目次

1. 非臨床試験計画概略....4
2. 薬理試験....10
2.1 効力を裏付ける試験....10
2.1.1 効力を裏付ける試験要約....11
2.2 安全性薬理試験....12
2.2.1 安全性薬理要約....13
3. 薬物動態試験....13
3.1 薬物動態要約....14
4. 毒性試験....15
4.1 単回投与毒性....15
4.2 反復投与毒性....16
4.3 遺伝毒性....20
4.4 がん原性....20
4.5 生殖発生毒性試験....20
4.6 幼若動物試験....21
4.7 局所刺激性及びその他の試験....21
4.8 rVWF 製剤に含まれる添加物の安全性評価....22
4.9 毒性要約....22
5. 総括及び結論....23
6. 図表....27
参考文献....28

表

表 2.4-1. rVWF の単独又はアドベイトとの併用により実施した非臨床試験一覧....6
表 2.4-2. 新旧 VWF:RCo 活性測定法で測定した投与量の比較....9
表 2.4-3. 単回投与毒性試験における NOAEL....16
表 2.4-4. 主要な TK パラメータの要約（rVWF、ベースライン値補正）....19
表 2.4-5. 安全性薬理試験系の変動性....27

略語一覧

略語	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13	トロンボスポンジン 1 型モチーフ第 13 番を有するディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ
ADVATE	licensed human recombinant FVIII product	アドベイト（既承認薬である遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子製剤）
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 curve	濃度–時間曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_0	concentration at time zero after dosing	投与後 0 時点の濃度
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
Da	dalton	ダルトン
DUF	dilutional ultrafiltration	-
FEIBA	factor eight inhibitor bypassing activity	第 VIII 因子インヒビターバイパス活性複合体、活性型プロトロンビン複合体製剤
FEIBA NF/VH	FEIBA nanofiltered/vapor heated	FEIBA ナノフィルトレーション及び蒸気加熱処理
FEIBA VH	FEIBA vapor heated	FEIBA 蒸気加熱処理
FVIII	factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
Gammagard S/D	immune globulin intravenous solvent/detergent treated	静注用人免疫グロブリン製剤 有機溶媒及び界面活性剤処理
IU	International Unit	国際単位
NG IGIV	new generation intravenous immune globulin	新世代ヒト静注用免疫グロブリン製剤
kDa	kilo dalton	キロダルトン
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
pdFVIII	plasma-derived factor VIII	血漿由来血液凝固第 VIII 因子
pdVWF	plasma-derived von Willebrand factor	血漿由来 von Willebrand 因子
PD	pharmacodynamic	薬力学
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
rADAMTS13	recombinant ADAMTS13	遺伝子組換え ADAMTS13
rFVIII	recombinant factor VIII	遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子
rVWF	recombinant human von Willebrand factor	遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子（製剤）
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス

略語一覧（続き）

略語	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
U	unit	単位
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
VWD	von Willebrand's disease	von Willebrand 病
VWd	von Willebrand factor deficient	von Willebrand 因子欠損
VWF	von Willebrand factor	von Willebrand 因子
VWF:Ag	von Willebrand factor antigen	VWF 抗原
VWF:RCo	von Willebrand factor ristocetin cofactor (activity)	von Willebrand 因子リストセチンコファクター（活性）
WHO	World Health Organization	世界保健機関

1. 非臨床試験計画概略

非臨床プログラムにおいて、von Willebrand 病（VWD）を反映する様々な *in vitro* 試験及び非臨床動物モデルを用いて、遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子（rVWF）を単独で又は既承認薬である遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）製剤アドベイトとの併用により評価した。血漿由来 VWF（pdVWF）/血漿由来 FVIII（pdFVIII）（Haemate P、ヒト抗血友病因子/VWF 複合体）及びヒト血漿プールから高度に精製した VWF（1 試験のみ）を陽性対照物質として用いた。製剤処方緩衝液及び生理食塩液を陰性対照物質として用いた。

rVWF について単独で及びアドベイトとの併用により実施された非臨床試験には、薬力学、薬物動態（PK）、安全性薬理、単回投与毒性、反復投与毒性、局所刺激性及び免疫原性の評価が含まれる。

効力を裏付ける試験では、VWD の動物モデル［VWF 欠損（VWd）マウス、VWd イヌ］及び *in vitro* モデル 1 試験において血小板凝集塊の形成に対する超巨大 VWF マルチマーの関与を検討した。

安全性薬理試験では、心血管系、呼吸器系及び血液凝固系に及ぼす rVWF の影響をイヌを用いて評価し、血栓形成性をウサギを用いて評価した。アナフィラキシー様反応誘発性を自然発症高血圧ラット及びモルモットを用いて、それぞれ血圧低下作用及び気管支攣縮性アナフィラキシー様反応誘発性により検討した。中枢神経系に及ぼす rVWF の影響は、サルにおける 4 週間反復投与毒性試験で評価した。

PK 試験は、毒性試験で用いた動物種（ラット、カニクイザル）及び病態モデル（VWd マウス、VWd イヌ）に rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与して実施した。^{124}I 標識 rVWF の組織内分布を VWd マウスにおいて検討した。rVWF のヒト胎盤通過性を検討するため、ヒト胎盤を用いて *ex vivo* 灌流試験を実施した。

毒性評価のために、rVWF の単独及びアドベイトとの併用による単回投与毒性試験を、標準的なげっ歯類（ラット）及び非げっ歯類（ウサギ及びカニクイザル）に加え、VWd マウス、ADAMTS13 欠損マウス及び C57BL/6J マウスの動物モデルを用いて実施した。rVWF の単独及びアドベイトとの併用による 4 週間までの反復投与毒性試験を、標準的な動物のラット及びカニクイザルに加え、病態動物モデルの VWd ブタを用いて実施した。トキシコキネティクス（TK）解析は、ウサギ及びカニクイザルの単回投与毒性試験、並びにラット及びカニクイザルの反復投与毒性試験に含めた。カニクイザルでは、VWF 抗原（VWF:Ag）測定法はサルの内因性 VWF と rVWF とを区別しない。そのため、投与薬物 rVWF の曝露量［最高濃度（C_{max}）及び濃度–時間曲線下面積（AUC）に基づく］は、投与前の内因性 VWF 濃度を差し引いてベースライン値を補正することによっても評価した。ラット及びウサギでは、VWF:Ag 測定法は内因性 VWF と交差反応しない（又はごくわずかしか交差反応しない）ため、内因性ベースライン値の補正は不要であった。rVWF の遺伝毒性試験として、ネズミチフス菌を用いた *in vitro* 復帰突然変異試験、ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験及び *in vivo* マウス小核試験を実施した。rVWF の単独及びアドベイトとの併用投与による局所刺激性試験はウサギを用いて実施した。rVWF の単独及びアドベイトとの併用投与による免疫原性は、Balb/c マウスだけでなく、血友病マウスモデル（E17 血友病 Balb/c マウス、E17 血友病 C57BL/6J マウス及び E17 血友病ヒ

ト F8 トランスジェニックマウス）も用いて検討した。*In vitro* 毒性発現機序試験は、非臨床モデル系として通常使用される異なる動物種の血漿を用いて実施した。

Shire で製造される rVWF は、既承認の rFVIII 製剤であるアドベイトを発現する CHO 細胞と同一の細胞に発現する高純度 rVWF である。VWF タンパク質はアドベイトの細胞培養工程から分離され、遺伝子組換えフューリンを用いて完全に成熟させ、有機溶媒及び界面活性剤（S/D）処理後、約 130 IU VWF:RCo/mL まで濃縮される。

rVWF は、滅菌注射用蒸留水を用いて調製する凍結乾燥製剤として供給される。臨床使用において、rVWF は初回投与時に rFVIII との併用により静脈内投与され、その後は単独製剤として投与される。初回投与時の用量比は、1 IU の rFVIII に対して 1.3 IU VWF:RCo の rVWF であり、この比率は Haemate P の VWF:FVIII の比に基づいており、非臨床試験にはこの用量比を反映させた。

非臨床安全性及び効力試験は、臨床試験で使用したロットを代表するロットを用いて実施した。非臨床及び臨床試験用の原薬ロットはいずれも同じ製造工程を用いて製造した。唯一の違いは、非臨床試験用ロットは[redacted]クロマトグラフィーの直後に保存し、臨床試験用ロットは[redacted]クロマトグラフィー後 dilutional ultrafiltration（DUF）緩衝液で透析ろ過処理して保存したことである。非臨床及び臨床試験用の原薬ロットの安定性は同等であり、代表的ロットの特性に相違は認められなかった。非臨床及び臨床試験用の原薬の一致性については 2.3.S.3 特性に記載している。広範な生化学的比較試験を実施し（2.3.S.2.6 製造工程の開発の経緯）、異なるロット間の完全な同等性が示された。したがって、更なる非臨床 *in vivo* 試験の実施は妥当又は必要とは考えられなかったことから、実施しなかった。

rVWF で実施した非臨床試験一覧を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1. rVWF の単独又はアドベイトとの併用により実施した非臨床試験一覧

Study Number	Study	Species	rVWF	rVWF+ ADVATE	GLP
Primary Pharmacodynamics					
KRAGH 2014	*In vitro* pharmacodynamics	Human blood	✓	-	-
BA0107	Arterial thrombosis	VWd mouse	✓	✓	-
BA0207	Tail tip bleeding	VWd mouse	✓	✓	-
BA1207	Arterial thrombosis	VWd mouse	✓[a]	✓	-
RD_VB_110703	Haemostasis	VWd dog	✓	-	-
Safety Pharmacology					
34572	Cardiovascular and respiratory	Dog	✓	✓	✓
PV2010701	Thrombogenicity	Rabbit	✓	✓	✓
PV2040705	Anaphylactoid potential	Spontaneously hypertensive rat	✓	✓	✓
PV1900605	Anaphylactoid potential	Guinea pig	✓	✓	✓
Pharmacokinetics					
PV1960607	PK	VWd mouse	✓	✓	✓
PV1910605	PK	Rat	✓	✓	✓
BAX0010+DI07K001	PK	Cynomolgus monkey	✓	✓	[c]
RD_VB_110703	PK	VWd dog	✓	-	-
BAX3/2 / PET5	*In vivo* organ distribution by ^{124}I-rVWF-microPET	VWd mouse	✓	-	-
Plac-Lab-12-12	*Ex vivo* organ distribution	Human placentae	✓	-	-
Toxicology					
PV1940601	Single Dose Toxicity	ADAMTS13 knock out mouse	✓	✓	✓
PV1990701	Single Dose Toxicity	C57BL/6J mouse	✓	✓	✓
PV1930601	Single Dose Toxicity	VWd mouse	✓	✓	✓
AU0507W01	Single Dose Toxicity	ADAMTS13 knock out mouse	✓[b]	-	-
PV1950601	Single Dose Toxicity	Rat	✓	✓	✓
BAX0009+PV2140708 (TK)	Single Dose Toxicity incl. TK	Rabbit	✓	✓	✓
BAX0011+DI08K001 (TK)	Single Dose Toxicity incl. TK	Cynomolgus monkey	✓	✓	[d]
33981	Repeated Dose Toxicity	Rat	✓	✓	✓
RD_VB_110704	Repeated Dose Toxicity	VWd pig	✓	✓	-
EWA0015	Repeated Dose Toxicity	Cynomolgus monkey	✓	✓	✓

表 2.4-1. rVWF の単独又はアドベイトとの併用により実施した非臨床試験一覧（続き）

Study Number	Study	Species	rVWF	rVWF+ ADVATE	GLP
506794+179975 (TK)	Repeated Dose Toxicity incl. TK	Cynomolgus monkey	✓	-	[e]
PV2000701	Local Tolerance	Rabbit	✓	✓	✓
BAX22	Genotoxicity	In vitro (Ames)	✓	-	✓
BAX0013	Genotoxicity	In vitro (Chromosome Aberration)	✓	-	✓
BAX24	Genotoxicity	In vivo (Micronucleus, mice)	✓	-	✓
Other Toxicity Studies					
FS-IM00907	Immunogenicity	Balb/c mouse	✓	✓	-
IMM_R&D_017_11	Immunogenicity	E17 haemophilic Balb/c mouse E17 haemophilic C57BL/6J mouse E17 haemophilic human F8 transgenic mouse	✓	✓	-
528575	Repeated Dose Toxicity (feasibility)	Rabbit	✓	-	-
RD_VB_110702	Mechanistic Study	ADAMTS13 knock out mouse C57BL/6J mouse VWd mouse Rat Guinea pig Rabbit Dog Pig Cynomolgus monkey	✓	-	-

a Including administration of rADAMTS13 and rVWF
b Co-administered with rADAMTS13
c BAX0010 (GLP), DI07K001 (Non-GLP)
d BAX0011 (GLP), DI08K001 (Non-GLP)
e 506794 (GLP), 179975 (Non-GLP)
-: Not applicable or non-GLP

臨床試験に先立つ非臨床試験プログラムの最終決定後、リストセチンコファクター活性の測定方法が最新の欧州薬局方（欧州薬局方 5th edition 2007、Suppl 5.8、2007、Human Coagulation Factor VIII 01/2007:0275 – “Add sufficient prediluent to the reconstituted preparations to produce solutions containing

0.5- 2.0 IU/mL.”）の要件を含むように更新された。試料調製の範囲を 0.125～1.0 IU/mL から 0.5～2.0 IU/mL に引き上げ、WHO 血漿参照標準＃02/150 を WHO 濃縮参照標準＃00/514 に置き換えた。本更新により、VWF:RCo 活性の結果は、旧方法を用いて決定された VWF:RCo 値と比較して 1.48 倍増加[1]した（3.2.S.4 Control of Drug Substance）。

効力を裏付ける試験、安全性薬理試験及び毒性試験において、両測定方法を用いて決定された VWF:RCo 活性に基づき算出した投与量の比較を表 2.4-2 に示す。1.48 の係数によりすべての投与量及びその結果としての安全域は同様に増加したため、更新された計算値は安全性評価に影響を及ぼさなかった。本承認申請資料の非臨床部分におけるすべての VWF:RCo 活性データは、旧測定方法に基づき表示する。後期に実施したウサギ反復投与検討試験（528575 試験）、カニクイザル反復投与毒性試験（506794 試験）及び胎盤移行試験（Plac-Lab-12-12 試験）は、測定方法の当該変更による影響を受けなかった。

[1] この値は概算値である。すなわち、変換係数は1.48 ± 0.24（平均値±標準偏差、95%信頼区間：1.35～1.62、3.2.S.4 Control of Drug Substance参照）と確認された。

表 2.4-2. 新旧 VWF:RCo 活性測定法で測定した投与量の比較

Study No (Animal Species Studied)	Dose [IU VWF:RCo/kg (+ IU FVIII/kg)]	
	Old	New
BA0207 (VWd mouse)	400, 600, 800	592, 888, 1184
	400+308, 600+462, 800+615	592+308, 888+462, 1184+615
BA0107 (VWd mouse)	200, 400	296, 592
	200+154, 400+308	296+154, 592+308
BA1207 (VWd mouse)	400+308	592+308
RD_VB_110703 (VWd dog)	100	148
PV2040705 (Spontaneously hypertensive rat)	240	355.2
	240+185	355.2+185
PV1900605 (Guinea pig)	240	355.2
	240+185	355.2+185
PV2010701 (Rabbit)	1262	1867.8
	812.5 + 623.7	1202.5+623.7
34572 (Dog)	240	355.2
	240+185	355.2+185
PV1940601 (ADAMTS13 knock out mouse)	250, 500, 1000, 2000, 4000	370, 740, 1480, 2960, 5920
	250+192, 500+385, 1000+769, 2000+1538, 4000+3077	370 + 192, 740+385, 1480+769, 2960+1538, 5920+3077
PV1990701 (C57BL/6J mouse)	250, 500, 1000, 2000, 4000	370, 740, 1480, 2960, 5920
	250+192, 500+385, 1000+769, 2000+1538, 4000+3077	370+192, 740+385, 1480+769, 2960+1538, 5920+3077
PV1930601 (VWd mouse)	250, 500, 1000, 2000, 4000	370, 740, 1480, 2960, 5920
	250+192, 500+385, 1000+769, 2000+1538, 4000+3077	370+192, 740+385, 1480+769, 2960+1538, 5920+3077
AU0507W01 (ADAMTS13 knock out mouse)	2000	2960
PV1950601 (Rat)	700, 1400	1036, 2072
	700+538, 1400+1077	1036+538, 2072+1077
BAX0011 (Cynomolgus monkey)	100, 300, 600, 1200	148, 444, 888, 1776
	100+77, 600+462	148+77, 888+462
BAX0009 (Rabbit)	100, 300, 600, 1200	148, 444, 888, 1776
	100+77, 600+462	148+77, 888+462
33981 (Rat)	1400	2072
	1400+1080	2072+1080

表 2.4-2. 新旧 VWF:RCo 活性測定法で測定した投与量の比較（続き）

Study No (Animal Species Studied)	Dose [IU VWF:RCo/kg (+ IU FVIII/kg)]	
	Old	New
RD_VB_110704 (VWd pig)	100+77	148+77
EWA0015 (Cynomolgus monkey)	50, 100	74, 148
	100+77	148+77

2. 薬理試験

2.1 効力を裏付ける試験

共同研究により実施された *in vitro* 薬理試験において、血小板のローリング凝集塊形成が、せん断速度 20000 s^{-1} 以上とした rVWF コーティング表面上及び溶液中の超巨大 VWF マルチマーにどのように依存するかを検討した（KRAGH 2014）。rVWF 及び血小板を蛍光標識したことから、動的条件下で顕微鏡観察が可能であった。血小板のローリング凝集塊形成は、超巨大マルチマー不含 rVWF と比較して、超巨大マルチマー含有 rVWF の存在下で明らかに促進された。血小板の捕捉が増加し、これによってより大きな凝集塊が形成されたことから、超巨大マルチマー含有 VWF は超巨大マルチマー不含 VWF よりも「高粘着性」である可能性が示されている。せん断速度の上昇に伴い、より多くの分子間相互作用が VWF-VWF 結合を安定化させることができ、より大きな血小板凝集塊が表面上をローリングしながらこの VWF 網へと組み込まれた。これは、上昇したせん断力に起因した VWF 結合及び血小板凝集の効率の向上によると考えられる。最初に遺伝子組換えヒト ADAMTS13（rADAMTS13）を試料に添加すると、灌流 8～9 分後に VWF 網が完全に消失したことから、rADAMTS13 は超巨大 rVWF マルチマーに対する効果的な制御因子であることが示された。これらの知見に基づき、超巨大マルチマー含有 rVWF は、rVWF-血小板凝集塊の形成に関して有効である。

効力を裏付ける薬力学的作用は、VWd マウス及び VWd イヌを用いた異なる *in vivo* 動物モデルにおいて評価した。

VWd マウスの頸動脈閉塞モデルでは $FeCl_3$ を用いて頸動脈血管壁を損傷し、血栓形成を開始した（BA0107 試験）。異なる投与量の rVWF、並びに被験物質及び対照物質について 2 種類の投与スキームを用い、閉塞及び安定した血栓形成までの時間を評価した。両投与（すなわち、血管壁損傷の前又は後に投与）のいずれにおいても rVWF のアドベイトとの併用投与により、安定した閉塞性血栓が形成され、用量依存的な有効性が示された。対照的に、Haemate P（対照物質）投与動物では、観察期間中（30 分）に安定した血栓は形成されなかった。rVWF 単独投与動物の数匹では安定した血栓形成が認められたが、閉塞時間の中央値は製剤処方緩衝液投与動物と差がなかった。

BA1207 試験では、VWD のマウスモデルにおいて、rVWF、pdVWF 及び多量体の少ない rVWF の有効性を比較し、更に、VWF の有効性に及ぼす rADAMTS13 と rVWF との併用投与の影響を評価し

た。VWd マウスを用いた 2 種類の $FeCl_3$ 誘発性血栓症モデルで、体循環及び微小循環における rVWF 及び pdVWF の止血効力を検討した。体循環（頸動脈）への rVWF とアドベイトとの併用投与（400 IU VWF:RCo/kg + 308 IU FVIII/kg）により、10 匹中 10 匹に安定した閉塞性血栓が形成された。Haemate P（400 IU VWF:RCo/kg + 374 IU FVIII/kg）投与動物に閉塞性血栓は認められなかった。rADAMTS13 2500 U/kg を rVWF＋アドベイトと併用投与した結果、閉塞性血栓が形成された動物数が減少した（6 匹中 2 匹）。微小循環（腸間膜細動脈）への rVWF とアドベイトとの併用投与により、6 匹中 6 匹に血管閉塞が認められた。rADAMTS13 を rVWF＋アドベイトと併用投与した結果、安定した閉塞性血栓は形成されなかった。更に、rADAMTS13 を rVWF＋アドベイトと併用投与した群では、小血栓又は大血栓形成に要する時間が延長した。

いずれのモデルにおいても、多量体の少ない rVWF 投与による結果は、rVWF 投与による結果と pdVWF 投与による結果の中間を示した。以上の結果を総合的に判断すると、rVWF の生体内での有効性は VWF の多量体化の程度による影響を受けることが明らかにされた。更に、ヒト rADAMTS13 は生体内で rVWF を切断することが確認された。その結果、マウスにおいて、rVWF の効力は pdVWF と同程度にまで低下した。

VWd マウスの尾端出血モデルを用いて、失血量及び生存率を評価した（BA0207 試験）。rVWF とアドベイトとの併用により、線形性かつ用量依存性の失血量の減少が認められた。Haemate P 投与動物は、高用量 rVWF＋アドベイト投与群と比較して、統計学的に有意に高い失血量を示した。高用量の rVWF 単独投与マウスと対応する製剤処方緩衝液を投与したマウスとの間には差が認められず、本モデルにおいて、rVWF が内因性 FVIII 濃度の上昇を引き起こすまで、止血を達成するためにアドベイトが必要であることが示唆された。

rVWF とアドベイトとの併用投与は rVWF 単独投与よりも一次止血に関してより有効であったという事実は、ヒト VWF のマウス血小板への親和性が低いことにより説明できる可能性がある。更に、内因性 FVIII は rVWF の投与後に増加するが、内因性 FVIII のピークは通常、より後の時点（VWd マウスの PK 試験で観察されたように最長 3 時間、PV1960607 試験）で出現し、FVIII 濃度が低い場合、血栓形成は不完全かつ不安定である。pdVWF と rVWF の多量体構造の分布の違いにより、rVWF とアドベイトとの初回併用投与が pdVWF よりも有効性が高かったことが部分的に説明される。

薬力学（PD）/PK 試験（RD_VB_110703 試験）において、rVWF を VWd イヌ 1 匹に投与すると循環血中のイヌ FVIII が安定化し、生理食塩液出血時間（耳を切傷し生理食塩液槽に浸してから止血までの時間）が 15 分超から約 1 分に顕著に短縮した。Haemate P は、試験した 2 匹目の VWd イヌで異常に延長した出血時間を短縮させなかった。

2.1.1 効力を裏付ける試験要約

In vitro での効力を裏付ける試験により、超巨大マルチマー含有 rVWF は rVWF-血小板凝集塊の形成に関して有効であり、rADAMTS13 は超巨大 rVWF マルチマーに対する有効な制御因子であることが示された。rVWF とアドベイトとの併用投与は、VWD の異なるマウスモデルにおいて Haemate P よりも有効であった。多量体の少ない rVWF 投与による結果は、rVWF 投与による結果と pdVWF 投

与による結果の中間を示した。以上の結果を総合的に判断すると、rVWF の生体内での有効性は VWF 多量体化の程度による影響を受けることが明らかにされた。更に、ヒト rADAMTS13 は生体内で rVWF を切断することが確認された。VWd イヌでの *in vivo* 試験により、FVIII に対する rVWF の安定化機能が示された。

2.2 安全性薬理試験

rVWF の心血管系機能、呼吸器系機能及び中枢神経系機能、並びに血栓形成性及びアナフィラキシー様反応誘発性に対する影響を、異なる動物モデルを用いた 5 種類の *in vivo* 試験で検討した。

イヌに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与（240 IU VWF:RCo/kg ± 185 IU FVIII/kg）したときの心血管系、呼吸器系及び血液凝固系に対する影響をイヌで評価した（34572 試験）。心血管系機能及び呼吸器系機能に関して被験物質に関連した影響は認められなかった。アナフィラキシー様反応及び過敏症様反応は、イヌで過敏症反応を誘発することが知られている添加物のポリソルベート 80 に起因すると考えられた[8]。rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与後の血小板減少及びこれに伴うボトロセチンアゴニストに反応した血小板凝集低下は一過性であり、rVWF＋アドベイト製剤処方緩衝液投与後には認められなかった。認められた血小板減少及びその結果生じた血小板凝集低下は、被験物質に関連する可能性があり、これは、非 VWd の正常動物で血漿中 VWF 濃度が正常値を超えたことによる影響と考えられた。しかし、一過性であったこと及び関連した有害作用が認められなかったことから、これらの所見の臨床的意義は不確かである。

506794 試験では、カニクイザルに rVWF を 100、300 及び 800 IU VWF:RCo/kg の用量で 1 日 1 回、28 日間静脈内投与した。心電図、血圧及び呼吸数に及ぼす影響を投与 23 日目に評価した。800 IU VWF:RCo/kg 群の動物は 13 日目以降投与されなかったため、本群の結果は得られていない。残りの群（最大 300 IU VWF:RCo/kg）においては、血圧、呼吸数及び心電図に被験物質に関連した影響は認められなかった。

rVWF は、非常に特異的な作用機序を有するバイオテクノロジー由来血液凝固因子であり、中枢神経系に影響を及ぼす可能性のある rVWF の望ましくない薬理学的特性は予測されない。506794 試験（サルにおける 4 週間毒性試験）に基づき、試験期間中いずれの時点でも、中枢神経系への影響を示唆する肉眼的若しくは顕微鏡的所見、又は一般状態変化は認められなかった。症状観察又は行動変化に関して、被験物質に関連した有害な影響は認められなかった。

以上の結果をまとめると、作用機序が明らかであること、被験物質の薬効分類及び非臨床試験で中枢神経系に対する毒性を示唆する機能的徴候がないことに基づき、中枢神経系に特化した安全性薬理試験は実施しなかった。

rVWF を単独で 1262 IU VWF:RCo/kg 又は rVWF とアドベイトとの併用により 812.5 IU VWF:RCo/kg + 623.7 IU FVIII/kg の用量を投与したとき、ウサギうっ滞血栓症モデルにおいて血栓形成性の徴候は認められなかった（PV2010701 試験）。

rVWF の非臨床用 2 ロットを単独で又はアドベイトとの併用により 240 IU VWF:RCo/kg ± 185 IU FVIII/kg の用量で自然発症高血圧（SH）麻酔ラットに過酷条件下（動脈内投与）で急速注入し、血

圧低下作用の可能性を検討した（PV2040705 試験）。rVWF の単独投与により、各ロット、6 匹中 1 匹に陽性反応が認められた。rVWF＋アドベイト又は溶媒対照を投与した動物に陽性反応は認められなかった。被験物質投与群当たり 6 匹中 1 匹に認められた陽性反応は、試験系の変動範囲内にあると考えられた（表 2.4-5）。

rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により 240 IU VWF:RCo/kg ± 185 IU FVIII/kg の用量でモルモットに過酷条件下（動脈内投与）で急速注入し、気管支攣縮性活性の指標である肺膨張圧に及ぼす影響を検討した（PV1900605 試験）。rVWF 単独、アドベイト単独又は製剤処方緩衝液を投与した動物に陽性反応は認められなかった。しかし、rVWF の 1 ロットとアドベイトとを併用投与した 8 匹中 2 匹に気管支攣縮性アナフィラキシー様反応の陽性結果が認められた。rVWF の本ロットを単独投与したとき、陽性反応は認められなかった。rVWF の別ロットとアドベイトとを併用投与したとき、気管支攣縮性アナフィラキシー様反応の陽性結果は認められなかった。2 ロットの評価を併合した結果、rVWF＋アドベイト製剤処方緩衝液を投与したときの結果との有意差は認められなかった。

2.2.1 安全性薬理要約

イヌにおいて心血管系機能及び呼吸器系機能に rVWF に関連した影響は認められなかった。カニクイザルでも血圧、呼吸数及び心電図に rVWF（最大 300 IU VWF:RCo/kg）に関連した影響は認められず、症状観察又は行動変化にも有害な影響は認められなかった。ラット、モルモット及びウサギでの安全性薬理試験から、rVWF を単独で又はアドベイトと併用投与したとき、アナフィラキシー様反応誘発性及び血栓形成性の増加は認められなかった。

モルモット及びラットで観察された陽性反応は、rVWF の有害作用又はロット間変動を示すものではなく、生物系で認められる正常範囲内の変化であることが、他製剤を用いた同様の試験で観察された散発的な陽性反応から示唆される（表 2.4-5）。

安全性薬理試験で認められたすべての変化は、動物モデルでの生物学的変動範囲内にあると考えられるか又は添加物の既知の種特異的作用のために発現したものと考えられる。したがって、rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与により、臨床において低血圧又は気管支攣縮性アナフィラキシー様反応の事象は生じ難いと考えられる。

3. 薬物動態試験

rVWF の PK を VWd マウス（PV1960607 試験）又はラット（PV1910605 試験）を用いて検討し、Haemate P と比較した。マウス及びラットでの試験において、rVWF の AUC は、対照物質 Haemate P の AUC に対して非劣性であるとの仮説を立てた。VWF:Ag 濃度と FVIII 濃度は、別々に測定した。試験の主な注目点は VWF:Ag 濃度を測定することであった。FVIII 濃度については、記述統計を用いて解析した。rVWF の AUC は、Haemate P の AUC に対して統計的に非劣性であることが確認された。

消失曲線の初期相及び終末相に関して、VWd イヌにおける rVWF の半減期は、Haemate P の半減期よりも長かった（RD_VB_110703 試験）。

雄カニクイザル 2 匹に rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内投与し、rVWF の PK 特性を検討した（BAX0010 試験及び DI07K001 試験）。rVWF を 100 IU VWF:RCo/kg の用量で単回投与後、VWF 濃度は 12 時間まで測定可能であった。rVWF の定常状態における分布容積（Vss）で示されるように、体循環から末梢組織への VWF:Ag の分布は限定的と考えられた。rVWF のように分子量が大きな物質では血管外組織への分布は限定的であると予想された。rVWF に由来する VWF:Ag の PK 特性は、アドベイトとの併用により影響を受けなかった。

VWd 動物種はまた、低い内因性 FVIII 濃度を示す。rVWF による FVIII の安定化が以下のように示された。

- VWd マウスに rVWF を静脈内投与すると、内因性 FVIII 濃度が顕著に増加した。この増加は投与後 5 分（最初の評価時点）からみられ、3～12 時間には一定値を示した。この増加は、投与後 20 時間の試験終了まで観察された。
- VWd イヌに rVWF を持続注入すると、注入後 12 時間にベースライン値の 1.6 倍に達する内因性 FVIII の持続的増加がみられた。FVIII 濃度は注入後 48 時間にベースライン値に戻った。

VWd マウスにおいて ^{124}I 標識 rVWF の PK 及び組織内分布を検討した（BAX3/2 / PET5 試験）。血液からの放射能の消失半減期は 3.05～5.19 時間と推定された。脾臓での放射能の増加は、ヒト rVWF に対する免疫反応（例えば貪食反応）に関連する可能性が考えられる。他組織において rVWF の明らかな取り込みはみられなかった。

Ex vivo 灌流実験で rVWF のヒト胎盤通過性を評価した（Plac-Lab-12-12 試験）。rVWF を 2 時間灌流した母体回路の 3 群で全試料に VWF:Ag が検出された。これに対して、胎児回路の全試料には、母体回路の灌流液中 rVWF 濃度及び測定時点にかかわらず、VWF:Ag は検出されなかった。これらの結果から、rVWF はヒト胎盤を通過しないことが示された。

ラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験（4.2 項）期間中に実施されたトキシコキネティクス（TK）解析により、rVWF の反復投与後（14 日目）の VWF への全身曝露量は、単回投与後（1 日目）よりも低いことが示された。同様に、FVIII への全身曝露量の減少が反復投与後の各投与群で観察された。これらの反復投与後の全身曝露量の減少は、異種タンパク質として反復投与された被験物質に対する予想された抗体反応による可能性が考えられる。

3.1 薬物動態要約

VWd マウス、ラット、VWd イヌ及びカニクイザルを用いて、rVWF を単独又はアドベイトと併用投与したときの PK を検討した。

rVWF を単独又はアドベイトと併用投与したときの AUC は、Haemate P の AUC に対して非劣性であるとの仮説を検討し、VWd マウス及び正常ラットにおいて統計学的に確認された。更に、VWd マウス及び VWd イヌにおいて、rVWF は内因性 FVIII を安定化することが示された。*Ex vivo* 灌流試験の結果から、rVWF はヒト胎盤を通過しないことが示された。

4. 毒性試験

4.1 単回投与毒性

rVWF の単独又はアドベイトとの併用による単回投与毒性試験は以下の動物モデルを用いて実施した。

- ADAMTS13 欠損マウス（PV1940601 試験）
- VWd マウス（PV1930601 試験）
- C57BL/6J マウス（PV1990701 試験）
- ラット（PV1950601 試験）
- ウサギ（BAX0009 試験及び PV2140708 試験）
- カニクイザル（BAX0011 試験及び DI08K001 試験）

マウス及びラットに低用量、中用量及び高用量の rVWF をアドベイトとの併用により単回静脈内投与し、rVWF の単独又は Haemate P 投与と比較した。製剤処方緩衝液及び生理食塩液を対照物質として投与した。試験は 2 部構成とし、投与翌日までの急性毒性、並びに 14 日間の観察期間における遅発毒性及び回復性を検討した。全動物の一般状態を 1 日 1 回観察し、体重を週 1 回測定した。臨床病理学的検査（血液検査及び血液生化学的検査）を短期及び長期評価の両時点で実施した。特定の器官を両時点で採取し、病理組織学的検査を最高用量群及び対照群について実施した。その他の用量群の病理組織学的検査は、最高用量群で異常所見が観察された器官について実施した。

試験に用いた 3 系統のマウスで程度の違いはあるものの微小血栓症状が観察され、rVWF の過剰な薬理作用と評価された。マウスの ADAMTS13 は rVWF サブユニットを十分に切断できず、マウスは rVWF の超巨大 VWF マルチマーを減少させない（[11]、RD_VB_110702 試験）。ADAMTS13 欠損マウスは rVWF 投与に対する感受性がより高く、これはおそらく超巨大 VWF マルチマーの切断に必要なマウス ADAMTS13 を完全に欠失しているためである。正常 C57BL/6J マウスの毒性徴候は顕著ではなく、VWd マウスの毒性徴候は最も軽度で死亡例はなく、臨床症状はより軽度であり、病理組織学的所見の重症度はより低かった。

C57BL/6J マウス及び ADAMTS13 欠損マウスにおける rVWF の無毒性量（NOAEL）は 250 IU VWF:RCo/kg（アドベイト 192 IU FVIII/kg）、VWd マウスにおける NOAEL は 500 IU VWF:RCo/kg（アドベイト 385 IU FVIII/kg）であった。ラットではいずれの用量でも毒性又は血栓形成性徴候は認められず、NOAEL は試験した最高用量である 1400 IU VWF:RCo/kg（アドベイト 1077 IU FVIII/kg）であった。

カニクイザル及びウサギに低用量、中用量及び高用量の rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内投与した。これらの用量群は製剤処方緩衝液を投与した対照群と比較した。マウス及びラットにおける評価パラメータに加えて、摂餌量、血液生化学的検査、TK、全器官の病理組織学的

検査（高用量群のみ）及び尿検査（カニクイザルのみ）を実施した。その結果、試験したいずれの用量でも毒性又は血栓形成性徴候は観察されなかった。採血時点での血中濃度による TK 解析により、被験物質の用量増加に伴い曝露量の増加が確認された。両動物種において、rVWF の TK パラメータは雌雄間で概して同様であり、性差がないことが示唆された。

単回投与毒性試験における NOAEL を表 2.4-3 に示す。

表 2.4-3. 単回投与毒性試験における NOAEL

Species	**NOAELs and safety margins to highest clinical dose of 80 IU VWF:RCo/kg + 62 IU FVIII/kg**		
	rVWF alone (IU VWF:RCo/kg)	**rVWF + ADVATE (IU VWF:RCo/kg + IU FVIII/kg)**	**Safety Margin to highest clinical dose of 80 IU VWF:RCo/kg + 62 IU FVIII/kg**
ADAMTS13 knock out mouse	250	250 + 192	3.1
C57BL/6J mouse	250	250 + 192	3.1
VWd mouse	500	500 + 385	6.3
Rat	1400	1400 + 1077	17.5
Rabbit	1200	600 + 462	7.5
Cynomolgus monkey	1200	600 + 462	7.5

4.2 反復投与毒性

rVWF の単独及びアドベイトとの併用による反復投与毒性は、ラット、VWd ブタ（1 匹）及びカニクイザルを用いて検討した。

ラットにおける毒性評価

ラットに rVWF を 1400 IU VWF:RCo/kg の単独で又はアドベイトの 1080 IU FVIII/kg との併用（主要群では雌雄各 10 匹、回復性評価群では雌雄各 6 匹）により 1 日 1 回、14 日間静脈内投与し、rVWF の毒性、TK 及び免疫原性を評価した（33981 試験）。主要群では雌雄各 10 匹を 14 回投与後に剖検し、回復性評価群では残りの動物（雌雄各 6 匹）を更に 15 日間、休薬して維持した。

rVWF を単独又はアドベイトと併用投与したラットにおいて、ヒト VWF 及びヒト FVIII に特異的な抗体が産生された。rVWF を単独で投与したラットでは、rVWF 製剤中に不純物として残存する少量の rFVIII により、FVIII に対する免疫応答が誘起された。抗 VWF 抗体はヒト VWF に対して中和活性を示さなかった。しかし、抗 FVIII 抗体は、rVWF を単独又はアドベイトと併用投与した全群において、FVIII に対して中和活性を示した。

rVWF の単独投与又はアドベイトとの併用投与にかかわらず、rVWF の全身曝露量に性差が認められた。各投与群において雌の全身曝露量（AUC）の方が雄よりも高かったが、この性差は毒性に影響を及ぼさなかった。しかし、投与群にかかわらず FVIII に対する全身曝露量に実質的な性差はないと考えられた。

性別又は投与された被験物質にかかわらず、単回投与時（1 日目）と比較して反復投与時（14 日目）の VWF の全身曝露量（AUC）が減少した。同様に、反復投与時の FVIII の全身曝露量も各群で著明に減少した。反復投与時におけるこれらの全身曝露量の減少は、異種タンパク質として反復投与された被験物質に対する予想された抗体反応による可能性が考えられる。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査所見、尿検査所見、血液凝固系及び血清化学パラメータ、血小板凝集、並びに肉眼的病理像に毒性学的に問題となる変化は認められなかった。15 日間の回復期間後に投与に関連した変化が認められなかったことから、再生性貧血、血小板減少、並びに心臓、肝臓及び脾臓での投与に関連した病理組織学的変化は投与中止により回復すると考えられた。

VWd ブタにおける毒性評価

VWd ブタ 1 匹に rVWF とアドベイトとを併用により 1 日 1 回、4 日間静脈内投与したときの毒性を評価した（RD_VB_110704 試験）。rVWF 及びアドベイト（100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg）の連日投与による毒性は観察されなかったことから、NOAEL は 100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg と推定された。

カニクイザルにおける毒性評価

カニクイザルに rVWF を 50 又は 100 IU VWF:RCo/kg の単独で、若しくは rVWF の 100 IU VWF:RCo/kg とアドベイトの 77 IU FVIII/kg との併用により 14 日間連日静脈内（ボーラス）投与した結果、有害な影響は何ら認められなかった（EWA0015 試験）。溶血、血栓及び血小板減少の徴候は認められず、死亡、一般状態、体重、眼科学的検査所見、心電図、血液学的所見、血液凝固、血小板動態、血液化学所見、トロポニン I 濃度、尿検査所見、肉眼的病理像及び病理組織像に関して、rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与による有害な影響は認められなかった。したがって、本試験において rVWF を単独で又はアドベイト（77 IU FVIII/kg）との併用により投与したときの NOAEL は 100 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

rVWF（単独又はアドベイトとの併用）又は Haemate P を投与した全動物でヒト VWF に特異的な抗体の産生が認められ、14 日間の投与後、抗体反応の log2 力価は全投与群で同様であった。rVWF 単独投与群、アドベイト併用投与群及び Haemate P 投与群のすべてにおいて、ヒト VWF に対する中和抗体が検出された。

Haemate P 投与群及びアドベイト投与群（単独投与群及び rVWF 併用投与群）において、抗ヒト FVIII 抗体の産生が認められた。14 日間の投与後、これらの投与群の log2 抗体価は同様であった。rVWF 単独投与群では、抗ヒト FVIII 抗体の産生は認められなかった。

Haemate P 投与群、rVWF＋アドベイト投与群及びアドベイト投与群において、抗 FVIII 中和抗体が検出された。少数の動物で抗 FVIII 中和抗体が検出され、これは 14 日目に Haemate P 投与群の雌雄各 1 匹及び rVWF＋アドベイト投与群の雄 1 匹で観察された活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）の延長に関連する可能性がある。抗体産生は異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。

14 日間反復投与による毒性評価よりも安全域が確保できるように高用量を設定する必要があると考えられたため、4 週間反復投与毒性試験（506794 試験）を実施した。本試験の目的は、カニクイザルに rVWF を 0（溶媒対照群）、100、300 及び 800 IU VWF:RCo/kg の用量で 28 日間連日静脈内投与したときの毒性を評価し（主要試験群には雌雄各 3 匹の動物を使用）、2 週間の回復期間後に所見の回復性を評価することであった（回復性試験には対照群の雌雄各 2 匹及び高用量群の雌雄各 2 匹を使用）。VWF:Ag 測定法はサルの内因性 VWF と rVWF とを区別しないため、総 VWF（内因性 VWF＋投与した rVWF）に基づき TK を評価した。また、別の TK 試験報告書（179975 試験）では、内因性 VWF 濃度を用いてベースライン値を補正することにより、薬物（rVWF）曝露について特別に評価した。カニクイザルに異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応により、800 IU VWF:RCo/kg/日を投与した雌雄各 3 匹は、予定投与期間中の 13 日目に投与を完全に終了し、この雌雄各 3 匹を 16 日目に屠殺した。

臨床病理学的パラメータの群平均値は、対応する対照群（適用可能な場合）及び投与前値と比較して、800 IU VWF:RCo/kg/日群で 15 日目及び 300 IU VWF:RCo/kg/日群で 4 週目に、以下のような用量依存的な倍数変化が認められた。

- 血小板数減少: 800 及び 300 IU VWF:RCo/kg/日群で、0.5～0.8 倍
- 網状赤血球数増加: 300 及び 800 IU VWF:RCo/kg/日群で、1.2～3.6 倍
- aPTT の軽度延長: 300 及び 800 IU VWF:RCo/kg/日群で、1.1～1.2 倍。各個体の投与前値からの変化は少数の動物で大きかった。
- これらの変化は回復期間中に完全な回復が認められた。
- 800 IU VWF:RCo/kg/日群で平均 C 反応性タンパク値は、対照群と比較して 1.7～3.3 倍高かった（15 日目に測定、投与前値を測定していないため 4 週目の対照群の値と比較した）。
- 800 IU VWF:RCo/kg/日群で平均 BB 及び SC5b-9 値は、対照群と比較して 1.7～2.3 倍高かった（15 日目に測定、投与前値を測定していないため 4 週目の対照群と比較した）。高濃度の血漿補体タンパク質 BB 及び SC5b-9 は、抗体産生により活性化していることに合致する。

体重、眼科学的検査、血圧、呼吸数測定、血液ガス、心電図、臨床化学的検査、尿検査、サイトカイン、器官重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査で、被験物質に関連した影響はみられなかった。

rVWF を投与したすべての動物が 2 週目から回復期間を通して結合抗 VWF 抗体を発現し、大部分の動物が rVWF に対する中和抗体を発現した。

16 日目には、結合抗体が陽性であった動物での投与後 0 時点の濃度（C_0）及び $AUC_{0\text{-}t}$ 値は、抗体反応のない動物（1 日目）での対応する値よりも概して低かった。28 日目には、結合抗体が陽性であった動物での C_0 値は、同投与量で抗体反応のない動物（1 日目）での対応する値よりも概して低かった。反復投与後の rVWF の曝露量（C_0 及び $AUC_{0\text{-}t}$ に基づく）は、VWF に対する抗体産生と一致して大幅に減少した。28 日目には、大部分の動物（7/12）に中和抗体の産生が認められ、これを反映し

てrVWFの曝露量は1日目と比較して顕著に低かった（179975試験）。主要なTKパラメータを表 2.4-4に要約する。

表 2.4-4. 主要なTKパラメータの要約（rVWF、ベースライン値補正）

Dose level (IU/kg)	C_0 (mU/mL)	AUC_{0-t} (mU.h/mL)	AUC_{0-t} /D (mU.h/mL)/(IU/kg)
Day 1	Male (n=3)/Female (n=3)	Male (n=3)/Female (n=3)	Male (n=3)/Female (n=3)
100	2260/1960	12500/11300	125/113
300	5760/4810	46000/33400	153/111
800	17000/13800	181000/143000	226/178
Day 16	Male/Female	Male/Female	Male/Female
100	2350 (n=2)*/1530 (n=1)*	8840 (n=2)*/8910 (n=1)*	88.4 (n=2)*/89.1 (n=1)*
300	4930 (n=1)*/5500 (n=3)	10700 (n=1)*/20800 (n=3)	35.6 (n=1)*/69.4 (n=3)
Day 28	Male/Female	Male/Female	Male/Female
100	1420 (n=2)*/NC	1430 (n=2)*/NC	14.3 (n=2)*/NC
300	NC/4570 (n=3)	NC/13900 (n=3)	NC/46.2 (n=3)

* One or two animals exhibiting ADA positive responses were excluded from descriptive statistics calculations
NC: Not calculated - All three animals exhibiting ADA positive responses were excluded from descriptive statistics calculations

全投与量で、静脈内緩徐ボーラス投与又は持続注入後のいずれにおいても、C_0、C_{max} 又は AUC_{0-t} に性差はみられなかった。

FVIII活性のベースライン値（1.3～1.4 IU FVIII/mL）は、rVWFの反復投与によりわずかに低下した。抗VWF抗体が存在するため、内因性VWFとFVIIIとの結合阻害によって内因性FVIIIが部分的に不安定化/分解した可能性が考えられた。

VWF:RCoのベースライン値は、被験物質の注入後に用量依存的に増加し、その後、低下した。反復投与後にはVWF:RCoの平均値が1日目よりも低く、ヒトrVWFタンパク質に対する抗体産生に起因する可能性が考えられた。

カニクイザルにrVWFを1日1回静脈内反復投与した結果、800 IU VWF:RCo/kg/日で1匹の動物に生命を脅かすアナフィラキシー反応が発現し、2匹にそれよりも軽度のアレルギー反応が認められた。15日目の測定では、これら3匹の動物は結合抗VWF抗体価が> 10であり、中和抗体が最高値であった。総合すると、これらの所見は、高用量を投与した個体におけるアレルギー反応を示唆しており、このような免疫反応は、サルに反復投与した異種タンパク質（この場合、ヒトrVWF）に対する抗体産生による、予想されるものであった。

rVWFの毒性の可能性については、アナフィラキシー反応及びアレルギー反応を除いて、800 IU VWF:RCo/kg/日で2週間、300 IU VWF:RCo/kg/日までは4週間にわたり、忍容性が良好であった。被験物質は血液凝固経路を標的とし、影響は主に抗体産生及び関連する補体、急性期のタンパク質、血液学的指標並びに血液凝固時間の変化にみられた。これらの結果及び本4週間投与試験の観点から、毒性学的エンドポイントに関するNOAELは300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

カニクイザルでの反復投与毒性試験において、800 IU VWF:RCo/kg でのアナフィラキシー反応及びアレルギー反応の発現、全用量での中和抗体の産生、並びに 100 及び 300 IU VWF:RCo/kg を反復投与した大多数の動物での rVWF の曝露量の実質的な減少により、4 週間を超える投与期間の反復投与毒性試験の実施は困難と判断された。

4.3 遺伝毒性

代謝活性化の存在及び非存在下でのネズミチフス菌を用いた *in vitro* 復帰突然変異試験（エームス試験）（BAX22 試験）、ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験（BAX0013 試験）、並びに *in vivo* マウス小核試験（BAX24 試験）において、rVWF の遺伝毒性は観察されなかった。

4.4 がん原性

rVWF は遺伝子組換えタンパク質であり、変異原性及び染色体異常を誘発するとは考えられず、また、その薬理作用に基づきがん原性の可能性も持たない。遺伝毒性試験において rVWF は遺伝毒性を示さないことが確認された。現行の ICH 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）ガイドラインで言及されているとおり、がん原性に対する懸念がない限り、バイオテクノロジー応用医薬品のがん原性試験は必要とされない。したがって、rVWF にがん原性の懸念はないため、がん原性試験は実施していない。

4.5 生殖発生毒性試験

申請者は rVWF の生殖発生毒性のリスクは低いと考える。それゆえ、以下の考察に基づき rVWF の生殖発生毒性に関する非臨床試験は実施していない。

- ラット及びカニクイザルでの反復投与毒性試験において、ヒト VWF 及びヒト FVIII に対する抗体が観察され、ウサギではヒト VWF に対する抗体が認められている。抗体産生は、異種タンパク質を動物に反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。抗体は単回投与後と比較して、反復投与後に全身曝露量を減少させる。
- rVWF はげっ歯類の ADAMTS13 による切断作用に対して感受性が低いため（[11]、RD_VB_110702 試験）、ヒトの状況とは異なる過剰な薬理作用が誘導される可能性がある。
- 分子量が 500 Da を超える薬剤は胎盤通過性が不十分であり、1000 Da を超える薬剤は胎盤通過性が極めて不良であることがよく知られている[10]。rVWF は分子量が 500 kDa から最大 10000 kDa 以上の多量体を形成する大糖タンパク質である。したがって、受胎産物との接触又は DNA を含む細胞内小器官との相互作用があるとしてもごく限られると予想される。ヒトの *ex vivo* 胎盤移行性試験（Plac-Lab-12-12 試験）で、rVWF はヒト胎盤を通過しないことが示されている。
- ヒトの内因性タンパク質と同一の分子構造を有し、患者を正常な生理的状態に戻すことを意図したレベルで投与されるタンパク質補充療法剤は生殖発生毒性に対する懸念が少ないと考えられる[7]。

- 反復投与毒性試験において、雌雄の生殖器官に有害所見は認められなかった。
- 妊娠は血栓形成状態を誘起し、この血液凝固亢進状態の病理学的増強がますます流産及び胎盤介在性合併症に関連している[4]。この血液凝固性亢進状態はまた、正常動物に存在する血液凝固因子に加えて高濃度の血液凝固因子を投与したとき、正確かつ予測性のある生殖発生毒性のリスク評価に影響を及ぼす可能性がある。したがって、rVWF を投与した動物で生殖発生毒性試験を実施することは、臨床における生殖リスクの評価に適切ではないと考えられる。

以上から、生殖発生毒性に関する非臨床試験は実施しなかった。

4.6 幼若動物試験

典型的な成人の VWF 多重体パターンに至るまでの成熟は、健康な出生児では生後 3 週間で達成される[6]。満期出産乳児の血漿中 VWF 濃度は成人よりもわずかに高いが、VWF 濃度は生後 6 カ月で徐々に低下する[1, 5]。生後 1 カ月から 1 年の間で血液凝固第 V、VIII 及び XIII 因子レベルは成人の値に類似する[3]。実際、乳児の血液凝固因子のほとんど（フィブリノーゲンを含む）は 6 カ月齢までに成人の値付近まで達しており、PT 及び aPTT は正常範囲内にある[1]。

乳児においてビタミン K 依存性血液凝固因子レベルは減少するが、全体としてこれらのレベルの違いにより血栓性合併症のリスクは低減すると考えられる[2]。加えて、新生児及び小児の ADAMTS13 活性レベルは成人と同程度であるため、ADAMTS13 の VWF 切断活性は成人に類似している[9]。

以上の知見に基づき、幼若動物を用いた非臨床毒性試験は実施しなかった。成人と小児集団との間で VWF の薬力学、薬物動態及び安全性に関連する違いは予想されない。rVWF 投与に関連する有害事象は、未成熟、若しくは成熟動物の試験で検出できるか又は成人の安全性データから外挿可能である。

4.7 局所刺激性及びその他の試験

ウサギに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内、動脈内又は静脈周囲投与した *in vivo* 試験の結果より、良好な忍容性が認められた（PV2000701 試験）。

Balb/c マウスを用いて rVWF 及び高純度ヒト pdVWF の比較免疫原性試験を実施した結果、異なる被験物質間の免疫原性に顕著な差は認められなかった（FS-IM00907 試験）。rVWF 及び高純度 pdVWF は、いずれも Balb/c マウスにおいてアドベイトの免疫原性に影響を及ぼさなかった。VWF（ヒト rVWF、高純度ヒト pdVWF 又は海外既承認の pdVWF である Wilfactin）とアドベイトとを併用投与したときのアドベイトの免疫原性に及ぼす影響に関する試験を、3 種類の異なる血友病マウスモデル（E17 血友病 Balb/c マウス、E17 血友病 C57BL/6J マウス及び E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウス）を用いて実施した。ヒト rVWF は、これらの試験で用いた 3 種類のいずれの血友病マウスモデルにおいても、アドベイトの免疫原性に悪影響を及ぼさなかった（IMM_R&D_017_11 試験）。

ウサギで生殖発生毒性試験を実施することの実現可能性を評価するため、反復投与検討試験を実施した。その結果、抗体産生、抗体に起因する所見及び曝露量減少のため、反復投与による更なる毒性試験の実施は適切ではないと考えられた（528575 試験）。

異なる動物種の ADAMTS13 に対するヒト rVWF の感受性を *in vitro* 及び *in vivo* で検討した。その結果、異なる動物種の ADAMTS13 に対するヒト rVWF の感受性に顕著な違いがあることが明らかになった。ウサギ及びサルの血漿中 ADAMTS13 は rVWF を切断でき、ブタ及びイヌの血漿中 ADAMTS13 は rVWF の切断程度がそれよりも弱く、一方、ラット、モルモット及びマウスの血漿には rVWF の切断活性は示されなかった（RD_VB_110702 試験）。

4.8 rVWF 製剤に含まれる添加物の安全性評価

rVWF 製剤は、添加物としてクエン酸三ナトリウム二水和物、D-マンニトール、トレハロース二水和物、グリシン及びポリソルベート 80 を含有している。本剤投与時、これらの添加物の静脈内投与における予定臨床 1 日最大投与量は、いずれも本邦での使用前例の範囲内にある。したがって、これらの添加物の臨床使用における安全性は確保されていると考えられる。

4.9 毒性要約

単回投与毒性試験は、ADAMTS13 欠損マウス、C57BL/6J マウス、VWd マウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いて実施した。ラット、ウサギ及びカニクイザルでは毒性徴候はみられなかった。マウスでは微小血栓症状が観察された。マウスの ADAMTS13 は rVWF サブユニットを十分に切断できず、マウスは rVWF の超巨大 VWF マルチマーを減少させない（[11]、RD_VB_110702 試験）。観察された微小血栓症状は rVWF の過剰な薬理作用と解釈される。

げっ歯類（ラット）及び非げっ歯類（カニクイザル）に rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により反復投与し、安全性を評価した。

ラットに rVWF を単独で（1400 IU VWF:RCo/kg/日）又はアドベイトとの併用により（1400 IU VWF:RCo/kg/日＋1080 IU FVIII/kg/日）14 日間連日静脈内投与した結果、過剰な薬理作用に基づく可逆的変化（再生性貧血、血小板減少、並びに心臓、肝臓及び脾臓に投与に関連した病理組織学的変化）が観察された。これらの変化は、げっ歯類の ADAMTS13 によるヒト rVWF の切断が低感受性であることに起因する種特異的な過剰な薬理作用と解釈される（[11]、RD_VB_110702 試験）。一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液凝固系及び血清生化学パラメータ、血小板凝集検査、並びに肉眼的病理検査に毒性学的に問題となる変化は認められなかった。

カニクイザルに rVWF（100 IU VWF:RCo/kg）をアドベイト（77 IU FVIII/kg）との併用により 14 日間連日静脈内（ボーラス）投与したとき、有害な影響は検出されず、良好な忍容性が認められた。rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により反復静脈内投与したとき、溶血、血栓及び血小板減少の徴候は観察されなかった。したがって、本試験における rVWF の最高用量 100 IU VWF:RCo/kg/日は、単独で又はアドベイト（77 IU FVIII/kg）との併用により投与したときの NOAEL と考えられた。

カニクイザルでの 4 週間反復投与毒性試験において、rVWF を 1 日 1 回静脈内投与した結果、800 IU VWF:RCo/kg/日で生命を脅かすアナフィラキシー反応及び比較的軽度のアレルギー反応が認められ、カニクイザルに異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられた。毒性の可能性については、800 IU VWF:RCo/kg/日の 2 週間投与及び 300 IU VWF:RCo/kg/日までの 4 週間投与に

おいて、前記以外のすべての変化に良好な忍容性が認められた。被験物質は血液凝固経路を標的とし、影響は主に抗体産生及び関連する補体、急性期のタンパク質、血液学的指標並びに血液凝固時間の変化にみられた。これらの結果に基づき、NOAEL は 300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

しかしながら、抗薬物抗体が産生されており、結果として、単回投与時と比較して 16 及び 28 日目に薬物の曝露量は顕著に減少した。カニクイザルに rVWF を 800 IU VWF:RCo/kg/日の用量で 1 日 1 回反復投与したことによる抗体産生は、生命を脅かすアナフィラキシー反応及び比較的軽度のアレルギー反応と関連していた。抗体産生は異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。

また、rVWF は遺伝毒性を示さず、ウサギにおける局所刺激性試験で良好な忍容性を示し、マウスを用いた比較免疫原性試験で pdVWF 製剤の免疫原性と顕著な相違はないことが示された。

5. 総括及び結論

rVWF を *in vitro* 試験、並びに安全性及び有効性の動物モデルで評価した。*In vitro* での効力を裏付ける試験により、超巨大マルチマー含有 rVWF は rVWF-血小板凝集塊の形成に関して有効であり、rADAMTS13 は超巨大 rVWF マルチマーに対する有効な制御因子であることが示された。

rVWF の有効性を VWD の動物モデルで検討した。VWd イヌに rVWF を投与後、出血時間の短縮が示された。マウス有効性モデルにおいて、rVWF とアドベイトとの併用投与は、rVWF の単独又は pdVWF のいずれの投与よりも有効であった。rVWF とアドベイトとの併用投与は rVWF 単独投与よりも一次止血に関してより有効であったという事実は、ヒト VWF のマウス血小板への親和性が低いことにより説明できる可能性がある。更に、内因性 FVIII は rVWF の投与後に増加するが、内因性 FVIII のピークは通常、より後の時点（最長 3 時間）で出現し、FVIII 濃度が低い場合、血栓形成は不完全かつ不安定である。rVWF は ADAMTS13 に特異的なタンパク質分解に曝露されておらず、一次止血を有効に仲介することが示唆されている rVWF の超巨大マルチマーから成ることから、VWd マウスを用いた非臨床有効性モデルで pdVWF よりも有効性が高かった。

rVWF と ADAMTS13 との併用投与試験を実施し、VWd マウス有効性モデルでの ADAMTS13 の潜在的役割を更に検討した。本モデルに rADAMTS13（2500 U/kg）を VWF 及びアドベイトと併用投与したとき、安定した閉塞性血栓は認められず、pdVWF に類似した rVWF の有効性が示された。

カニクイザルでの 28 日間反復投与毒性試験において、投与 23 日目に心電図、血圧及び呼吸数に及ぼす影響を検討した。800 IU VWF:RCo/kg 群の動物は 13 日目以降投与されなかったため、本群の結果は得られていない。残りの群（最大 300 IU VWF:RCo/kg）においては、血圧、呼吸数及び心電図に被験物質に関連した影響は認められなかった。

rVWF は、非常に特異的な作用機序を有するバイオテクノロジー由来血液凝固因子であり、中枢神経系に影響を及ぼす可能性のある rVWF の望ましくない薬理学的特性は予想されない。

サルにおける 4 週間毒性試験では、試験のいずれの時点でも中枢神経系への影響を示唆する肉眼的若しくは顕微鏡的所見、又は一般状態変化は認められなかった。症状観察又は行動変化に関して、被験物質に関連した有害な影響は認められなかった。

以上の結果をまとめると、作用機序が明らかであること、被験物質の薬効分類及び非臨床試験で中枢神経系への毒性を示唆する機能的徴候がないことに基づき、中枢神経系に特化した安全性薬理試験は実施しなかった。

モルモット及びラットで認められた気管支攣縮性及び血圧低下反応に一貫性はなく、rVWF のロット間の変動を示すというよりはむしろ、生物系で認められる正常な変動であることが示唆された。rVWF を単独で動脈内投与すると 2 ロットの各ロットでラット 6 匹中 1 匹に陽性血圧低下反応が認められたが、同 2 ロットの rVWF とアドベイトとの併用投与では陽性血圧低下反応は認められなかった。同様に、rVWF をアドベイトと動脈内併用投与すると 2 ロット中 1 ロットでモルモット 8 匹中 2 匹に気管支攣縮性反応が誘発されたが、同ロットの rVWF 単独投与では認められなかった。更に、両動物モデルでの動脈内投与経路は、臨床での投与経路（静脈内投与）を反映しておらず、「過酷条件」下での製剤投与であった。陽性反応は、他の生物学的製剤を用いた同様の試験でも、被験物質投与動物で散発的に認められている。これらの陽性反応は、製剤処方緩衝液のみを投与した動物でも生じている（表 2.4-5）。

rVWF 単独、rVWF＋アドベイト、溶媒対照（rVWF 製剤処方緩衝液、rVWF＋アドベイト製剤処方緩衝液）又は Haemate P をウサギに投与したとき、血栓形成性は認められなかった。

VWd マウス、正常ラット、VWd イヌ及び正常カニクイザルを用いて、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与したときの rVWF の PK を検討した。VWd マウス及び正常ラットにおいて、rVWF を単独又はアドベイトと併用投与したときの AUC は、対照物質 Haemate P の AUC に対して非劣性であるとの仮説を検討し、統計学的に確認された。VWd イヌにおいて、rVWF の消失曲線の初期相及び終末相における半減期は、Haemate P の半減期よりも長かった。*Ex vivo* 灌流試験の結果から、rVWF はヒト胎盤を通過しないことが示された。

ラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験期間中に実施された TK 解析により、反復投与後の VWF の全身曝露量は、単回投与後よりも低いことが示された。同様に、FVIII の全身曝露量の減少が反復投与後の各投与群で観察された。これらの反復投与後の全身曝露量の減少は、異種タンパク質として反復投与された被験物質に対する予想された抗体反応による可能性が考えられる。

ラット、ウサギ及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験では毒性徴候は観察されなかった。しかし、3 種類の異なる系統のマウスを用いた rVWF の試験では過剰な薬理作用が認められた。rVWF 投与に対する所見の重症度には系統特異性が認められ、ADAMTS13 欠損マウスの感受性が最も高く、微小血栓症状がみられた。正常 C57BL/6J マウスの毒性徴候は顕著ではなく、VWd マウスの毒性徴候は最も軽度で死亡例はなく、臨床症状はより軽度であり、病理組織学的所見の重症度はより低かった。活性対照物質として用いた Haemate P を投与したマウスに所見は観察されなかった。

マウスの ADAMTS13 は rVWF サブユニットを十分に切断できず、マウスは rVWF の超巨大 VWF マルチマーを減少させない（[11]、RD_VB_110702 試験）。ヒト rVWF を切断できる ADAMTS13 活性を有するウサギ及びカニクイザルでは、過剰な薬理作用は観察されなかったため、マウスで認められた毒性所見は種特異的であると考えられる。

ラットに rVWF を反復投与すると、軽度の再生性溶血性貧血、血小板減少、炎症性病変（心臓、肝臓、まれに唾液腺）及び髄外造血の増加（脾臓）の可逆的な毒性所見が観察された。これらの毒性所見は、ヒトタンパク質に対するラットに特異的な免疫反応（特に反復投与後）、又はラットの ADAMTS13 に対するヒト rVWF の低感受性に起因する一過性の微小血栓による虚血の結果と考えられた。

カニクイザルに rVWF を 300 IU VWF:RCo/kg までの用量で 1 日 1 回、28 日間反復投与したとき、毒性は認められなかった。800 IU VWF:RCo/kg/日で生命を脅かすアナフィラキシー反応及び比較的軽度のアレルギー反応が認められ、カニクイザルに異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられた。毒性の可能性については、800 IU VWF:RCo/kg/日の 2 週間投与及び 300 IU VWF:RCo/kg/日までの 4 週間投与による、前記以外のすべての変化に良好な忍容性が認められた。

rVWF を投与したすべての動物は VWF に対する結合抗体を産生し、大部分の動物では中和抗体が確認された。抗体産生により 4 週間投与後の曝露量は著しく減少し、薬理関連パラメータは抗体産生による影響を受けた。

1. rVWF の反復投与により、FVIII 活性のベースライン値（1.3～1.4 IU FVIII/mL）は軽度に低下した。抗 VWF 抗体の存在により内因性 VWF と FVIII との結合が阻害され、内因性 FVIII が部分的に不安定化/分解した可能性がある。
2. 被験物質の投与後、VWF:RCo のベースライン値は用量依存的に増加した後減少した。反復投与後には VWF:RCo の平均値が 1 日目よりも低く、これはヒト rVWF タンパク質に対する抗体産生に起因する可能性がある。

ラット及びカニクイザルでの反復投与毒性試験において、生殖器官に及ぼす悪影響は認められなかった。

rVWF を切断酵素である ADAMTS13 と併用投与した後、rVWF の血液凝固促進が抑制されたことから、特に安全性及び有効性のげっ歯類モデルにおいて、rVWF の作用に関する ADAMTS13 の切断活性の重要性が示された。しかし、ウサギ及びカニクイザルはヒト rVWF を切断可能な ADAMTS13 を保持している（RD_VB_110702 試験）。マウスで観察された過剰な薬理作用とは対照的に、ウサギ又はカニクイザルでは、1200 IU VWF:RCo/kg の用量まで悪影響は観察されなかった。このことから、マウスモデルでの毒性は、マウスの ADAMTS13 に対する rVWF の感受性の欠如に関連しており、結果として過剰な薬理作用が発現し、動物種間の違いの重要性が注目される。

GLP 適用下で実施した毒性試験の曝露量データに基づく安全域を、2.6.6.9.6 項に示す。

rVWF は遺伝毒性を示さず、ウサギにおける局所刺激性試験で良好な忍容性を示し、pdVWF 製剤の免疫原性と顕著な相違はないことが示された。

結論として、上記の非臨床試験は、rVWF のヒトにおける有効性及び安全性の裏付けに寄与すると考えられる。

6. 図表

表 2.4-5. 安全性薬理試験系の変動性

Study #	Test system	Product	Lot #	Positive reactions
PV0280101	Spontaneously Hypertensive Rats	NG IGIV (Test Article)	[redacted]	2/6
			[redacted]	0/6
			[redacted]	0/6
		Gammagard S/D	[redacted]	2/6
			[redacted]	1/6
		Formulation Buffer	[redacted]	1/6
PV0310101	Guinea Pig	NG IGIV (Test Article)	[redacted]	0/6
			[redacted]	0/6
			[redacted]	0/6
		Gammagard S/D	[redacted]	1/6
			[redacted]	0/6
		Formulation Buffer	[redacted]	0/6
PV1470405	Guinea Pig	FEIBA NF/VH	[redacted]	1/6
		FEIBA VH	[redacted]	1/6

NG IGIV: new generation intravenous immune globulin, Gammagard S/D: immune globulin intravenous solvent/detergent treated, FEIBA NF/VH: factor eight inhibitor bypassing activity nanofiltered/vapor heated, FEIBA VH: factor eight inhibitor bypassing activity vapor heated
Study reports in this table are not submitted.

参考文献

1. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full-term infant. Blood 1987; 70:165-72.
2. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood 1992; 80:1998-2005.
3. Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. J Thromb Haemost 2013; 11:1850-4.
4. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. Br J Haematol 2012; 157:529-42.
5. Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental hemostasis: pro- and anticoagulant systems during childhood. Semin Thromb Hemost 2003; 29:329-37.
6. Manco-Johnson MJ. Development of hemostasis in the fetus and neonate. Thromb Res 2007; 119 Suppl. 1:S4-5.
7. Martin PL, Breslin W, Rocca M, Wright D, Cavagnaro J. Considerations in assessing the developmental and reproductive toxicity potential of biopharmaceuticals. Birth Defects Res Part B. 2009; 86:176-203.
8. Masini E, Planchenault J, Pezziardi F, Gautier P, Gagnol JP. Histamine-releasing properties of polysorbate 80 *in vitro* and *in vivo*: correlation with its hypotensive action in the dog. Agents Actions 1985; 16:470-7.
9. Schmugge M, Dunn MS, Amankwah KS, Blanchette VS, Freedman J, Rand ML. The activity of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS-13 in newborn infants. J Thromb Haemost 2004; 2:228-33.
10. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. Clin Pharmacokinet. 2004; 43:487-514.
11. Varadi K, Rottensteiner H, Vejda S, Weber A, Muchitsch E-M, Turecek PL, et al. Species-dependent variability of ADAMTS13-mediated proteolysis of human recombinant von Willebrand factor. J Thromb Haemost 2009; 7:1134-42.