N8-GP の活性が示唆された（Table 2.6.3.2、[redacted]）。

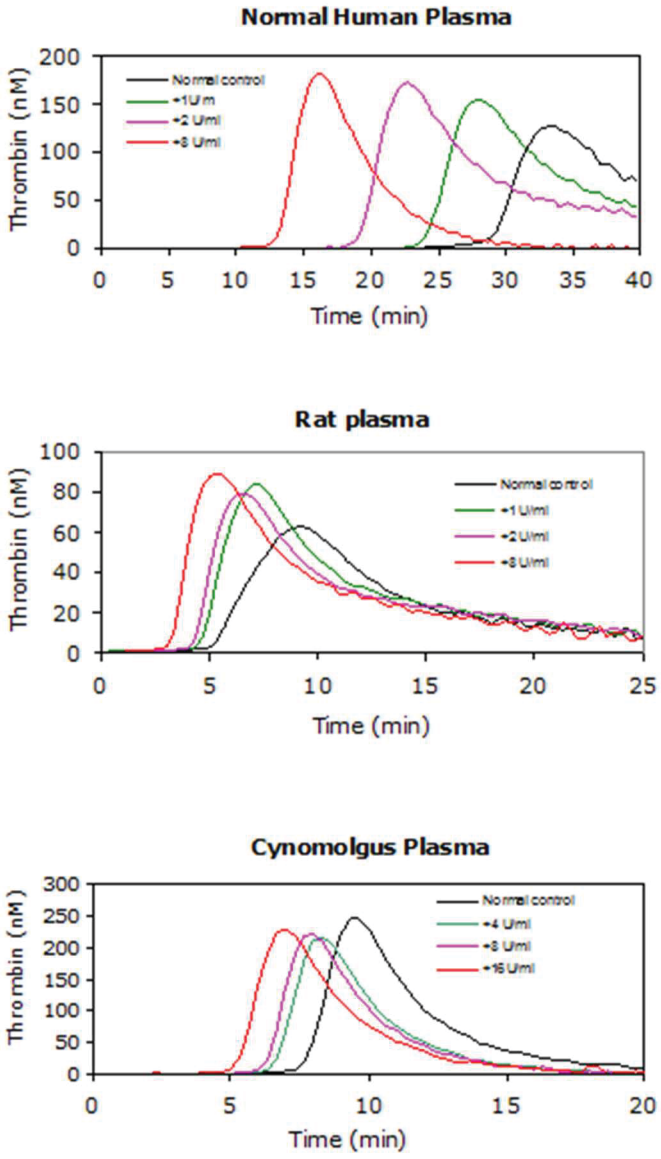


図 2.6.2-15　N8-GP 添加後の正常なヒト、ラット及びカニクイザルの血漿におけるトロンビン生成測定法による代表的なトロンボグラム（[redacted]）

2.6.2.3.2 [redacted] 実生産工程への変更を支持するための N8-GP の VWF 結合能の検討

2.6.2.3.2.1 [redacted] 実生産工程及び[redacted]実生産工程で製造された N8-GP の[redacted]及び VWF への結合（Table 2.6.3.2、[redacted]）

N8-GP の VWF への最適な結合には[redacted]が必要である。本試験により、[redacted]実生産工程の 3 ロット及び[redacted]実生産工程の 3 ロットの N8-GP における[redacted]及び精製ヒト VWF への結合を比較した。

[redacted]実生産工程ロットの N8-GP（ロット番号[redacted]、[redacted]及び[redacted]）及び[redacted]実生産工程ロットの N8-GP（ロット番号[redacted]、[redacted]及び[redacted]）3 ロットをトリプシンで消化し、LC-MS で分析した。

N8-GP と VWF との相互作用を、ヒト VWF を用いた結合実験（ELISA）により検討し、N8-GP 及びヒト VWF 間の相互作用における K_d 値を算出した。

[redacted]及び[redacted]合成ペプチドでの実験から、[redacted]ペプチドの検出レベルは 0.5%と推定される。すべての試料のうち 98%超において[redacted]が認められた。[redacted]レベルは、[redacted]実生産工程ロットの N8-GP（98.9±0.5%、平均値及び標準偏差）が[redacted]実生産工程ロットの N8-GP（3 ロットすべて>99.5%）よりわずかに低値であった。

N8-GP の VWF への結合における K_d 値を表 2.6.2-4 に示す。[redacted]実生産工程及び[redacted]実生産工程のロットにおける差異は認められなかった。

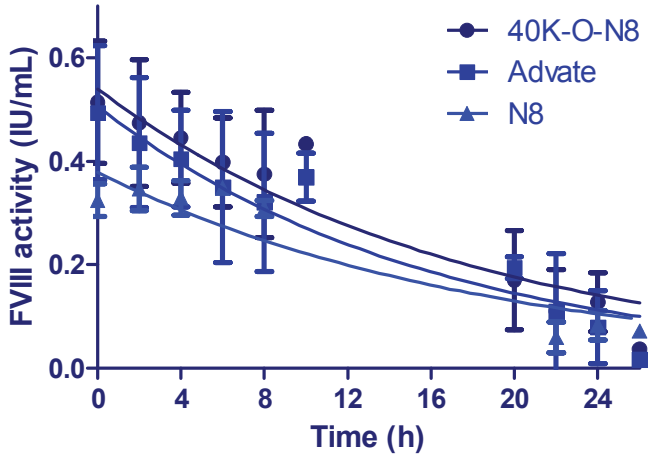
表 2.6.2-4　N8-GP の VWF への結合における K_d 値

	K_d (nM)*						p-value
	[redacted]						
Experiment I, Plate 1	0.63 (0.51-0.74)	0.61 (0.51-0.71)	0.66 (0.57-0.75)	0.65 (0.55-0.74)	0.63 (0.56-0.71)	0.70 (0.61-0.80)	0.33
Experiment I, Plate 2	0.61 (0.54-0.67)	0.62 (0.56-0.67)	0.58 (0.50-0.66)	0.61 (0.55-0.67)	0.59 (0.49-0.68)	0.62 (0.54-0.70)	0.86
Experiment II, Plate 1	1.07 (0.77-1.34)	1.01 (0.80-1.2)	1.08 (0.90-1.3)	0.91 (0.71-1.1)	1.07 (0.88-1.3)	1.02 (0.78-1.2)	0.36
Experiment II, Plate 2	1.18 (0.83-1.53)	1.07 (0.88-1.25)	1.16 (0.94-1.38)	1.14 (0.96-1.33)	1.08 (0.73-1.42)	1.11 (0.94-1.29)	0.57

* Data are fitted values and 95 % confidence intervals.

2.6.2.3.3　血友病 A 血漿中における N8-GP の *in vitro* 安定性（Table 2.6.3.2、209278）

クエン酸を添加したヒト血友病 A 血漿に対し、N8-GP 又はアドベイト®を目標活性値 0.5 IU/mL に至るまで添加し、安定性を検討した。試料を 37°C で 24 時間反応させ、発色性合成基質法により FVIII 活性を測定した（図 2.6.2-16）。



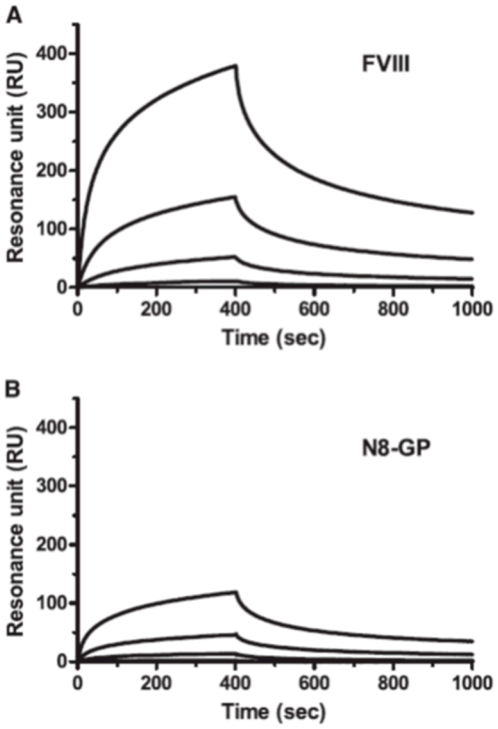
Note: FVIII activity as function of incubation times. At time 0 hours, citrate-stabilised human haemophilia A plasma was spiked with 0.5 IU/mL N8, N8-GP or Advate® and incubated at 37°C. Stability was measured up to 24 hours after spiking of the samples. Data are means ± SD of 4 to 6 independent experiments.
Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight; 40K-O-N8 = N8-GP.

図 2.6.2-16　血友病 A 血漿における反応時間と FVIII 活性値

FVIII 活性値を対数変換し算出した N8-GP、アドベイト®及び N8 の減衰速度はそれぞれ 0.058 ± 0.008 h^{-1}、0.071 ± 0.019 h^{-1} 及び 0.052 ± 0.007 h^{-1} であった（p=0.92）。すなわち、クエン酸添加血友病 A 血漿中における N8-GP の安定性とアドベイト®及び N8 の安定性の間に有意な差は認められなかった。

2.6.2.3.4　クリアランス受容体への結合（Table 2.6.3.2、209338）

ヒト及びマウスの低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）及び超低密度リポタンパク質受容体（VLDLR）に対する N8-GP 及び N8 の結合を、表面プラズモン共鳴（SPR）分析（Biacore T100）により検討した。N8-GP 及び N8 の LRP への結合から得られた結果を図 2.6.2-17 及び表 2.6.2-5 に示す。



Note: LRP was immobilised to a CM5 chip in a Biacore T100 instrument to 4000 to 5000 resonance units, and (A) N8, and (B) N8-GP at 12.5, 3.13, 0.78 and 0.2 nM allowed associating for 400 seconds and dissociating for 600 seconds using a flow of 10 mL/min.
Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight; LRP = low-density lipoprotein receptor-related protein.

図 2.6.2-17　N8-GP 及び N8 のセンサーグラム

表 2.6.2-5　　LRP と N8-GP 及び N8 の結合における結合定数

	Ka (1/Ms)[a]	**Kd (1/s)[b]**	**K_D (M)[c]**
N8-GP	1.327E+5	0.001698	1.279E-8
N8	4.070E+5	0.001681	4.131E-9

Note: N8-GP and N8 were tested in six different concentrations (50, 12.5, 3.13, 0.78, 0.2 and 0.05 nM). K_D is calculated from the Ka and Kd according to Kd/Ka = K_D. The constants were determined based on the assumption that a 1:1 interaction is observed.
[a]1/Ms = 1/mol/L second. [b]1/s = 1/second. [c]M = mol/L.
Abbreviations: LRP = low-density lipoprotein receptor-related protein; Ka = association constant; Kd = dissociation constant; K_D = binding constant.

N8-GP の LRP への結合は N8 と比較して約 1/3 倍に低下した。N8-GP の結合能の低下が主として結合速度の低下に起因する一方、解離速度にはほとんど影響はみられなかった（図 2.6.2-17）。LDLR 及び VLDLR クリアランス受容体においても同様の結果が得られた。このことから、PEG 化によって N8-GP とクリアランス受容体間の相互作用が遮断される可能性が示唆された（表 2.6.2-5）。

2.6.2.4　安全性薬理試験

ICH S6（R1）ガイドライン[10]を参照し、雄性カニクイザルに 100、500 及び 2500 IU/kg の用量で週 2 回投与する 2 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）に安全性薬理評価項目を組み込み（Module 2.6.3.4、209350）以下の評価項目〔血圧（カフ）、心電図（固定四肢誘導）、呼吸数（数及び深度）、神経学的／CNS 評価項目（行動、神経学的ならびに自律神経系の測定）及び尿検査〕を検討した。2500 IU/kg 以下の用量では、いずれの評価項目にも影響が認められなかったことから、本試験における NOAEL は 2500 IU/kg と考えられた。

2.6.2.5　薬力学的薬物相互作用試験

FVIII と特異的な薬物動態学的相互作用は認められておらず、予測もされていないことから、薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった。N8-GP 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）に結合しないと考えられるため、薬力学的薬物相互作用は予測されていない。

PEG 化薬剤について広範な研究が行われているが、文献報告においてタンパク質／ペプチドに結合した PEG 成分に関連する薬物相互作用の記述は認められず、PEG 成分に起因する薬物相互作用は予期されていない。

2.6.2.6　考察及び結論

各種 *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施し、N8-GP の薬理学的特性を分析かつ明らかにし、アドベイト® 及び N8 との比較を行った。

In vitro 生化学的特性解析から、FIXa 触媒による FX 活性化における N8-GP 及び rFVIII 製剤の補因子活性は類似していることが示された。APC 触媒による抑制速度は N8-GP 及び rFVIII 製剤と類似していた。トロンビン触媒による活性化速度は VWF の有無に関わらず、N8-GP 及びアドベイト®で類似していた。結合試験から、rFVIII 製剤と同様に N8-GP も VWF への結合能を有すること、また、N8-GP 及び rFVIII 製剤間で血漿中安定性に差異がないことが示された。N8-GP のクリアランス受容体（LRP、LDLR 及び VLDLR）への結合が N8 と比較して約 1/3 に減少したことから、PEG 化によって N8-GP とクリアランス受容体間の相互作用が遮断される可能性が示唆された。

発色性合成基質法、トロンビン生成測定法（TGA）及び TEG により N8-GP の FVIII:C 活性を評価したところ、アドベイト®及び N8 と類似していることが確認された。凝固一段法では、PEG の干渉より、複数の試薬による力価の過小評価がみられた。

N8-GP の *in vivo* 効果は、3 種の F8-KO マウス出血モデル（尾切断出血モデル、尾静脈切断出血モデル、伏在静脈出血モデル）を用いて評価した。

すべてのモデルにおいて N8-GP の止血効果は rFVIII 製剤と類似しており、N8-GP 及びアドベイト®の力価が類似していることが示された。また、使用したすべての *in vivo* 損傷モデルにおいて、N8-GP の効果持続時間が rFVIII 製剤と比較して延長されたことが示された。HA イヌにおいて、WBCT 及び TEG の評価による N8-GP 及び N8 の薬力学的作用の *ex vivo* 検討を行ったところ、N8-GP の効果持続時間の延長が示された。

カニクイザル 2 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）に、安全性薬理評価項目（血圧、心電図検査、呼吸数、体温、神経学的／CNS 評価項目及び尿検査）を組込んだ。2500 IU/kg 以下の用量において、いずれのパラメータにも影響が認められなかったことから、2500 IU/kg が本試験における NOAEL に相当すると考えられた。

総括として、主要な薬力学試験により、N8-GP の作用機序及び効果持続時間の延長が確認された。

参考文献

[1] Pipe SW. Functional roles of the factor VIII B domain. Haemophilia. 2009;15(6):1187-96.
[2] Christiansen MLS, Balling KW, Persson E, Hilden I, Bagger-Sørensen A, Sørensen BB, et al. Functional Characteristics of N8, a new recombinant FVIII. Haemophilia. 2010;16:878-87.
[3] Gu J-M, 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.
[4] Hillarp A, Bowyer A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring FVIII activity of glycopegylated recombinant factor VIII, N8-GP, with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: a two-centre study. Haemophilia. 2017;23(3):458-65.
[5] Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, Knudsen T. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anaesthetized haemophilia A mice - characterization of two novel FVIII molecules. Haemophilia. 2016;22(4):625-31.
[6] Rumbaut RE, Slaff DW, Burns AR. Microvascular thrombosis models in venules and arterioles in vivo. Microcirculation. 2005;12(3):259-74.
[7] Stennicke HR, Kjalke M, Karpf DM, Balling KW, Johansen PB, Elm T, et al. A novel B-domain O-glycoPEGylated FVIII (N8-GP) demonstrates full efficacy and prolonged effect in hemophilic mice models. Blood. 2013;121(11):2108-16.
[8] Valentino LA, Hakobyan N. Histological changes in murine haemophilic synovitis: a quantitative grading system to assess blood-induced synovitis. Haemophilia. 2006;12(6):654-62.
[9] Agerso H, Stennicke HR, Pelzer H, Olsen EN, Merricks EP, Defriess NA, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of turoctocog alfa and N8-GP in haemophilia A dogs. Haemophilia. 2012;18(6):941-7.
[10] ICH S6(R1). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.

ツロクトコグ アルファ 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 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 11
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物動態相互作用試験 12

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Primary pharmacodynamics ***In vitro pharmacology*** Binding of N8-GP to von Willebrand factor: comparison with Advate® and the influence of PEG size	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	211190	4.2.1.1-1
Quantification of rate of thrombin-catalysed activation of N8-GP with and without von Willebrand factor	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	216130	4.2.1.1-2
Quantification of N8-GP cofactor activity in FIXa-catalysed FX activation and rates of thrombin-catalysed N8-GP activation and activated protein C-catalysed inactivation of activated N8-GP	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	209276	4.2.1.1-3

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Utilising design of experiment to characterise sensitivity of the thrombin generation assay using N8 and N8-GP	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-4
Characterising sensitivity of the thrombin generation assay using N8 and N8-GP with FXIa as the trigger	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-5
Comparison of the concentration response relationship for Advate® and N8-GP on the thromboelastographic response in blood from F8-KO mice	*Ex vivo* F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-6
In vivo pharmacology					
Dose response relationships of N8-GP and Advate® on tail bleeding in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-7
Dose response of N8-GP and Advate® in a vena saphena bleeding model in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-8
Dose response of N8-GP and N8 in a tail vein transection bleeding model in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-9
Prolonged haemostatic effect of N8-GP in F8-KO mice compared to Advate®	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-10
Effect of N8-GP and Advate® in an $FeCl_3$-	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-11

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
induced injury model in F8-KO mice					
Prolonged haemostatic effect of N8-GP on joint bleeds in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.1-12
Effect of prophylactic treatment with N8-GP on the development of arthropathy in a haemophilia A mouse model of induced knee bleeding	F8-KO mice	i.v.	Novo Nordisk, DK	301242	4.2.1.1-13
Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of N8-GP and N8 in haemophilia A dogs	Haemophilia A dogs	i.v.	University of North Carolina, US	[redacted]	4.2.1.1-14
Secondary pharmacodynamics ***In vitro species qualification***					
Binding of N8-GP to von Willebrand factor	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	209272	4.2.1.2-1
In vitro thrombin generation assay in human, rat and cynomolgus monkey plasma to identify relevant toxicity species	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.2-2
Othes					
Binding of von Willebrand factor to N8-GP produced for the pivotal trial and in commercial scale	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	[redacted]	4.2.1.2-3
In vitro stability of N8-GP in haemophilia A plasma	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	209278	4.2.1.2-4
Binding to clearance receptors	*In vitro*	N/A	Novo Nordisk, DK	209338	4.2.1.2-5
Safety pharmacology					

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Safety pharmacology end points (respiratory, CV, CNS and kidney) included in pivotal GLP 2-week repeat-dose toxicity study in male cynomolgus monkeys **Pharmacodynamic drug interactions** No studies performed	Cynomolgus monkeys	i.v.	Covance, Harrogate, UK	209350 (part of repeat-dose toxicity study)	4.2.3.2-5

Abbreviations: CNS = central nervous system; CV = cardiovascular; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout mice; FIXa = activated coagulation factor nine; FX = coagulation factor ten; FXIa = activated coagulation factor eleven; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous(-ly); N/A = not applicable.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

Type of study	Test system or species/ strain	Method of admini-stration	Doses[a] (IU/kg/dose)	Gender and no. of animals per group	Noteworthy findings	Study ID
***In vitro* pharmacology** Binding of N8-GP to von Willebrand factor: comparison with Advate® and the influence of PEG size	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The interaction between N8-GP and human von Willebrand factor (VWF) was characterised by direct binding to purified human VWF. The dissociation constant for N8-GP (Kd = 0.30 ± 0.03 nM) was very similar to that of turoctocog alfa (Kd = 0.24 ± 0.02 nM) and Advate® (Kd = 0.23 ± 0.05 nM). N8-GP retains high affinity for human VWF and the dissociation constant is about 1.5-fold that of N8 or Advate®. There was a trend that the Kd value for the interaction between glycopegylated N8 and VWF increased with increasing PEG size.	211190
Quantification of rate of thrombin-catalysed activation of N8-GP with and without von Willebrand factor	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The thrombin-catalysed activation of N8-GP was not significantly different from turoctocog alfa or Advate® neither in the absence nor presence of VWF.	216130
Quantification of N8-GP cofactor activity in FIXa-catalysed FX activation and rates of thrombin-catalysed N8-GP activation and activated protein C-catalysed inactivation of activated N8-GP	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The FVIII cofactor activity was determined by measuring the rates of FIXa catalysed FX activation and it was shown that similar values were obtained for N8-GP and Advate®. The rate of thrombin-catalysed N8-GP activation was found to be similar to that of Advate® in the absence of VWF. The rate of APC-catalysed inactivation of activated N8-GP did not differ from activated Advate®.	209276
Utilising design of experiment to characterise sensitivity of the thrombin generation assay using N8 and N8-GP	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The variability of the thrombin generation assay (TGA) was acceptable (≤ 20% for most concentrations of turoctocog alfa or turoctocog alfa pegol). The sensitivity of the assay should be suitable to differentiate between severe and moderate haemophilia A (< 1% and > 1% FVIII, respectively).	[redacted]
Characterising sensitivity of the thrombin generation assay using N8 and N8-GP with FXIa	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The thrombin generation capacity of N8-GP and N8 was assessed by spiking experiments using plasma from haemophilia A patients and applying a thrombin generation assay (TGA) with either tissue factor (TF) or FXIa as trigger. The peak thrombin	[redacted]

Type of study	Test system or species/ strain	Method of admini-stration	Doses[a] (IU/kg/dose)	Gender and no. of animals per group	Noteworthy findings	Study ID
as the trigger					generation was shown to be concentration-dependent with TF as trigger, but concentration-independent with FXIa as trigger.	
Comparison of the concentration response relationship for Advate® and N8-GP on the thromboelastographic response in blood from F8-KO mice	*In vitro*	*Ex vivo* spiking	N/A	N/A	The study compared the thromboelastographic response in whole blood from F8-KO mice after spiking of Advate® and N8-GP into fresh blood. Both compounds improved dose dependently the clotting time and angle, and there was no statistically significant difference in potency between the two compounds.	[redacted]
***In vivo* pharmacology**						
Dose response relationships of N8-GP and Advate® on tail bleeding in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	N8-GP and Advate®: 0−200 IU/kg	M+F n=12/ group, 13 groups	The dose response relationships of N8-GP and Advate® were compared in the tail clip bleeding model. The ED_{50} values for total bleeding time and blood loss were estimated by fitting an inverse dose response equation to the data. No differences in the potency ratios were observed as the ED_{50} ratios between N8-GP and Advate® were found to be 1.12 (0.66−1.92, 95% CI) and 1.06 (0.63−1.78, 95% CI) for total bleeding time and blood loss, respectively.	[redacted]
Dose response of N8-GP and Advate® in a vena saphena bleeding model in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	N8-GP: 0−40 IU/kg Advate®: 0−25 IU/kg	M+F	The dose-dependent effect of N8-GP and Advate® on bleeding was examined in a vena saphena bleeding model in F8-KO mice. Both compounds caused a dose-dependent reduction in average bleeding time, average blood loss and maximum bleeding time reaching statistical significance at 5 or 10 IU/kg. Coagulation was dose-dependently improved with similar ED_{50} values and reaching a level not significantly different from the normal level at doses as low as 10 IU/kg.	[redacted]

Type of study	Test system or species/ strain	Method of admini-stration	Doses[a] (IU/kg/dose)	Gender and no. of animals per group	Noteworthy findings	Study ID
Dose response of N8-GP and N8 in a tail vein transection bleeding model in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	0−5 IU/kg	M+F n=12	The dose response relationships of N8-GP and turoctocog alfa were compared in the TVT bleeding model. The ED_{50} values for total bleeding time and blood loss were estimated by fitting an inverse dose response equation to the data. No differences in potency ratios were observed as the ED_{50} ratios between N8-GP and turoctocog alfa were calculated to be 1.40 (0.85–2.29, 95% CI) and 1.49 (0.85–2.61, 95% CI) for total bleeding time and total blood loss, respectively. Both potency ratios did not differ significantly from unity. Thus, no apparent differences in the dose response relationship between the two compounds could be demonstrated.	[redacted]
Prolonged haemostatic effect of N8-GP in F8-KO mice compared to Advate®	F8-KO mice	i.v.	200 IU/kg	M+F n=6-12	The duration of effect of N8-GP was compared to Advate® in the tail clip bleeding model, where blood loss and bleeding time were determined 5 minutes, and 1, 2, and 3 days after dosing. Both compounds normalised the bleeding parameters at 5 minutes with the haemostatic effect maintained at day 1 for N8-GP while the effect of Advate® had disappeared. At day 3, the effect of both compounds had disappeared.	[redacted]
Effect of N8-GP and Advate® in an $FeCl_3$-induced injury model in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	280 IU/kg	M+F n=6-10	The duration of effect of N8-GP compared to Advate® was investigated in a $FeCl_3$-induced injury model in F8-KO mice at 5 minutes, and 24, 48, 60 and 72 hours after dosing. N8-GP showed an acute effect similar to that of Advate®. Furthermore, the effect of N8-GP at 24 to 72 hours after dosing differed in a statistically significant manner from that of vehicle-treated control mice. Advate® only differed significantly from control mice 5 minutes after dosing.	[redacted]
Prolonged haemostatic effect of N8-GP on joint bleeds in F8-KO mice	F8-KO mice	i.v.	280 IU/kg	M+F n=10-15	The acute effect and duration of effect of N8-GP on needle-induced joint bleeding was compared to that of Advate®. A joint bleed was induced at 5 minutes, 24 hours, 36 hours, 48 hours, 60 hours, 72 hours and 88 hours post administration of test substances. Twenty-four hours following induction of the joint bleed, the mice were sacrificed and the diameter of the joints was	[redacted]

Type of study	Test system or species/ strain	Method of admini-stration	Doses[a] (IU/kg/dose)	Gender and no. of animals per group	Noteworthy findings	Study ID
					measured. Compared to Advate®, a significantly prolonged duration of effect of N8-GP was demonstrated. Treatment with Advate® prevented the increase in joint diameter up to 36 hours while N8-GP at all time points prevented an increase in joint diameter.	
Effect of prophylactic treatment with N8-GP on the development of arthropathy in a haemophilia A mouse model of induced knee bleeding	F8-KO mice	i.v.	500 IU/kg	M+F n=5-10	In F8-KO mice, it was investigated whether N8-GP can prevent development of arthropathy following induced knee bleeding. On days 0 and 7 the mice received N8-GP (n=9) or saline (n=10) followed by a needle puncture. Knee diameter was measured on days 0, 8 and 14, and on day 14 the bone changes were evaluated. Prophylactic treatment with N8-GP significantly diminished joint swelling and synovitis and completely prevented pathological bone modelling following induced knee bleeding.	301242
Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of N8-GP and N8 in haemophilia A dogs	Haemo-philia A dogs	i.v.	125 IU/kg	4M+2F	The two compounds were administered to haemophilia A (HA) dogs in order to evaluate the pharmacokinetic profile (described in Nonclinical Summary 2.6.4.3.1). In addition, the whole blood clotting time (WBCT) and thromboelastography (TEG) profile were used as surrogate markers for pharmacodynamics. Both compounds were able to normalise WBCT and TEG parameters. The longer plasma half-life for N8-GP was also observed in the TEG parameters and WBCT measurements.	[redacted]

[a]Single dose unless specified otherwise.

Abbreviations: 40K = 40 kilodalton; APC = activated protein C; CI = confidence interval; ED_{50} = median effective dose; F = female(-s); $FeCl_3$ = ferric chloride; FIXa = activated coagulation factor nine; FX = coagulation factor ten; FXIa = activated coagulation factor eleven; HA = haemophilia A; i.v. = intravenous(-ly); Kd = dissociation constant; M = male(-s); N/A = not applicable; PEG = polyethylene glycol; rFVIII = recombinant coagulation factor eight; TEG = thromboelastography; TF = tissue factor; TGA = thrombin generation assay; TVT = tail vein transection; Tyr = tyrosine; VWF = von Willebrand factor; WBCT = whole blood clotting time.

2.6.3.3 副次的薬理試験

Type of study	Test system or species/ strain	Method of admini-stration	Doses[a] (IU/kg/dose)	Gender and no. of animals per group	Noteworthy findings	Study ID
In vitro species qualification						
Binding of N8-GP to von Willebrand factor	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	N8-GP was shown to have the capability to interact with VWF from various animal species (cynomolgus monkey, rat, mouse and dog).	209272
In vitro thrombin generation assay in human, rat and cynomolgus monkey plasma to identify relevant toxicity species	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The *in vitro* thrombin generation assays showed that N8-GP produces a dose-dependent response in both human, rat and cynomolgus plasma thereby demonstrating activity of N8-GP in both the rat and cynomolgus coagulation systems.	[redacted]
Others						
Binding of von Willebrand factor to N8-GP produced for the pivotal trial and in commercial scale	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	[redacted] is required for optimal binding to VWF. This report provides data that binding to VWF and [redacted] for N8-GP manufactured by the commercial process, and the pivotal process can be regarded similar.	[redacted]
In vitro stability of N8-GP in haemophilia A plasma	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	The stability of N8-GP was investigated in citrate-stabilised haemophilia A plasma at 37°C for up to 24 hours and found not to differ significantly from the stability of Advate®.	209278
Binding to clearance receptors	*In vitro*	N/A	N/A	N/A	Binding of N8-GP to the LRP (low-density lipoprotein receptor-related protein) clearance receptor was reduced approximately 3-fold compared to N8. The reduced binding of N8-GP was primarily a result of slower on-rate, whereas the off-rates were largely unaffected. Similar results were obtained with the LDLR (low-density lipoprotein receptor) and VLDLR (very low-density lipoprotein receptor) clearance receptors. This indicates that pegylation results in shielding of the interaction between N8-GP and clearance receptors.	209338

Abbreviations: LDLR = low-density lipoprotein receptor; LRP = low-density lipoprotein receptor-related protein; N/A = not applicable; Tyr = tyrosine; VLDLR = very low-density lipoprotein receptor; VWF = von Willebrand factor.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses (IU/kg/dose)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
Central nervous system/general behaviour Respiratory function Kidney function Cardiovascular system	Cynomolgus monkeys	i.v.	0, 100, 500, 2500	5M (control) 8M (dosed)	None	Yes	209350 (part of repeat-dose toxicity study)

Abbreviations: i.v. = intravenous(-ly); M = male(-s).

2.6.3.5 薬力学的薬物動態相互作用試験

No pharmacodynamic drug interaction studies were performed as no specific pharmacokinetic interactions with FVIII are known or expected. N8-GP is neither expected to be metabolised by the drug metabolising CYP450 enzymes nor to bind to plasma proteins such as albumin or alfa-1-acid glycoprotein. For these reasons, no pharmacodynamic drug interactions are expected.

Drug interactions caused by the PEG moiety are not expected as PEGylated therapeutics have been widely studied, and descriptions of drug interactions related to the PEG moiety conjugated to proteins/peptides have not been found in the literature.