

目次

1. 緒言	3
-------------	---

表

表 2.6.1-1. 血漿由来 VWF と遺伝子組換え VWF との相違点.....	4
--	---

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
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巢
FVIII	factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
FIXa	activated factor IX	活性化血液凝固第 IX 因子
FX	factor X	血液凝固第 X 因子
kDa	kilo dalton	キロダルトン
MET	methionine	メチオニン
pdVWF	plasma-derived von Willebrand factor	血漿由来 von Willebrand 因子
rVWF	recombinant human von Willebrand factor	遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子（製剤）
TYR	tyrosine	チロシン
UL-VWF	ultralarge von Willebrand factor	超巨大 von Willebrand 因子
VWD	von Willebrand's disease	von Willebrand 病
VWF	von Willebrand factor	von Willebrand 因子

1. 緒言

Shire (旧称 : Baxalta、Baxter、以下 Shire) は、von Willebrand 病 (VWD) 治療用の遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子 (rVWF) 製剤を開発した。von Willebrand 因子 (VWF) は、血漿及び血小板に存在し、止血において 2 種類の役割を果たす多量体糖タンパク質である。一次止血において、VWF は、血小板表面の特異的受容体及びコラーゲン等の細胞外基質の成分と相互作用することにより、血管損傷部位への血小板の結合を仲介する。VWF はまた、正常な内因系血液凝固に必須である、凝血促進作用のある血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) を運搬し安定化させるタンパク質としても機能する。VWF はタンパク質分解による不活化から FVIII を保護し、FVIII のヘテロ二量体構造を安定化させ、循環血中からの FVIII の早期排泄を抑制する。

VWF は 2813 個のアミノ酸から成る前駆体分子として内皮細胞及び巨核球で合成される。前駆体ポリペプチド、プレプロ VWF は、22 残基のシグナルペプチドを含み、血漿中に見出される 741 残基のプロペプチド及び 2050 残基の成熟 VWF ポリペプチドから成る。VWF は血漿中に分泌されると、約 500 kDa (VWF 二量体) から 10000 kDa を超える範囲の高分子量マルチマーを形成して循環する。ヒト循環血中でのヒト VWF の生体内半減期は約 12~20 時間であり、血漿中濃度は約 10 µg/mL である。

FVIII は、ドメイン構造 A1-A2-B-A3-C1-C2 を有する約 270~330 kDa の一本鎖前駆体として合成される。血漿から精製した FVIII は重鎖 (A1-A2-B) 及び軽鎖 (A3-C1-C2) から成る。軽鎖は 80 kDa であるが、B ドメインのタンパク質分解のため重鎖は 90~220 kDa の範囲にある。FVIII は非常に低濃度 (約 0.1 µg/mL) で血中を循環し、VWF に非共有結合している。止血時、FVIII は VWF から解離し、活性化血液凝固第 IX 因子 (FIXa) による血液凝固第 X 因子 (FX) の活性化の補因子として作用し、カルシウム及びリン脂質又は細胞膜の存在下、活性化速度が上昇する。

VWF に変異を有する又は VWF が欠乏している患者は、VWF シャペロンを欠いているため、健康成人よりも FVIII 濃度が低い。VWF の投与により血漿中の内因性 FVIII 濃度が上昇するが、これは FVIII に対する VWF の安定化効果の結果と考えられる。

Shire は、VWD と診断された患者への補充療法を目的としたヒト rVWF を開発した。VWD の治療に現在利用可能な VWF 製剤は、ヒト血漿を用いて製造されている。VWD 治療のための血漿由来製剤の安全性は、効果的なウイルス不活化工程の組み込み及び特定のウイルスに対する改善された血漿検査の導入により大幅に向上したが、血漿由来製剤は、感染因子の伝染 (ウイルス及び病原体の伝染) に高リスクであると考えられる。更に、血漿由来製剤は rVWF とは異なり、VWF 及び FVIII の両方を含み、これは FVIII 濃度の上昇による血栓塞栓事象の追加リスクを伴う。Shire は、利用可能な治療選択肢を広げることを意図し、医学界及び科学界に rVWF 製剤を提供すること、並びにヒト血漿供給に依存しない VWD 治療を可能とすることを望んでいる。

rVWF は、既承認薬である遺伝子組換えヒト FVIII 製剤アドベイトと同じ細胞株及び細胞培養工程により産生される。rVWF と血漿由来 VWF (pdVWF) との主な相違点を表 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1. 血漿由来 VWF と遺伝子組換え VWF との相違点

血漿由来 VWF	遺伝子組換え VWF
内皮細胞及び巨核球で合成される。	CHO 細胞に発現する。
タンパク質がゴルジ体から後ゴルジコンパートメントへ通過する際に、プロペプチド除去の翻訳後修飾が細胞内で生じる。	プロ VWF が第 2 の遺伝子組換えタンパク質（プロペプチドプロセシング酵素であるフューリン）に曝露することによってプロペプチド除去が <i>in vitro</i> で誘導される。
ADAMTS13（A2 ドメイン内の Tyr ¹⁶⁰⁵ -Met ¹⁶⁰⁶ 結合で VWF サブユニットを切断するマルチドメインメタロプロテアーゼ）に曝露した VWF サブユニットで構成されるため、高分子量マルチマーが少ない。	rVWF は ADAMTS13 に曝露していないため、高分子量マルチマーの全範囲にわたる完全な VWF サブユニットと超巨大 VWF（UL-VWF）マルチマーで構成される。
A-、B-、O-グリカン構造が存在する。	A-、B-、O-グリカン構造が存在しない。

非臨床プログラムでは、VWD を反映する様々な非臨床 *in vitro* 及び *in vivo* モデルにおいて、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により評価した。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として用いた。

rVWF 製剤（本剤）の予定される効能・効果は、VWD 患者における出血傾向の抑制である。

本剤を添付の溶解液 10 mL で溶解し、4 mL/分を超えない速度で緩徐に静脈内に注射する。

通常、18 歳以上の患者には、体重 1 kg 当たり 40～80 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。

目次

1. まとめ.....	5
1.1 効力を裏付ける試験.....	5
1.2 安全性薬理試験.....	5
2. 効力を裏付ける試験.....	7
2.1 <i>In vitro</i> 薬理試験.....	7
2.1.1 血小板との相互作用により促進され、ADAMTS13により制御される高ずり応力依存性 VWF 自己集合 (KRAGH 2014)	7
2.2 <i>In vivo</i> 薬理試験.....	7
2.2.1 動脈血栓症モデル (FeCl ₃ 誘発性頸動脈閉塞モデル) における rVWF の有効性 : rVWF 非臨床用 1 ロットの単独及びアドベイトとの併用投与の評価 (BA0107 試験)	7
2.2.2 rVWF の有効性に及ぼすヒト rADAMTS13 の影響 (BA1207 試験)	9
2.2.3 VWF 欠損マウスの尾端出血モデルにおける rVWF の有効性 : rVWF 非臨床用 1 ロットの単独投与及びアドベイトとの併用投与の評価 (BA0207 試験)	11
2.2.4 VWF 欠損イヌにおけるヒト rVWF と pdVWF との比較試験 (RD_VB_110703 試験) ...	13
3. 副次的薬理試験.....	14
4. 安全性薬理試験.....	14
4.1 心血管系及び呼吸器系.....	14
4.1.1 rVWF : 麻酔イヌにおける単回投与による心血管系及び呼吸器系安全性薬理試験 (34572 試験)	14
4.1.2 カニクイザルにおける rVWF の 4 週間静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (506794 試験)	16
4.2 中枢神経系.....	17
4.2.1 カニクイザルにおける rVWF の 4 週間静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (506794 試験)	17
4.3 血栓形成性.....	17
4.3.1 ウサギうっ滞血栓症モデルを用いた rVWF の単独投与及びアドベイトとの併用投与による血栓形成性の検討 (PV2010701 試験)	17
4.4 アナフィラキシー様反応誘発性.....	18
4.4.1 rVWF のアナフィラキシー様反応誘発性試験 : 自然発症高血圧ラットにおける血圧低下作用 : 非臨床用ロットの単独投与及びアドベイトとの併用投与の評価 (PV2040705 試験)	18
4.4.2 モルモットにおける rVWF の単独投与及びアドベイトとの併用投与による気管支攣縮性アナフィラキシー様反応誘発性試験 (PV1900605 試験)	19
5. 薬力学的薬物相互作用.....	19
6. 考察及び結論.....	19
7. 図表.....	22

2.6.2 薬理試験の概要文

参考文献.....	24
-----------	----

表

表 2.6.2-1. 血栓形成スコア	18
表 2.6.2-2. 陽性反応のまとめ（PV2040705 試験/ラット、PV1900605 試験/モルモット）	22
表 2.6.2-3. 安全性薬理試験系の変動性	23

図

図 2.6.2-1. 完全閉塞時間	8
図 2.6.2-2. 体循環における作用	10
図 2.6.2-3. 微小循環における作用	11
図 2.6.2-4. rVWF + rFVIII（アドベイト）群の総失血量に関する対照群との比較.....	12
図 2.6.2-5. rVWF 又は Haemate P 投与後の VWd イヌにおける出血時間	13

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
BW	body weight	体重
DDAVP	1-desamino-8-D-arginine vasopressin, desmopressin acetate, a synthetic analogue of the natural pituitary hormone 8-arginine vasopressin	デスモプレシン酢酸塩、天然の下垂体ホルモン 8-アルギニンバソプレシンの合成類似体
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
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
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
rADAMTS13	recombinant ADAMTS13	遺伝子組換えヒト 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）
SAS	statistical analysis system	統計解析ソフトウェア
SH	spontaneously hypertensive	自然発症高血圧
U	unit	単位

2.6.2 薬理試験の概要文

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）
VWd	von Willebrand factor deficient	von Willebrand 因子欠損
VWF	von Willebrand factor	von Willebrand 因子
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）

1. まとめ

1.1 効力を裏付ける試験

遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子 (rVWF) 製剤の薬力学は、単独又は既承認である遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子 (rFVIII) 製剤 (アドベイト) との併用投与により、von Willebrand 因子欠損 (VWd) マウス及び VWd イヌを用いた異なる有効性評価モデルで以下のように評価した。

***In vitro* 薬理試験 (KRA GH 2014)**

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が検討された。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。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。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。

動脈血栓症モデル (BA0107 試験、BA1207 試験)

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。閉塞及び安定した血栓形成までの時間を評価した。rVWF とアドベイトとの併用投与により、用量依存性の有効性が認められた。VWd マウスの 2 種類の FeCl_3 誘発性血栓症モデルを用いて、体循環及び微小循環において、rVWF と rADAMTS13 との併用投与による効力を血漿由来 VWF (pdVWF) と比較した。これらの結果から、ヒト rADAMTS13 が生体内で rVWF を切断し、pdVWF に類似した rVWF の有効性がもたらされることが示唆された。

尾端出血モデル (BA0207 試験)

VWd マウスの尾端出血モデルにおいて、失血量及び生存率を評価した。rVWF とアドベイトとの併用投与により、線形性かつ用量依存性の失血量の減少が示された。

VWF 欠損イヌにおける出血時間 (RD_VB_110703 試験)

rVWF の単独投与は、循環血中のイヌ血液凝固第 VIII 因子 (FVIII) を安定化し、生理食塩液出血時間を有意に短縮した。

1.2 安全性薬理試験

rVWF を単独及びアドベイトと併用投与したときの心機能、呼吸機能及び血液凝固系活性パラメータ、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 4 種類の *in vivo* 試験で検討した。更に、rVWF の心血管系、呼吸器系及び中枢神経系への影響をカニクイザルでの 4 週間反復投与毒性試験において評価した。

イヌにおける心血管系及び呼吸器系への影響（34572 試験）

イヌに 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たときの生命維持機能に及ぼす影響を評価した。心血管系、呼吸器系及び血液凝固系に対する作用を評価した。心血管機能及び呼吸機能に被験物質に関連した影響は認められなかった。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、非 Vwf 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。

カニクイザルにおける心血管系及び呼吸器系への影響（506794 試験）

カニクイザルでの 4 週間反復投与毒性試験においては、rVWF の 100、300 及び 800 IU von Willebrand 因子リストセチンコファクター活性 (VWF:RCo) /kg 用量を 1 日 1 回静脈内投与した。心電図、血圧及び呼吸数に対する影響を投与 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。

ウサギうつ滞血栓症モデルにおける血栓形成性（PV2010701 試験）

rVWF の単独及びアドベイトとの併用投与時の血栓形成性の可能性を、Wessler ら[8]により開発されたウサギうつ滞血栓症モデルで評価した。血栓形成性の徴候は認められなかった。

自然発症高血圧ラットにおけるアナフィラキシー様反応誘発性（PV2040705 試験）

麻酔下の自然発症高血圧 (SH) ラットに過酷条件下（動脈内投与）で rVWF を急速注入し、血圧低下作用の可能性を検討した。rVWF の単独投与により、各ロット群の 6 匹中 1 匹の動物に陽性反応（投与から 10 分以内に 1 分以上持続する平均動脈圧の 30%以上の低下と定義）が認められた。rVWF とアドベイトとの併用投与又は溶媒対照投与後に血圧低下作用は認められなかった。

モルモットにおけるアナフィラキシー様反応誘発性（PV1900605 試験）

モルモットを用いて、気管支攣縮性アナフィラキシー様反応誘発性の指標である肺膨張圧に対する rVWF 動脈内急速注入の影響を過酷条件下（動脈内投与）で検討した。rVWF とアドベイトとの併用投与により、16 匹（2 ロット）中 2 匹の動物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 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では、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. 効力を裏付ける試験

2.1 *In vitro* 薬理試験

2.1.1 血小板との相互作用により促進され、ADAMTS13 により制御される高ずり応力依存性 VWF 自己集合 (KRAGH 2014)

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。灌流試験では健康成人の血球浮遊液を用いた。

超巨大 VWF マルチマー含有 rVWF 及び超巨大マルチマー不含 rVWF を用いて検討した。視覚化のため、試験はあらかじめ蛍光標識した rVWF を用いて実施した。灌流環境下での VWF 切断酵素の効果を明らかにするため、rADAMTS13 溶液 (最終濃度 1 U/mL) を灌流血球浮遊液に添加した。超巨大マルチマー含有 rVWF、超巨大マルチマー不含 rVWF (コーティング濃度: 1 U VWF:Ag/mL Hepes/Tyrode 緩衝液) 又は線維性 I 型コラーゲン (コーティング濃度: $100\text{ }\mu\text{g}$ コラーゲン線維/mL 緩衝液) を基質として平行平板型層流装置内に組み立てられたガラスカバースリップ上にコーティングした。

送液ポンプ (ペリスタリックポンプ) を用いて人工血液循環を確立し、チャンバーを所定の流速 (10000 s^{-1} から 50000 s^{-1} までの範囲の壁せん断速度) で灌流した (条件当たり $n=3$)。血小板及び凝集塊を明視野で観察し、標識 rVWF マルチマー及び rVWF 網を落射蛍光顕微鏡で観察した。

rVWF の視覚化により、血小板と VWF とが複合体を形成するだけでなく、VWF 自体が完全に可逆的な自己集合能力があることが示された。コラーゲン表面上では血小板-VWF 複合体はローリングしなかったが、VWF 網がコラーゲン線維に不可逆的に結合すると、血流の血小板を捕捉し固定化した。せん断速度を 20000 s^{-1} の閾値未満に低下させても、これらの固定化は解除されなかった。超巨大マルチマー含有 rVWF は超巨大マルチマー不含 rVWF と比較して非常に有効であった。最初に 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。

2.2 *In vivo* 薬理試験

2.2.1 動脈血栓症モデル (FeCl_3 誘発性頸動脈閉塞モデル) における rVWF の有効性: rVWF 非臨床用 1 ロットの単独及びアドベイトとの併用投与の評価 (BA0107 試験)

rVWF 1 ロットの単独又はアドベイトとの併用投与による有効性を、VWd マウス 10 匹 (雌雄各 5 匹) /群を用いた無作為化試験で評価した。pdVWF 及び血漿由来 FVIII (pdFVIII) を含有する製剤である Haemate P を陽性対照とした。頸動脈閉塞モデルでは FeCl_3 を用いて頸動脈の血管壁を損傷し、血栓形成を開始した[3]。具体的には、左頸動脈を慎重に露出し、 $15\%\text{FeCl}_3$ 溶液を浸透させたる紙を外膜上に 3 分間置くことにより血管内皮を損傷した。流量計と接続した超音波血流プローブ及びコンピューターによるデータ収集プログラムを用いて、損傷前後の頸動脈血流量をモニターし

2.6.2 薬理試験の概要文

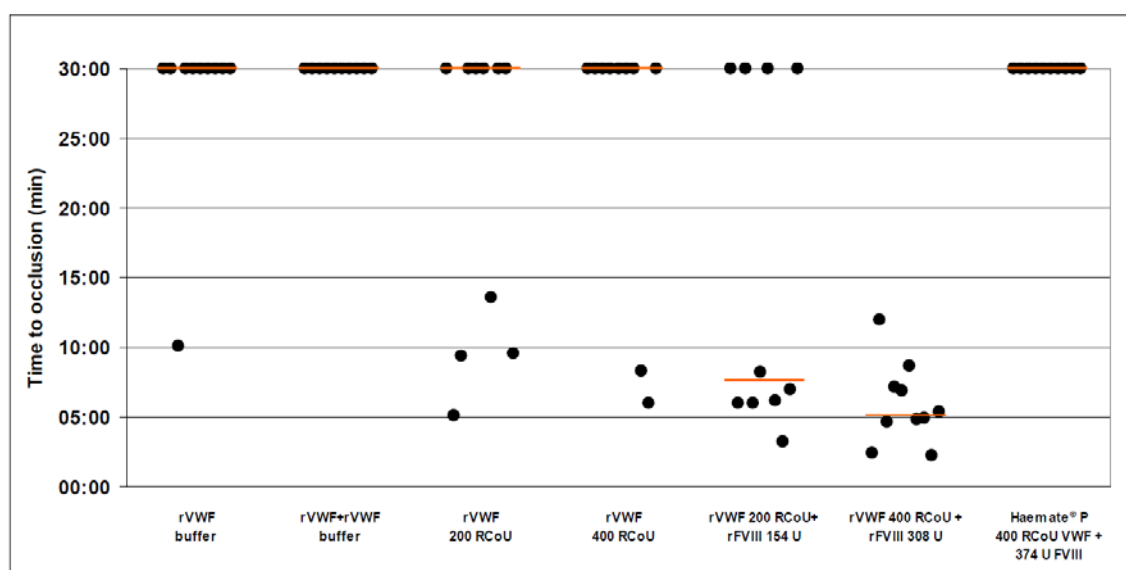
た。ろ紙を除去後 30 分間の平均流量を測定した。閉塞及び安定した血栓形成までの時間を評価した。有効性は、血管損傷部位に 30 分以内に閉塞性かつ安定した血栓が形成されることと定義した。複数の用量で rVWF を単独（低用量：200 IU VWF:RCo/kg、高用量：400 IU VWF:RCo/kg）及びアドベイトと併用（低用量：200 IU VWF:RCo/kg + 154 IU FVIII/kg、高用量：400 IU VWF:RCo/kg + 308 IU FVIII/kg）投与した。被験物質及び対照物質について異なる投与スキーム（すなわち、血管壁損傷の前又は後に投与）を検討した。結果についてフィッシャーの両側正確率検定（有意水準 5%）を用いて比較した。

結果を図 2.6.2-1 に示す。血管壁損傷の 15 分前に静脈内投与したとき、完全閉塞時間の中央値は、rVWF+アドベイトの製剤処方緩衝液（陰性対照）群では 30 分超、低用量 rVWF+アドベイト群では 7.63 分、高用量 rVWF+アドベイト群では 5.13 分であった。rVWF+アドベイト群と製剤処方緩衝液群の閉塞時間に有意差が認められた（ $P < 0.0001$ 、高用量 rVWF+アドベイト群と製剤処方緩衝液群との比較）。rVWF+アドベイトの高用量群と低用量群との間に線形性の用量反応関係が認められた（ $P < 0.0001$ 、rVWF+アドベイトの増量に伴い、完全閉塞時間が有意に短縮）。

rVWF 製剤処方緩衝液（陰性対照）群、低用量 rVWF 群及び高用量 rVWF 群の閉塞時間中央値は 30 分超であった。rVWF 単独投与群と rVWF 製剤処方緩衝液群の閉塞時間との間に有意差は認められなかった（いずれの投与群でも、閉塞時間の中央値は 30 分超であった。 $P = 1.0000$ 、高用量 rVWF 群と rVWF 製剤処方緩衝液群との比較）。

Haemate P 投与動物でも、閉塞時間の中央値は 30 分超であった。この結果は、試験計画書に規定した有効性基準に適合せず、rVWF+アドベイト投与群と比較して有意に延長していた（ $P < 0.0001$ 、高用量 rVWF+アドベイト群と Haemate P 群との比較）。

図 2.6.2-1. 完全閉塞時間



Data source: Study BA0107

2.6.2 薬理試験の概要文

Results are grouped by item and dose; each point represents time to occlusion of one animal. The median is indicated by the colored line.

血管壁損傷から 10 分後に静脈内投与したとき、完全閉塞時間の中央値は、高用量 rVWF+アドベイト群では 2.5 分及び rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液群では 30 分超であり、両群間に統計学的な有意差が認められた ($P < 0.0001$)。

以上をまとめると、VWd マウスの頸動脈閉塞モデルを用いた検討の結果、rVWF とアドベイトとの併用投与により、用量依存性の有効性が示された。両投与（すなわち、血管壁損傷の前又は後に投与）のいずれでも、安定した閉塞性血栓が形成された。これに対して、Haemate P 投与動物では、観察期間中に安定した血栓は形成されなかった。rVWF 単独投与動物の一部では安定した血栓の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群と差がなかった。

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 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 マウスの薬物動態 (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説明される。

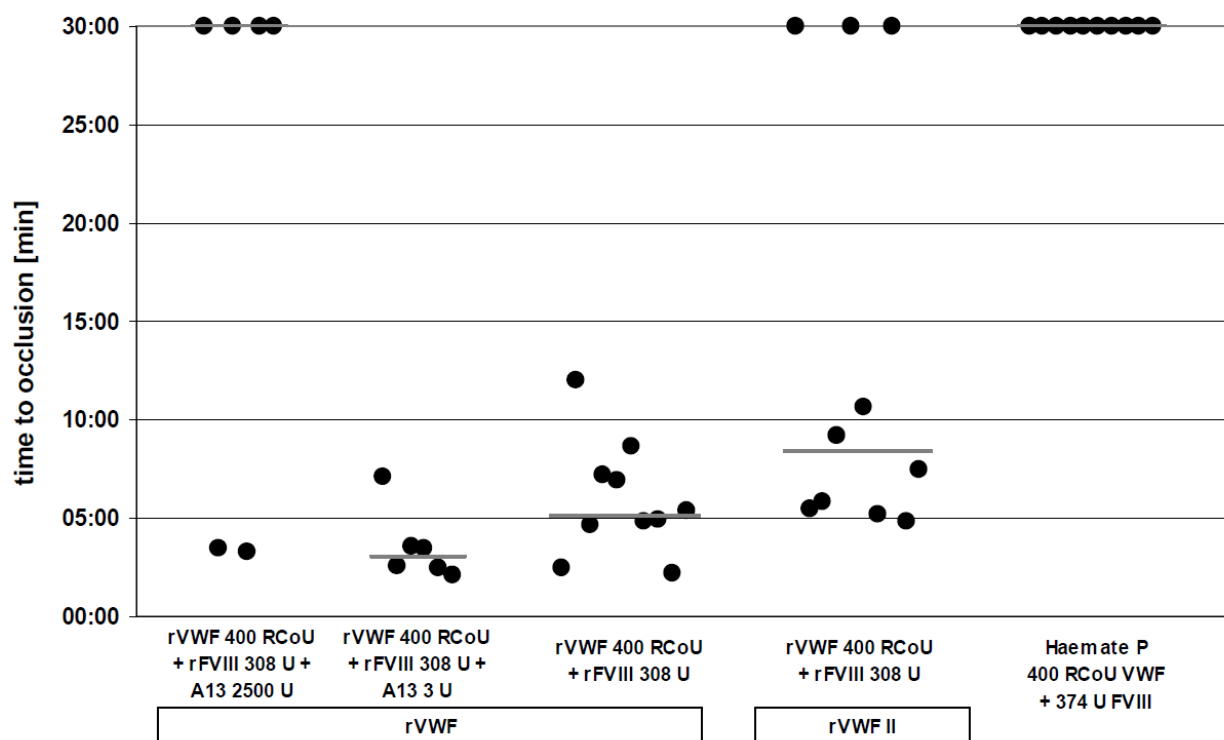
2.2.2 rVWF の有効性に及ぼすヒト rADAMTS13 の影響 (BA1207 試験)

rVWF は製造過程で ADAMTS13 と接触しない。その結果、rVWF は超巨大 VWF マルチマーを含有する。本試験の目的は、VWd マウスモデルにおいて、VWF の有効性に及ぼす rVWF と rADAMTS13 との併用投与の影響を評価することであった。

VWd マウス (6~10 匹/群：雄 3~5 匹、雌 3~5 匹) 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。VWF の多量体パターンの血液凝固系に及ぼす影響を *in vivo* で更に検討するため、異なる多量体構造を有する 2 種類の rVWF (rVWF 及び rVWF II) を用いた。被験物質及び対照物質は、血管壁損傷前 15 分 (体循環) 又は 5 分 (微小循環) に静脈内投与した。

体循環での結果を図 2.6.2-2 に示す。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。一方、rVWF II (多量体の少ない rVWF) では、10 匹中 7 匹 (閉塞時間の中央値 8 分 20 秒) に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 (400 IU VWF:RCo/kg + 308 IU FVIII/kg) 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)。

図 2.6.2-2. 体循環における作用

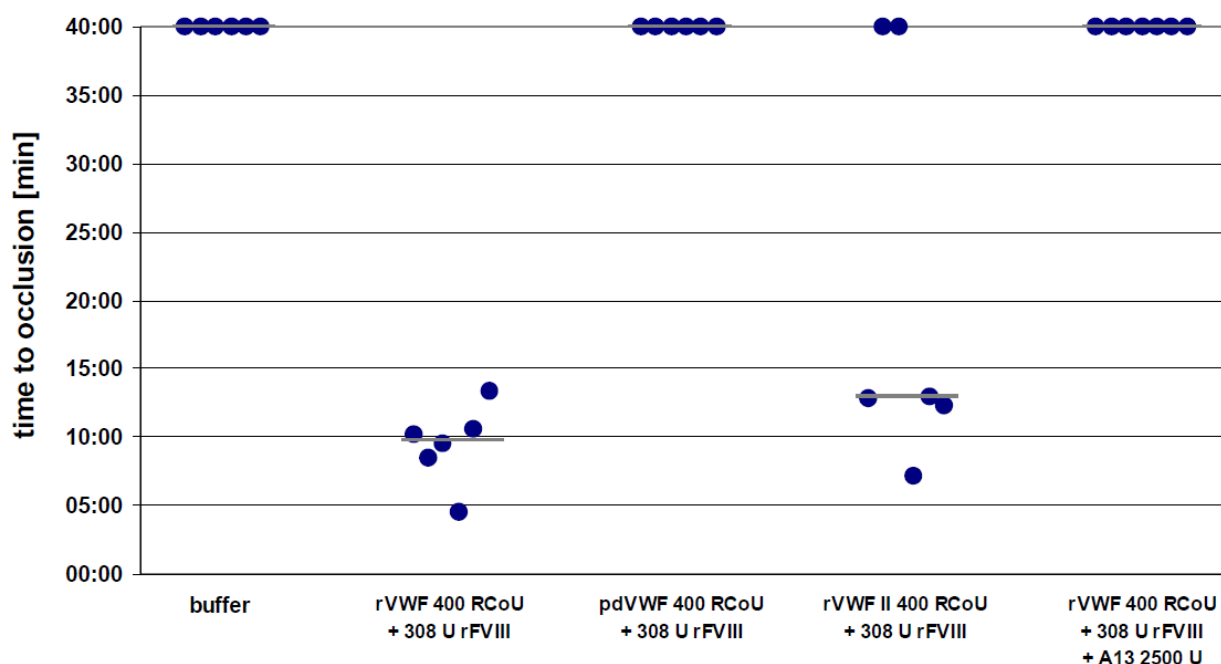


Data source: Study BA1207

Results are grouped by item and dose. Each point represents time to occlusion of one animal; the median is indicated by the grey line.

微小循環での結果を図 2.6.2-3 に示す。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場合、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の中央値が延長した。rVWF+アドベイト投与動物における小血栓及び大血栓形成時間の中央値は、それぞれ 4 分 35 秒及び 5 分 47 秒であった。対照的に、rVWF+アドベイト+rADAMTS13 投与動物における小血栓及び大血栓形成時間の中央値は、それぞれ 11 分 20 秒及び 40 分であった。pdVWF 投与では安定した閉塞性血栓は形成されなかった。

図 2.6.2-3. 微小循環における作用



Results are grouped by item and dose; each point represents time to occlusion of one animal; the median is indicated by the grey line.

いずれのモデルにおいても、多量体の少ない rVWF (rVWF II) 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、また、超巨大 VWF は Vwd マウスに対して高い有効性を示す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。

2.2.3 VWF 欠損マウスの尾端出血モデルにおける rVWF の有効性：rVWF 非臨床用 1 ロットの単独投与及びアドベイトとの併用投与の評価（BA0207 試験）

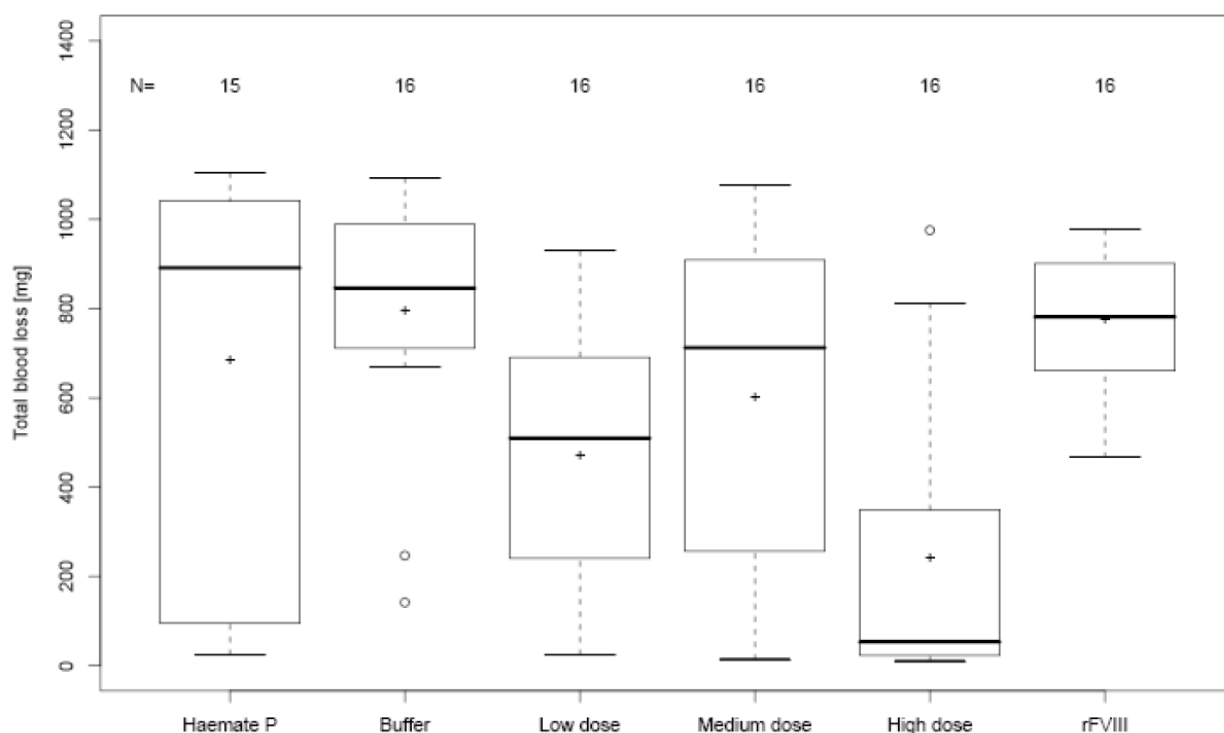
本試験の目的は、rVWF 1 ロットの単独又はアドベイトとの併用投与による有効性を評価することであった。Haemate P (pdVWF + pdFVIII) を陽性対照として用いた。

VWd マウスの尾端出血モデル（雄雌各 8 匹/群）を用いて、失血量及び生存率を評価した。被験物質を異なる 3 用量（400、600 及び 800 IU VWF:RCO/kg）で単独又はアドベイト（308、462 及び 615 IU FVIII/kg）と併用投与し、用量反応曲線を得た。陽性対照物質は、800 IU VWF:RCO/kg + 748 IU FVIII/kg の用量で試験した。被験物質及び対照物質は、尾切傷の 5 分前に静脈内投与した。切傷部位を生理食塩液（37℃）中に静置し、60 分間の観察期間にわたり血液を回収した。血液量は重量により測定した。

2.6.2 薬理試験の概要文

rVWF+アドベイト併用投与による総失血量の結果を図 2.6.2-4 に示す。尾端出血モデルにおいて、rVWF+アドベイトを併用投与した VWd マウスでは線形性かつ用量依存性の失血量の減少が認められた（多重性を補正した両側検定による P 値は、用量依存性の線形傾向に関して $P = 0.0003$ 、高用量群と中用量群の結果に関して $P = 0.0263$ 、全用量群の結果に関して $P = 0.0010$ であった）。高用量 rVWF+アドベイト投与動物の平均失血量（239 mg）は rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液（溶媒対照）投与動物（792 mg）と比較して明らかに低かった。24 時間の観察期間中、高用量 rVWF+アドベイト投与動物では 16 匹中 1 匹のみが失血により死亡した。これに対して、製剤処方緩衝液投与群では 16 匹中 9 匹が死亡した。Haemate P 投与動物の平均失血量は 682 mg であり、高用量 rVWF+アドベイト投与群（239 mg）と比較して有意に高かった（差の 95%信頼区間：101–705）。高用量 rVWF を単独投与したマウスとその製剤処方緩衝液を投与したマウスとの間では失血量に差は認められなかった。

図 2.6.2-4. rVWF + rFVIII（アドベイト）群の総失血量に関する対照群との比較



Data source: Study BA0207

以上の結果をまとめると、本マウスモデルでは、rVWF 単独投与又は Haemate P 投与と比較して、rVWF とアドベイトとの併用投与は総失血量を減少させ、有効性が高かった。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（VWd マウスの PK 試

2.6.2 薬理試験の概要文

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。

2.2.4 VWF 欠損イヌにおけるヒト rVWF と pdVWF との比較試験 (RD_VB_110703 試験)

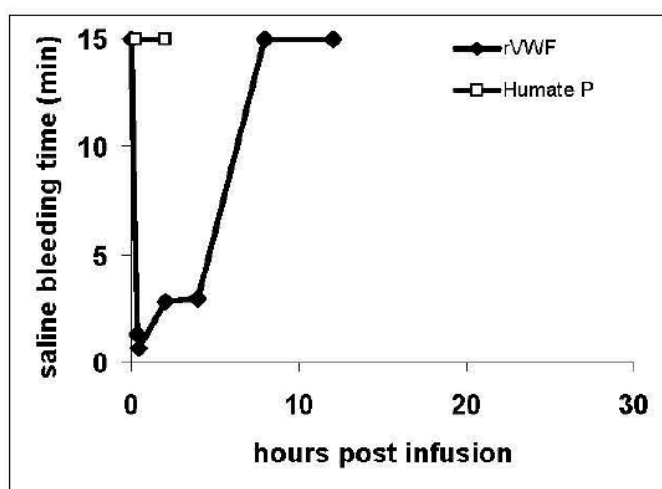
VWd イヌを用いて、rVWF 及び Haemate P を評価した。VWd イヌの VWF 濃度は定量下限未満であり、VWF 欠損の結果として FVIII 濃度が正常よりも低い。

VWd イヌ 2 匹に、rVWF 単独又は Haemate P をそれぞれ 100 IU VWF:RCo/kg の用量で持続注入した。

本試験の PK 結果は 2.6.4.3.1.3 項に記載する。

rVWF の持続注入後 4 時間で、VWd イヌの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）の異常な延長が正常化した。Haemate P 投与では出血時間は改善されなかった (図 2.6.2-5)。

図 2.6.2-5. rVWF 又は Haemate P 投与後の VWd イヌにおける出血時間



Data source : Study RD_VB_110703

両被験物質の持続注入前及び注入 24 時間後の両方で、血液生化学検査の結果はいずれも正常イヌの範囲内であった。rVWF 又は Haemate P の持続注入後、血圧及び心拍数に投与に関連した変化は認められなかった。血小板数は常に正常範囲内であったが、rVWF の持続注入から 15 分以内に 35% の減少が認められ、その後投与前のレベルに回復した。rVWF 又は Haemate P の投与から 28 日後に、低力価の抗 FVIII 中和抗体（定量下限をわずかに超える値）が認められた（rVWF に微量の rFVIII が含有されていることに起因すると考えられる）。同時に、VWF:RCo 活性及び VWF:コラー

2.6.2 薬理試験の概要文

ゲン結合活性に対する抗 VWF 中和抗体が著明に発現した。ヒト VWF 及びアドベイトはいずれもイヌの免疫系にとって異種タンパク質であるため、抗体産生は予測された。

rVWF と Haemate P の VWF 構造は異なる。rVWF は血漿中 ADAMTS13 に曝露されていないため、アガロース電気泳動において Haemate P で検出される VWF 近辺のバンドは出現しない。各被験物質を VWd イヌに投与したとき、VWF マルチマーは循環血中から徐々に消失した。しかし、VWF マルチマーのパターンは変化せず、rVWF では近辺のバンドが出現しなかった。この一因として、イヌ ADAMTS13 によるタンパク質分解に対してヒト VWF が相対的に抵抗性を示すことが考えられる (RD_VB_110702 試験)。

以上の結果をまとめると、rVWF は循環血中のイヌ FVIII を安定化させ、生理食塩液出血時間を 15 分超から約 1 分に顕著に短縮させた。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しなかった。

3. 副次的薬理試験

副次的薬理に特化した試験は実施していない。副次的薬理作用はすべて、安全性薬理試験及び毒性試験で検討している。

4. 安全性薬理試験

4.1 心血管系及び呼吸器系

4.1.1 rVWF：麻酔イヌにおける単回投与による心血管系及び呼吸器系安全性薬理試験 (34572 試験)

本試験の目的は、麻酔イヌに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により単回静脈内投与し、心血管系機能及び呼吸器系機能に及ぼす有害な影響を評価することであった。

イヌ 20 匹を、生理食塩液、rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液、rVWF (240 IU VWF:RCo/kg)、rVWF+アドベイト (240 IU VWF:RCo/kg + 185 IU FVIII/kg) 及び Haemate P (240 IU VWF:RCo/kg + 200 IU FVIII/kg) の 5 群 (雌雄各 2 匹/群) に無作為に割り付けた。機器装着後、動物を安定化させ、ベースラインの心血管系、呼吸器系及び臨床病理学的パラメータを測定した。

被験物質又は対照物質を静脈内投与し、投与直後、並びに投与開始から約 15、30、60 及び 120 分後に測定した。最終の試料採取後、イヌをペントバルビタールナトリウムで麻酔し、放血死させた。剖検では、体外表面、胸腔、腹腔及び胸腹部内容物を検査した。肺及び腎臓の組織標本を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋切片をヘマトキシリン・エオシン染色後、病理組織学的に評価した。

本試験では以下のパラメータを評価した：心血管系パラメータ [心拍出量及び心電図 (心拍数、RR、PR、QRS、QT 及び QTc 間隔)、動脈圧 (平均、収縮期及び拡張期)、肺動脈圧 (平均、収縮期及び拡張期)、並びに平均中心静脈圧]、呼吸器系パラメータ (呼吸数、1 回換気量及び分時拍出量)、臨床病理 (白血球数、白血球百分率及び血小板数)、並びに血液凝固系パラメータ (フィ

2.6.2 薬理試験の概要文

ブリノーゲン、PT、aPTT、フィブリノーゲン分解産物、ボトロセチンアゴニストに対する血小板凝集反応及びD-ダイマー)。

本試験で評価した心電図はいずれも、イヌで質的及び量的に正常と判断された。rVWF 投与動物の2匹、rVWF+アドベイト投与動物の1匹及びrVWF+アドベイト製剤処方緩衝液投与動物の2匹に、心血管系の変化(心拍出量の増加及び全身血管抵抗算出値の低下)が認められた。rVWFの単独及びアドベイトとの併用投与の心血管系及び呼吸器系への作用は一過性で、rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液と同様であった。両剤に共通する添加物のポリソルベート80(Tween 80)は、本試験で使用した濃度と同程度の濃度でイヌに同様のアナフィラキシー様反応を引き起こすことが公表文献で詳細に報告されており、これはおそらく炎症性メディエーター(ヒスタミン等)の放出によると考えられている[6,7]。rVWF 投与動物の3匹、rVWF+アドベイト投与動物の4匹及びrVWF+アドベイト製剤処方緩衝液投与動物の1匹に過敏症様皮膚反応(腫脹及び膨疹)が認められたこともヒスタミンの関与を示すエビデンスであった。

rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液、rVWF、rVWF+アドベイト又はHaemate P 投与時の呼吸機能の変化は、呼吸数増加、1回換気量低下及び分時換気量増加であった。速くて浅い呼吸パターンは、肺のJ受容体(若しくはC線維)及び/又は刺激受容体の刺激によるものと考えられている[1,9]。ヒスタミンを含むいくつかの炎症性メディエーターがイヌのこれらの受容体を刺激することが示されている[2,4,5]。これらの受容体の刺激により、吸気運動ニューロン活性の増加及び気管支収縮が生じ、それぞれ呼吸数増加及び1回換気量低下の原因となる。rVWF+アドベイト投与後の呼吸器系変化はHaemate P 投与後と比較して軽度であった。

呼吸機能(呼吸数、1回換気量及び分時換気量)の連続応答パラメータについては、統計解析ソフトウェア(SAS)(混合モデルでのLSMEANSステートメント)を用いて統計解析した。投与前値を経時データの投与前値との差の解析において共変量として用いた。各パラメータについて、各経時データの投与前値との差の対比較を有意水準5%で行った。

rVWF 及び rVWF+アドベイト投与群と生理食塩液及び rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液投与群、並びに Haemate P 投与群と生理食塩液及び rVWF+アドベイト投与群との比較において、有意水準5%に基づき、平均呼吸器系パラメータに統計学的な有意差は認められなかった。

rVWFの単独投与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合併する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。上記投与群に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ためと考えられた。しかし、血小板数は投与15分後にベースライン(投与前値)に戻ったことから、一過性の作用であることが示された。有害な臨床徴候、肉眼的病理変化又は病理組織学的変化は認められなかった。

2.6.2 薬理試験の概要文

血小板凝集の連続応答パラメータについては、SAS（混合モデルでの LSMEANS ステートメント）を用いて統計解析した。投与前値を経時データの投与前値との差の解析の共変量として用いた。各経時データの投与前値との差の一对比較を有意水準 5%で行った。

rVWF、rVWF+アドベイト又は Haemate P 投与群の平均血小板凝集は投与動物 4 匹のすべてにおいて、投与直後（rVWF+アドベイト投与群を除く）及び投与 15 分後に生理食塩液投与群と比較して低下した（ $P < 0.05$ ）。rVWF の平均血小板凝集はまた、投与直後に rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液投与群と比較して低下した（ $P < 0.05$ ）。

4.1.2 カニクイザルにおける rVWF の 4 週間静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（506794 試験）

カニクイザルでの 4 週間反復投与毒性試験において、投与 23 日目に心電図、血圧及び呼吸数に対する影響を評価した。rVWF は、100、300 及び 800 IU VWF:RCo/kg の用量で 1 日 1 回静脈内投与した。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。

心電図は、すべての動物で投与前に 2 回、並びに対照群、100 及び 300 IU VWF:RCo/kg 群動物で投与 4 週間の間は投与 24 時間後に 1 回及び回復期間 2 週間の間に 1 回測定した。各動物の心電図（I、II、III、aVR、aVL 及び aVF 誘導）は Cardiofax ECG 9620 心電計（Nihon Kohden Europe GmbH, Germany）を用いて測定した。II 誘導の波形を評価し、P-R、QRS 及び Q-T 間隔並びに心拍数を得た。II 誘導心電図の QT は、Bazett 補正式（QTcB）を用いて心拍数変化に対して補正した。

各動物の血圧は、投与前に 2 回、並びに対照群、100 及び 300 IU VWF:RCo/kg 群動物で投与 4 週間の間は投与 24 時間後に 1 回及び回復期間 2 週間の間に 1 回測定した。各動物の収縮期、拡張期及び平均動脈血圧は VetMed HDO Pro 血圧計を用いて測定し、記録した。

各動物の呼吸数は、投与前に 2 回、並びに対照群、100 及び 300 IU VWF:RCo/kg 群動物で投与 4 週間の間は投与 24 時間後に 1 回及び回復期間 2 週間の間に 1 回測定した。各動物の吸気及び呼気の色を視覚的に評価し、15 秒間記録し、1 分あたりの呼吸数を算出した。

心電図パラメータ（投与 23 日目に評価）に被験物質に関連した変化はないと考えられた。心拍数はすべての群においてすべての時点で同様であり、心電図間隔の群間差はいずれも小さく（統計学的有意性のある場合でも）、用量に関連しない又は投与前値と同様の傾向であった。

平均血圧、拡張期血圧又は収縮期血圧に被験物質に関連した変化は認められなかった。同時対照群及び投与前値との差は小さく、用量に関連しなかった。

呼吸数に被験物質に関連した変化は認められなかった。同時対照群及び投与前値との差は小さく、用量に関連しなかった。

以上の結果をまとめると、評価した投与群（最大 300 IU VWF:RCo/kg）では、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。

4.2 中枢神経系

4.2.1 カニクイザルにおける rVWF の 4 週間静脈内投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 (506794 試験)

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。

506794 試験（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又は顕微鏡的所見、若しく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。

4.3 血栓形成性

4.3.1 ウサギうつ滞血栓症モデルを用いた rVWF の単独投与及びアドベイトとの併用投与による血栓形成性の検討 (PV2010701 試験)

本試験の目的は、Wessler ら[8]によって報告されている半定量法を用いて rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与による血栓形成性を評価することであった。本試験では、被験物質又は対照物質を静脈内持続注入したときの静脈結紮部位における血栓形成を評価した。

rVWF 1 ロットの単独又はアドベイトとの併用投与では、投与可能な最大容量 10 mL/kg で試験し、単独で 1262 IU VWF:RCo/kg 用量又は併用で 812.5 IU VWF:RCo/kg + 623.7 IU FVIII/kg（活性比 = 1.3 : 1）用量を投与した。活性対照物質として、Haemate P を 10 mL/kg の等容量で試験し、782 IU VWF:RCo/kg + 650 IU FVIII/kg 用量を投与した。溶媒対照物質として、対応する緩衝液を等容量で投与して評価した。1 群あたりウサギ 6 匹（雌雄各 3 匹）を評価した。

被験物質又は対照物質を結紮した頸静脈と反対側の耳静脈を介して 15 秒にわたり注入した。投与 25 秒後に頸静脈の両側の結紮糸を結んで頸静脈を血流から分離した。10 分後に結紮糸を結んだ部分の静脈切片を取り出し、3.8%クエン酸ナトリウム溶液を満たしたペトリ皿に移して切開し、内容物をペトリ皿に取り出した。血栓の数及び大きさは、採点法（評価スケール 0～4、0 = 血栓のない血液、0.5～1 = 少数の小血栓、2 = いくつかの中型血栓又は多数の小血栓、3 = 多数の中型血栓、3.5 = 少数の大血栓、4 = 静脈切片を覆う 1 個の大血栓）により評価した。更に、血流から静脈切片を分離した直後に心臓穿刺により血液試料を採取し、VWF（VWF:Ag）及び FVIII（FVIII 活性）の血漿中濃度を分析し、生体内回収率を比較した。試験は 2 日にわたって実施し、試験系を検証するために、各日、活性型プロトロンビン複合体製剤である FEIBA を陽性対照として 2 匹に投与し評価を開始した。

2.6.2 薬理試験の概要文

rVWF 単独、rVWF+アドベイト又は対照物質〔溶媒対照又は活性対照物質（Haemate P）〕に、血栓形成性の徴候は認められなかった（表 2.6.2-1）。陽性対照投与動物はスコア 4、4、3.5 及び 4 を示し（陽性対照、20 U/kg FEIBA）、試験系の妥当性が確認された。

表 2.6.2-1. 血栓形成スコア

Test/Reference item	Score of Individual Animal						Mean
	1	2	3	4	5	6	
rVWF alone	0	0	0	0	0	0	0
rVWF+ADVATE	0	0	0	0	0	0	0
Haemate P	0	0	0	0	0	0	0
rVWF buffer	0	0	0	0	0	0	0
rVWF buffer + ADVATE buffer	0	0	0	0	0	0	0
FEIBA	4	4	3.5	4	-	-	3.9

- : Not applicable

VWF:Ag の生体内回収率は、rVWF 単独では 48.7%、rVWF とアドベイトとの併用では 67.1%、Haemate P では 52.5%であった。FVIII の生体内回収率は、rVWF とアドベイトとの併用では 77.4%、 Haemate P では 48.1%であった。

以上をまとめると、rVWF 単独で 1262 IU VWF:RCo/kg、rVWF とアドベイトとの併用で 812.5 IU VWF:RCo/kg + 623.7 IU FVIII/kg の用量を投与したとき、ウサギうつ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。

4.4 アナフィラキシー様反応誘発性

4.4.1 rVWF のアナフィラキシー様反応誘発性試験：自然発症高血圧ラットにおける血圧低下作用：非臨床用ロットの単独投与及びアドベイトとの併用投与の評価（PV2040705 試験）

rVWF 2 ロットを単独で又はアドベイトと併用して麻酔下の自然発症高血圧（SH）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溶媒対照と比較した。陽性反応は、投与後最初の 10 分以内に 1 分以上持続する平均動脈圧の 30%以上の低下と定義した。1 群 6 匹の雄ラット 5 群を試験に使用した。rVWF の 240 IU VWF:RCo/kg を単独で又はアドベイトの 185 IU FVIII/kg との併用により動脈内投与した。溶媒対照は rVWF 及びアドベイトの各製剤処方緩衝液の混合物であり、最も低濃度の rVWF ロットとアドベイトとを併用投与したときの総容量に相当する容量を投与した。陽性対照として、筋注用免疫グロブリン 5 mg/kg を被験物質又は対照物質投与の 20 分後に各動物に動脈内投与した。

2.6.2 薬理試験の概要文

rVWF の単独投与により、各ロット群の 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血圧低下反応は認められなかった（表 2.6.2-2）。免疫グロブリンの動脈内投与により、すべての動物に血圧低下反応が認められ、本モデルの妥当性が確認された。

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 2.6.2-3）。これらの結果に基づき、rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与により、臨床において血圧低下反応は生じ難いと考えられた。

4.4.2 モルモットにおける rVWF の単独投与及びアドベイトとの併用投与による気管支攣縮性アナフィラキシー様反応誘発性試験（PV1900605 試験）

rVWF 2 ロット（単独又はアドベイトと併用投与）、アドベイト単独及び溶媒対照物質の麻酔下モルモットにおける肺膨張圧に及ぼす影響を比較した。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を比較した。

陽性反応は、投与後最初の 10 分以内に 1 分以上持続する 30%以上の肺膨張圧の増加と定義した。

1 群 8 匹の雄モルモット 6 群を試験に使用した。rVWF の 240 IU VWF:RCo/kg を単独で又はアドベイトの 185 IU FVIII/kg との併用により動脈内投与した。アドベイト単独では、185 IU FVIII/kg を投与した。溶媒対照物質は rVWF 及びアドベイトの各製剤処方緩衝液の混合物であり、最も低濃度の rVWF ロットとアドベイトとを併用投与したときの総容量に相当する容量を投与した。陽性対照として、筋注用免疫グロブリン 5 mg/kg を被験物質又は対照物質の投与 20 分後に各動物に動脈内投与した。動物でのアナフィラキシー様反応の発現により、本モデルの妥当性が確認された。

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。rVWF 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。別ロットの rVWF 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 ロットの評価結果を併合した結果、アドベイト製剤処方緩衝液と rVWF 製剤処方緩衝液とを併用投与したときの結果（表 2.6.2-2）との有意差は認められなかった（ $p = 0.5362$ 、フィッシャーの両側正確確率検定、統計学的有意水準 5%）。

5. 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用に特化した試験は実施していない。rVWF は単独で又は rFVIII との併用により投与され、これら 2 成分間の相互作用については、上記の薬理試験において評価した。

6. 考察及び結論

1 種類の *in vitro* 薬理試験及び数種類の *in vivo* 薬理試験を実施し、rVWF の有効性及び安全性薬理を評価した。*In vitro* 薬理試験により、超巨大マルチマー含有 rVWF は、rVWF-血小板凝集塊の形成に有用であり、ADAMTS13 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。

2.6.2 薬理試験の概要文

In vivo 試験では、rVWF 投与により、VWd イヌで出血時間の短縮が示された。rVWF とアドベイトとを併用投与したときの有効性は、VWd マウスを用いた動脈血栓症モデル及び尾端出血モデルで示された。これらのマウスモデルにおいて、rVWF とアドベイトとの併用投与による有効性は、rVWF 単独又は pdVWF 投与よりも高かった。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 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 の間の多量体構造の相違は、pdVWF と rVWF の効力の差の原因となる可能性がある。rVWF は、細胞培養又は精製過程で ADAMTS13 に曝露されておらず、したがって、血小板相互作用に関して有効性がより高い rVWF の超巨大マルチマーを含有する。VWF の超巨大マルチマーはまた、デスモプレシン酢酸塩（DDAVP、天然の下垂体ホルモン 8-アルギニンバソプレシンの合成類似体）を含む種々の内因性及び外因性刺激物質による内皮細胞の刺激により、ヒト生体内で天然に生じる。天然の超巨大マルチマーは、ヒト内皮細胞の貯蔵プールから放出され、内皮細胞表面に付着して、若しくは循環血中の液相中で ADAMTS13 により分解される。そのため、これらの超巨大 VWF マルチマーは通常、ヒト正常血漿又は pdVWF 濃縮物には見出されない。

rVWF は pdVWF と異なり、VWd マウスに投与されるまで ADAMTS13 と接触しない。

VWd マウスにおいて、rVWF の *in vivo* 有効性に及ぼす ADAMTS13 の影響を、2 種類の FeCl₃ 誘発性血栓症モデルを用いて検討した。試験結果より、生体内で rVWF がヒト rADAMTS13 により切断されると、マウスにおいて rVWF の効力は pdVWF と同程度にまで低下することが示された。

異なる動物モデルにおいて以下の 5 種類の *in vivo* 試験を実施し、血栓形成性がないことを確認するとともに、rVWF の生命維持機能を低下させる可能性について評価した。

- ・ イヌ及びサルでの心血管系及び呼吸器系安全性薬理試験
- ・ サルでの中枢神経系安全性薬理試験
- ・ ウサギうつ滞血栓症モデルでの血栓形成性の検討
- ・ 自然発症高血圧ラットでの血圧低下作用の評価
- ・ モルモットでの気管支攣縮性アナフィラキシー様反応誘発性の評価

イヌでは、rVWF の単独及びアドベイトとの併用投与の心血管系及び呼吸器系への影響は一過性であり、製剤処方緩衝液（溶媒対照）投与動物と類似しており、Haemate P と比較して軽度であった。rVWF+アドベイトを投与したイヌ 1 匹に認められた心血管系の変化は、rVWF+アドベイト製剤処方緩衝液又は rVWF の投与後とは若干異なると判断された。この理由を確定的に判断することはできなかったが、動物の個体差に起因する可能性が最も高い。これらの試験結果より、rVWF の単独及びアドベイトとの併用投与による変化は、両製剤に共通するポリソルベート 80 に起因する可能性が最も高く、有効成分 rVWF に起因しないことが示唆される。観察された血小板減少及び血小

2.6.2 薬理試験の概要文

板凝集低下は、被験物質に関連する可能性があり、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であると考えられた。しかし、血小板数は投与 15 分後にベースライン（投与前値）に戻ったことから、一過性の作用であることが示された。有害な臨床徴候、肉眼的病理変化又は病理組織学的変化は認められなかった。

心電図、血圧及び呼吸数に対する影響を、カニクイザルの 4 週間反復投与毒性試験で評価した。評価したすべての投与群（最大 300 IU VWF:RCo/kg）の血圧、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。

カニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験では、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。臨床観察又は行動変化に被験物質に関連した有害な影響は認められなかった。

ウサギうつ滞血栓症モデルにおいて血栓形成性は認められなかった。

rVWF 単独（SH ラット）又は rVWF とアドベイトとの併用（モルモット）投与により、生物系で観察される正常変動内の陽性反応（rVWF 2 ロットの陽性反応を併合すると、それぞれ 12 匹中 2 匹及び 16 匹中 2 匹）が誘導された。本反応は統計学的に有意ではなく一貫性もなかった。ラットに rVWF を単独で動脈内投与すると陽性血圧低下反応が 2 ロットで各 1 匹認められたが、同ロットの 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 とアドベイトとを動脈内に併用投与すると、気管支攣縮性アナフィラキシー様反応がモルモット 2 匹で誘発されたが、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。

モルモット及びラットで観察された血圧低下作用又は気管支攣縮性アナフィラキシー様反応は、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、他製剤を用いた同様の試験で観察された散発的な反応から示唆されている（表 2.6.2-3）。

以上の薬理試験結果により、rVWF の有効性及び安全性が裏付けられている。

7. 図表

表 2.6.2-2. 陽性反応のまとめ (PV2040705 試験/ラット、PV1900605 試験/モルモット)

Species	Test Article	Lot	Dose/kg BW	Volume/kg BW	Positive Reaction
Rat	rVWF	■■■■■	240 IU VWF:RCo	1.90 mL	1 of 6 animals
		■■■■■	240 IU VWF:RCo	2.17 mL	1 of 6 animals
	rVWF + ADVATE	■■■■■ + ■■■■	240 IU VWF:RCo + 185 IU FVIII	1.90 mL + 1.06 mL	0
		■■■■■ + ■■■■	240 IU VWF:RCo + 185 IU FVIII	2.17 mL + 1.06 mL	0
	Combination Buffer	■■■■■ (rVWF buffer) + ■■■■ (ADVATE buffer)	-	2.17 mL + 1.06 mL	0
Guinea Pig	rVWF	■■■■■	240 IU VWF:RCo	1.90 mL	0
		■■■■■	240 IU VWF:RCo	2.17 mL	0
	ADVATE	■■■■■	185 IU FVIII	1.06 mL	0
	rVWF + ADVATE	■■■■■ + ■■■■	240 IU VWF:RCo + 185 IU FVIII	1.90 mL + 1.06 mL	2 of 8 animals
		■■■■■ + ■■■■	240 IU VWF:RCo + 185 IU FVIII	2.17 mL + 1.06 mL	0
	Combination Buffer	■■■■■ (rVWF buffer) + ■■■■ (ADVATE buffer)	-	2.17 mL + 1.06 mL	0

2.6.2 薬理試験の概要文

表 2.6.2-3. 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)	████████	2/6
			████████	0/6
			████████	0/6
		Gammagard S/D	████████	2/6
			████████	1/6
		Formulation Buffer	████████	1/6
PV0310101	Guinea Pig	NG IGIV (Test Article)	████████	0/6
			████████	0/6
			████████	0/6
		Gammagard S/D	████████	1/6
			████████	0/6
		Formulation Buffer	████████	0/6
PV1470405	Guinea Pig	FEIBA NF/VH	████████	1/6
		FEIBA VH	████████	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. Berne RM and Levy MN. Control of Breathing. Chapter 37 in Physiology. 3rd ed, edited by Berne RM and Levy MN. Mosby Year Book; 1993. 599-611.
2. Coleridge HM, Coleridge JCG, Roberts AM. Rapid shallow breathing evoked by selective stimulation of airway C fibres in dogs. J Physiol 1983; 340:415-33.
3. Day SM, Reeve JL, Myers DD, Fay WP. Murine thrombosis models. Thromb Haemost 2004; 92:486-94.
4. Delpierre S, Orehek J, Beaupre A, Velardocchio JM, Fornaris M, Grimaud C. Comparative reflex action of histamine, acetylcholine and serotonin on dog airways. Bull Eur Physiopathol Respir 1983; 19:489-93.
5. Islam MS and Ulmer WT. Role of vagus nerves and inhalative aerosols of acetylcholine and histamine on dynamic pulmonary elastance in anesthetized spontaneously breathing and artificially ventilated dog. Res Exp Med 1982; 181:155-70.
6. 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.
7. Millard RW, Baig H, Vatner SF. Cardiovascular effects of radioactive microsphere suspensions and Tween 80 solutions. Am J Physiol 1977; 232:H331-4.
8. Wessler S, Reimer SM, Sheps MC. Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum. J Appl Physiol 1959; 14:943-6.
9. West JB. Control of Ventilation. Chapter 8 in Respiratory Physiology, 5th ed. edited by Coryell PA. Williams and Wilkins; 1995. 117-32.

目次

2.6.3.1. 薬理試験：一覧表.....	2
2.6.3.2. 効力を裏付ける試験.....	4
2.6.3.3. 副次的薬理試験.....	6
2.6.3.4. 安全性薬理試験.....	7
2.6.3.5. 薬力学的薬物相互作用試験.....	9

2.6.3.1.藥理試驗：一覽表

表 2.6.3-1. Pharmacology Overview					Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE	
Type of Study/Description	GLP ^a	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location of Final Report
<i>In Vitro</i> Primary Pharmacodynamics						
Platelet aggregation	No	Human blood	Not applicable	[REDACTED] Baxter 72 [REDACTED] [REDACTED]	KRAGH 2014	4.2.1.1-1
<i>In Vivo</i> Primary Pharmacodynamics						
Arterial thrombosis	No	VWd mouse	Intravenous	Baxter 20 ^c	BA0107	4.2.1.1-2
Arterial thrombosis	No	VWd mouse	Intravenous	Baxter 20 ^c	BA1207	4.2.1.1-3
Tail tip bleeding	No	VWd mouse	Intravenous	Baxter 20 ^c	BA0207	4.2.1.1-4
Hemostasis	No	VWd dog	Intravenous	Baxter 72, Baxter BG, [REDACTED] ^d	RD_VB_110703	4.2.1.1-5
Secondary Pharmacodynamics						
Not applicable						
Safety Pharmacology						
Cardiovascular, Respiratory, Coagulation	Yes	Dog	Intravenous	Baxter Round lake ^e	34572	4.2.1.3-1
Thrombogenicity	Yes	Rabbit	Intravenous	Baxter 20 ^c	PV2010701	4.2.1.3-2
Anaphylactoid potential	Yes	Spontaneously hypertensive rat	Intra-arterial	Baxter 20 ^c	PV2040705	4.2.1.3-3
Anaphylactoid potential	Yes	Guinea pig	Intra-arterial	Baxter 20 ^c	PV1900605	4.2.1.3-4
Pharmacodynamic Drug Interactions						
Not applicable						

2.6.3 藥理試驗概要表

^a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

^b [REDACTED] Germany, [REDACTED]
[REDACTED] Germany, Baxter AG, Industriestrasse 72, A-1220 Vienna, Austria

^c Baxter AG, Industriestrasse 20, A-1220 Vienna, Austria

^d Baxter AG, Industriestrasse 72, A-1220 Vienna, Austria; Baxter AG, Benatzkygasse 2-6, A-1220 Vienna, Austria; [REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED]

^e Baxter Healthcare Corp., 25212 W. Illinois Route 120, Round Lake, Illinois, USA

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.2.効力を裏付ける試験

表 2.6.3-2. Primary Pharmacodynamics						Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE		
Pharmacodynamic model	Species / Strain	Method of Administration	Dose (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg)	Gender and n per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number	Location of Final Report
Platelet aggregation	Human blood	<i>In vitro</i>	1 U VWF:Ag/mL	-	Platelets and rVWF form a composite, and rVWF is capable of entirely reversible self-assembly. ULMW multimer containing rVWF was more effective compared to rVWF lacking ULMW multimers regarding platelet aggregation.	No	KRAGH 2014	4.2.1.1-1
Arterial thrombosis	Mouse/ VWF deficient	Intravenous	200, 400	5 m + 5 f	Efficacy of rVWF + ADVATE could be shown.	No	BA0107	4.2.1.1-2
			200 + 154 400 + 308					
Arterial thrombosis	Mouse/ VWF deficient	Intravenous	400 + 308 400 + 308 + 2500 ADAMTS13 U/kg	3 – 5 m + 3 – 5 f	Human recombinant ADAMTS13 cleaves rVWF <i>in vivo</i> , resulting in a rVWF potency in mice similar to that of pdVWF. rVWF was more hemostatically active than less multimeric preparation of rVWF.	No	BA1207	4.2.1.1-3
Tail tip bleeding	Mouse/ VWF deficient	Intravenous	400, 600, 800	8 m + 8 f	Efficacy of rVWF + ADVATE could be shown.	No	BA0207	4.2.1.1-4
			400 + 308 600 + 462 800 + 615					

2.6.3 藥理試驗概要表

表 2.6.3-2. Primary Pharmacodynamics (Continued)						Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE		
Pharmacodynamic model	Species / Strain	Method of Administration	Dose (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg)	Gender and n per Group	Noteworthy Findings	GLP	Study Number	Location of Final Report
Hemostasis	Dog/VWF deficient	Intravenous	100	1 m	Significant reduction of bleeding time	No	RD_VB_110703	4.2.1.1-5

m = male

f = female

ULMW = ultralarge molecular weight

2.6.3 藥理試驗概要表

2.6.3.3. 副次的藥理試驗

表 2.6.3-3. Secondary Pharmacodynamics	Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE
Not conducted	

2.6.3 藥理試驗概要表

2.6.3.4. 安全性藥理試驗

表 2.6.3-4. Safety Pharmacology					Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE			
Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose (IU/kg VWF:RC ₀ ± FVIII IU/kg)	Gender and n per Group	Noteworthy Findings	GLP ^a	Study Number	Location of Final Report
Cardiovascular, Respiratory, Coagulation	Dog/ Beagle	Intravenous	240 240 + 185	2 m + 2 f	Cardiovascular ^b and respiratory ^c effects after treatment with rVWF, rVWF + ADVATE, buffer, and Haemate P. Hematology changes (transient thrombocytopenia) after treatment with rVWF, rVWF + ADVATE, and Haemate P. Effects on coagulation (reduced platelet aggregation) after treatment with rVWF, rVWF + ADVATE, Haemate P. Prolonged aPTT after treatment with Haemate P. Hypersensitivity-like skin reactions after treatment with rVWF, rVWF + ADVATE, and buffer	Yes	34572	4.2.1.3-1
Thrombogenicity	Rabbit/ NZW	Intravenous	1262	3 m + 3 f	No thrombogenicity	Yes	PV2010701	4.2.1.3-2
			812.5 + 623.7	3 m + 3 f	No thrombogenicity			

2.6.3 藥理試驗概要表

表 2.6.3-4. Safety Pharmacology (Continued)						Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE		
Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Dose (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg)	Gender and n per Group	Noteworthy Findings	GLP ^a	Study Number	Location of Final Report
Anaphylactoid potential	Rat/ Spontaneously Hypertensive	Intra-arterial	240	6 m	Positive reactions (more than 30% decrease in mean arterial blood pressure lasting for longer than one minute within the first 10 minutes after treatment) of one animal	Yes	PV2040705	4.2.1.3-3
			240 + 185	6 m	none			
Anaphylactoid potential	Guinea pig/ Dunkin Hartley	Intra-arterial	240	8 m	none	Yes	PV1900605	4.2.1.3-4
			240 + 185	8 m	Positive reactions (increase in pulmonary inflation pressure of more than 30% lasting for more than 1 minute within the first 10 minutes after treatment) of 2 animals			

^a An entry of "Yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement.

^b Severe hypotension, drop in cardiac output, drop in central venous pressure after treatment with Haemate P; lower calculated systemic vascular resistance and increase in cardiac output for rVWF and for buffer, lower mean arterial pressure and lower calculated systemic vascular resistance with an increased cardiac output for rVWF + ADVATE

^c Increased respiratory rate, decreased tidal volume

m = male

f = female

2.6.3 藥理試驗概要表

2.6.3.5.藥力学的藥物相互作用試験

表 2.6.3-5. Pharmacodynamic Drug Interactions	Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE
Not conducted	