# ゼオマイン筋注用 50 単位
# ゼオマイン筋注用 100 単位
# ゼオマイン筋注用 200 単位

製造販売承認申請書添付資料

第 2 部（モジュール 2）

2.7　臨床概要

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法

帝人ファーマ株式会社

目次

2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法 ..... 4
2.7.1.1　背景及び概観 ..... 4
2.7.1.1.1　原薬 ..... 4
2.7.1.1.1.1　製造 ..... 4
2.7.1.1.1.2　一般的特性 ..... 4
2.7.1.1.1.3　構造的特性 ..... 5
2.7.1.1.1.4　免疫学的特性 ..... 5
2.7.1.1.1.5　類似薬との相違点 ..... 5
2.7.1.1.2　製剤 ..... 6
2.7.1.1.2.1　製剤の安定性 ..... 6
2.7.1.1.2.2　製剤処方の経緯 ..... 6
2.7.1.1.2.3　添加剤 ..... 7
2.7.1.1.2.4　製剤ロット一覧表 ..... 7
2.7.1.1.3　外来性感染性物質の安全性評価 ..... 7
2.7.1.1.4　臨床試験に用いた抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の分析法 ..... 7
2.7.1.1.4.1　抗 NT 101 抗体分析法（FIA 法） ..... 8
2.7.1.1.4.2　中和抗体分析法（HDA 法） ..... 9
2.7.1.2　個々の試験結果の要約 ..... 10
2.7.1.3　全試験を通しての結果の比較と解析 ..... 10
2.7.1.4　付録 ..... 11

**略語・略号一覧**

| 略号 | 略さない表現 | 定義又は説明 |
|---|---|---|
| CV | Coefficient of Variation | 変動係数 |
| [redacted] | [redacted] Fluorescence Immunoassay | [redacted]蛍光免疫測定法（時間分解蛍光免疫測定法の一種） |
| EU | European Union | 欧州連合 |
| FIA | Fluorescence Immunoassay | 抗A型ボツリヌス毒素抗体の検出に用いた時間分解蛍光免疫測定（法） |
| HDA | Hemidiaphragm Assay | 抗A型ボツリヌス毒素抗体の中和活性の評価に用いたマウス片側横隔膜アッセイ |
| HQC | High Quality Control Sample | 高濃度 QC 試料 |
| IU | International Unit | FIA 法及び HDA 法で用いた陽性対照抗体の力価の単位：[redacted] |
| JAN | Japanese Accepted Names of pharmaceuticals | 日本医薬品一般名称 |
| $LD_{50}$ | Lethal Dose 50% | 50%致死量 |
| LQC | Low Quality Control Sample | 低濃度 QC 試料 |
| NF | Normalization Factor | FIA 法によるスクリーニング試験のカットポイントの算出に用いた正規化係数 |
| QC | Quality Control | 品質管理 |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate | ドデシル硫酸ナトリウム |
| USAN | United States Adopted Names | 米国一般名 |

## 2.7.1　生物薬剤学試験及び関連する分析法

### 2.7.1.1　背景及び概観

NT 201（商標名：ゼオマイン）は、ドイツの Merz Pharmaceuticals GmbH（以下 Merz 社）が製造し、海外で上市・販売［欧州連合（European Union：EU）での商標名：Xeomin®（神経学的疾患）、Bocouture®（美容）］している A 型ボツリヌス毒素製剤［医薬品一般的名称：インコボツリヌストキシン A（IncobotulinumtoxinA）］である。天然のボツリヌス毒素は 5 個以上のタンパク質から構成される高分子量複合体の一部である。NT 201 の製造過程では複合タンパク質を神経毒素から分離する過程を経ており、NT 201 の有効成分は純粋な神経毒素のみである。A 型ボツリヌス毒素は末梢コリン作動性神経終末に作用し、神経伝達物質のアセチルコリンの放出を阻害することで、随意筋の筋力を弱める。この作用により、痙性斜頸、眼瞼痙攣、痙縮、眉間の表情皺といった筋緊張亢進を伴う疾患に有効である。

NT 201 製剤中のインコボツリヌストキシン A（NT 101）の力価はマウス腹腔内投与 50%致死量（$LD_{50}$）によって決定される。1 U とは、所定の条件下で毒素を腹腔内投与してから 72 時間後に被検マウス集団の半数が死亡する毒素量を指す。

NT 201 製剤はガラスバイアル入りの注射用（凍結乾燥）粉末として供給される。各バイアルにはインコボツリヌストキシン A が 50 U、100 U、又は 200 U 含まれている。最終製剤の賦形剤は安定化のためのショ糖及びボツリヌス毒素の表面（例；容器、針、シリンジ）への吸着を防止するためのヒト血清アルブミンである。

NT 201 は、2005 年 5 月 31 日に、ドイツで眼瞼痙攣及び痙性斜頸の適応で初めて承認された。これまでに痙縮、痙性斜頸、流涎症、眼瞼痙攣、顔面上部の皺、及び眉間の表情皺に対する効能・効果で、米国や欧州をはじめとする世界 60 ヵ国以上で承認されている。

上肢痙縮に対する承認は、2009 年 11 月 10 日に EU で「脳卒中後の上肢痙縮」の適応で承認され、その後 2017 年 9 月 1 日には「上肢痙縮」に適応拡大された。米国では、2015 年 12 月 22 日に「上肢痙縮」の適応で承認された。「上肢痙縮」の適応は、米国及びカナダを含む 73 ヵ国で承認されている（2020 年 1 月 31 日現在）。

#### 2.7.1.1.1　原薬

##### 2.7.1.1.1.1　製造

インコボツリヌストキシン A（NT 101）の製造工程は、以下の工程に分けることができる。

[redacted]

##### 2.7.1.1.1.2　一般的特性

本品の一般的特性及び類似薬の相違点を以下に示す。

#### 2.7.1.1.1.3　　構造的特性

A 型ボツリヌス毒素は、嫌気性芽胞形成グラム陽性細菌であるボツリヌス菌の[redacted]由来で、1296 個のアミノ酸残基からなる一本鎖タンパク質として生成される。この一本鎖タンパク質は[redacted]により、分子量～100 kDa の重鎖と～50 kDa の軽鎖へと切断される。これらの別々の鎖はジスルフィド結合によって共有結合しており、薬理作用の本体となるインコボツリヌストキシン A は、分子量 150 kDa の神経毒素である。その分子量はラウリル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元）で確認している。

#### 2.7.1.1.1.4　　免疫学的特性

本神経毒素は A 型ボツリヌス毒素に対する抗血清で中和されることを確認した。

#### 2.7.1.1.1.5　　類似薬との相違点

本邦では、ボトックス®が上肢・下肢痙縮の適応で使用されている。ボトックス®の原薬は、A 型ボツリヌス毒素であり、この 150 kDa の神経毒素は、分子量が 900 kDa の複合タンパク質、又は更に小さな複合タンパク質の一部として存在している。ボトックス®では神経毒素が複合タンパク質との複合体を形成しているのに対し、NT 201 は複合タンパク質を含まない神経毒素である。ボトックス®及び NT 201 はいずれも中性付近の組織への投与により、最終的には麻痺作用を有する 150 kDa の同じ神経毒素を含有する製剤である。神経毒素と複合タンパク質との高分子複合体は、潜在的に免疫原性を有する可能性があるが、150 kDa の神経毒の薬理学的活性には影響を及ぼさない。

嫌気性細菌であるボツリヌス菌（*Clostridium Botulinum*）が本来産生する神経毒素は、経口摂取では複合タンパク質により哺乳類消化管の苛酷な環境から神経毒素が保護されているが、筋肉内注射では保護作用を有さない。ボツリヌス毒素 A 型の培養物からは 19S（900 kDa、LL 複合体）、16S（500 kDa、L 複合体）、及び 12S（300 kDa、M 複合体）が分離されるが化学量論的にはすべての複合体は明確になっていない。精製した 900 kDa 及び 500 kDa の神経毒素との複合体は、6.9 以上の pH では半減期が 1 分未満となるため、pH 及び時間依存的に 150 kDa の神経毒素が放出されるが、pH6.25 以下では安定である。また、濃縮した 900 kDa の複合体を希釈すると 500 kDa の神経毒素を含む複合体が解離する。さらに生理食塩水と等張となるよう塩化ナトリウムを添加すると、これらの複合体はさらに分解し、150 kDa の遊離神経毒素が放出される。

2011 年に Eisele らの研究において、A 型ボツリヌス毒素との複合体は神経毒素の効果的な放出によって、特定の環境変化へ速やかに対応していることが報告されている。また、A 型ボツリヌス毒素との複合体の大半は、バイアルでの再溶解及び希釈時、中性付近の組織への投与において、完全に乖離することも報告されている [3) 4)]。さらに、複合タンパク質の含有の有無にかかわらず筋肉内注射後の薬理作用、また、拡散挙動にも差がないことが報告されている［5.3.4.1-3　海外 0709 試験］。したがって、ボトックス®と NT 201 の両製剤の有効成分がそれぞれ品質の観点では

分子量が 900 kDa と 150 kDa と複合タンパク質の有無で異なっていても、両者の活性は同じことを立証している。

#### 2.7.1.1.2　製剤

##### 2.7.1.1.2.1　製剤の安定性

NT 201（凍結乾燥製剤）を用いて、25±2°C/60±5%RH における安定性試験を行った。本試験では、試験項目として性状、微粒子、pH、再調製時間、水分、確認試験、[redacted]、エンドトキシン、[redacted]、インコボツリヌストキシン A 含量、[redacted]、力価、及び無菌[redacted]を実施した。

また、本品を 4 mL の生理食塩液で再調製した試料について、5°C±3°C で保存した安定性試験も行った。本試験では、試験項目として性状、微粒子、pH、確認試験、[redacted]、エンドトキシン、[redacted]、インコボツリヌストキシン A 含量、[redacted]、力価及び無菌を実施した。

その結果、すべての試験項目で明らかな変化は認められなかったことから、NT 201（凍結乾燥製剤）は 25±2°C/60±5%RH 条件下で 48 ヵ月まで、再調製した試料では 5°C±3°C で 24 時間までの保存において、本品は安定であることを確認した。

##### 2.7.1.1.2.2　製剤処方の経緯

本品は、インコボツリヌストキシン A を有効成分とし、1 バイアル中に 1 U をマウス腹腔内投与 50%致死量（$LD_{50}$）として 50 U、100 U 又は 200 U を含有し、添加剤として精製白糖及びヒト血清アルブミンを含む凍結乾燥注射剤である。

なお、本処方は開発初期から商用生産を通して変更していない。

本品の含量及び組成を表 2.7.1-1 に示す。

**表 2.7.1-1　ゼオマインの含量及び組成**

| 成分名 | 規格 | 配合目的 | 含量／バイアル [b) c)] | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 50 U | 100 U | 200 U |
| インコボツリヌストキシン A | 別紙規格 EP[a)] | 有効成分 | 50 U | 100 U | 200 U |
| ヒト血清アルブミン | 生物学的製剤基準 | 安定剤 | 1 mg | 1 mg | 1 mg |
| 精製白糖 | 日局 | 安定剤 | 4.7 mg | 4.7 mg | 4.7 mg |
| 容器及び施栓系 | | | ガラス容器 [d)] | ガラス容器 [d)] | ガラス容器 [d)] |

a）欧州薬局方
b）臨床試験には表 2.7.1-2 で示す 50 U/100 U を用いて、200 U は使用しなかった。
c）本邦では、50 U/100 U/200 U の承認申請を行う。
d）ガラス製バイアル、ゴム栓及びアルミニウム製キャップから成る。

#### 2.7.1.1.2.3　　添加剤

本品の添加剤では、安定剤としてヒト血清アルブミン及び精製白糖を採用した。また、溶剤として注射用水を用いるが、注射用水は製剤の凍結乾燥工程において取り除かれるため、最終製剤には含まれない。

#### 2.7.1.1.2.4　　製剤ロット一覧表

本邦で実施した臨床試験及び海外で実施された臨床試験で本邦の承認申請に使用された、製剤ロットを表 2.7.1-2 に示した。

**表 2.7.1-2　臨床試験製剤ロット一覧**

| 単位 | 製剤ロット番号 | 用途 |
|---|---|---|
| 100 | [redacted] | 海外臨床試験第 I 相（BTC 60201- 9901）、<br>海外臨床試験第 II 相（BTC 60201- 9801） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 I 相（MRZ 60201-0113）、<br>海外臨床試験第 III 相（MRZ 60201-0003、-0013） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ.60201-0410） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ.60201--0607） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 I 相（MRZ 60201-0709）、<br>海外臨床試験第 III 相（MRZ-60201/GL/3002） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ 60201_3053_1） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ 60201_3053_1） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ 60201/SP/3001、GL/3002） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ 60201/SP/3001、GL/3002） |
| | [redacted] | 海外臨床試験第 III 相（MRZ 60201_3053_1） |
| | [redacted] | 国内臨床試験第 III 相（MRZ 60201_3099_1） |
| 50 | [redacted] | 国内臨床試験第 III 相（MRZ 60201_3099_1） |

#### 2.7.1.1.3　　外来性感染性物質の安全性評価

本品の製造工程ではヒト又は動物由来原料に該当する原料を使用している。動物由来原料由来原料については、原薬の製造工程でブタ由来プロテオースペプトン[redacted]及び[redacted]を使用している。いずれの原材料も製造業者で適切な管理がされており、現在までブタ、[redacted]共に伝達性海綿状脳症（TSE）の発生は報告されていない。また、製剤の添加剤として使用しているヒト血清アルブミンは「生物学的製剤基準」（厚生労働省告示第 155 号　平成 16 年 3 月 30 日）に準拠した医薬品を用いている。

以上の結果より、本品に使用されるヒト又は動物由来原料は、現在の科学水準において安全性が確保されていることを確認した。

#### 2.7.1.1.4　　臨床試験に用いた抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の分析法

国内第 III 相臨床試験（MRZ60201_3099_1 試験）におけるヒト血清中抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の分析には[redacted]蛍光免疫測定法（[redacted]）による抗 NT 101 抗体分析法（FIA）と ex vivo のマウス片側横隔膜アッセイに基づいた中和抗体分析法（HDA 法）を用いて段階的に

評価した。最初に、すべてのヒト血清検体について FIA 法によるスクリーニング試験を実施し、シグナルがカットポイントを超えた検体については NT 101 に対する結合特異性を評価するための確認試験を実施した。確認試験では過剰量の NT 101 を添加したときのシグナルの阻害率（%）がカットポイント以上となった検体を抗 NT 101 抗体陽性と判定した。さらに、抗体陽性検体について HDA 法による中和抗体分析を実施し、NT 101 の生物活性に対する中和活性の有無及び中和抗体価をカットポイントに基づいて評価した。各分析法のカットポイントは、関連指針[3) 4)]、Mire-Sluis らの報告[5)] 及び Shankar らの報告[6)] で推奨されている統計的手法に準じて設定した。各分析法の概要を以下に示す。

#### 2.7.1.1.4.1　抗 NT 101 抗体分析法（FIA 法）

本分析法は、[redacted] によるブリッジングアッセイであり、[redacted] 以下、「[redacted] 社」。現在の [redacted]）でバリデートした。本分析法では、マイクロプレートに固相化した NT 101 に血清試料を反応させ、その後[redacted]標識した NT 101、[redacted]標識した[redacted]を順次添加して時間分解蛍光強度を測定した。スクリーニング試験のカットポイントは、健康成人 50 例の個体別ブランク血清試料のシグナルに基づいて 5 %の偽陽性率を許容する判定基準として設定した。バリデーションでは陰性対照試料に対するカットポイントのシグナル比を算出し、これを実試料分析における分析単位特異的なカットポイントを算出するための Normalization factor（以下、「NF」）として用いた。確認試験のカットポイントは、健康成人 45 例の個体別ブランク血清試料のシグナルの阻害率（%）に基づいて[redacted]%に設定した。本分析法の感度、希釈直線性、精度、共存薬物耐性及び安定性は、[redacted]を陽性対照抗体として用いて評価した。本分析法のバリデーションの結果の概要を表 2.7.1-3 に示す。

**表 2.7.1-3　抗 NT 101 抗体分析法（FIA 法）のバリデーション結果の概要**

| | | |
|---|---|---|
| 分析施設 | | [redacted] 社 |
| 試験番号 | | [redacted] ［5.3.1.4-1］ |
| 分析プラットフォーム | | [redacted] |
| 分析マトリックス | | ヒト血清 |
| 最低希釈倍率 | | 希釈なし |
| スクリーニング試験 | カットポイント | 各分析単位の陰性対照試料の分析値に NF（2）を乗じた値 |
| | 検出感度 | [redacted] mIU/mL<br>（陽性対照抗体換算濃度） |
| | 検量線範囲<br>（フック効果） | [redacted] ~ [redacted] mIU/mL<br>（> [redacted] mIU/mL） |
| | 分析単位内精度（CV%） | LQC: [redacted] ~ [redacted] %<br>HQC: [redacted] ~ [redacted] % |
| | 分析単位間精度（CV%） | LQC: [redacted] %<br>HQC: [redacted] % |
| | 共存薬物耐性 | 陽性対照抗体（LQC 及び HQC）の検出において、NT 101 濃度 [redacted] pg/mL まで影響なし |
| 確認試験 | カットポイント | [redacted] % |
| | 分析単位内精度（CV%） | LQC: [redacted] ~ [redacted] %<br>HQC: [redacted] ~ [redacted] % |
| | 分析単位間精度（CV%） | LQC: [redacted] %<br>HQC: [redacted] % |
| 安定性 | 凍結融解 | 3 回 |
| | ベンチトップ | 室温、3 時間 |
| | 短期保存 | 5 ± 3°C、24 時間 |
| | 長期保存 | ≤ -20°C、36 ヵ月 |

LQC：低濃度 QC 試料（[redacted] mIU/mL）
HQC：高濃度 QC 試料（[redacted] mIU/mL）

### 2.7.1.1.4.2　中和抗体分析法（HDA 法）

本分析法は、マウスの横隔膜（筋組織）の筋収縮強度に対する A 型ボツリヌス毒素の減弱作用に基づいた ex vivo のバイオアッセイであり、[redacted]（以下、「[redacted] 社」）でバリデートした。本分析法では、まずマウスから摘出した横隔神経が付随する片側横隔膜をクレブス・リンゲル液に浸し、横隔神経を介して片側横隔膜を持続的に刺激し、筋収縮状態（筋収縮強度は一定）を維持した。その後、一定量の A 型ボツリヌス毒素と血清試料（前処理としてバッファー交換した血清試料）を含んだクレブス・リンゲル液に置換して反応させ、筋収縮強度を経時的に測定した。A 型ボツリヌス毒素の生物活性によって筋収縮強度が初期値の 50 %までに低減するのに要した時間（以下、麻痺時間）を求め、この麻痺時間を抗 A 型ボツリヌス毒素抗体の中和活性を評価するための指標とした。麻痺時間は、血清試料中の A 型ボツリヌス毒素中和抗体の濃度に依存し

て延長される。本分析法のカットポイントは、健康成人 51 例の個体別ブランク血清試料の麻痺時間に基づいて [redacted] min に設定した。本分析法の感度、希釈直線性及び精度は、中和活性を有する[redacted]を陽性対照抗体として用いて評価した。本分析法のバリデーションの結果の概要を表 2.7.1-4 に示す。

**表 2.7.1-4　中和抗体分析法（HDA 法）のバリデーション結果の概要**

| | | |
|---|---|---|
| 分析施設 | | [redacted] 社 |
| 試験番号 | | [redacted] ［5.3.1.4-2］［5.3.1.4-3］［5.3.1.4-4］ |
| 分析プラットフォーム | | マウスの横隔膜を用いたバイオアッセイ（ex vivo） |
| 分析マトリックス | | ヒト血清（前処理：バッファー交換） |
| 最低希釈倍率 | | 希釈なし |
| カットポイント | | [redacted] |
| 検出感度 | | [redacted] mIU/mL<br>（陽性対照抗体換算濃度） |
| 検量線範囲 | | [redacted] ～ [redacted] mIU/mL |
| 精度 | 日内 | 同日に実施可能な 4 回の分析において、各分析の麻痺時間の再現性は 100 ± 15 %以内 |
| | 日間 | 4 回/日の 3 日間の分析において、各分析日の平均麻痺時間の再現性は 100 ± 20 %以内 |

### 2.7.1.2　個々の試験結果の要約

該当せず。

### 2.7.1.3　全試験を通しての結果の比較と解析

該当せず。

### 2.7.1.4　　付録

**表 2.7.1-5　ヒト血清中抗 A 型ボツリヌス毒素抗体分析法バリデーション一覧**

| 分析法 | 分析施設 | 試験番号：試験報告書参照箇所／題名 | 適用試験 |
|---|---|---|---|
| 抗 NT 101 抗体分析法（FIA 法） | [redacted] 社 | [redacted]：［5.3.1.4-1］<br>FIA-AB Method Validation (anti-BoNT antibody [redacted] assay) | MRZ_60201_3099_1 |
| 中和抗体分析法（HDA 法） | [redacted] 社 | [redacted]：［5.3.1.4-2］<br>Validation report for Qualitative determination of BoNT/A neutralizing antibodies by the hemidiaphragm assay | |
| | | [redacted]：［5.3.1.4-3］<br>Validation report for The hemidiaphragm assay (HDA-AB) for the quantitative determination of Botulinum neurotoxin serotype A neutralizing antibodies | |
| | | [redacted]：［5.3.1.4-4］<br>Validation report on Determination and confirmation of the “Cut-off” value for the hemidiaphragm assay (HDA-AB) | |

参考文献

1）Eisele KH, Fink K, Vey M, Taylor HV. Studies on the dissociation of botulinum neurotoxin type A complexes. Toxicon. 2011;57(4):555-65.

2）Eisele KH, Taylor HV. Dissociation of the 900kDa neurotoxin complex from C. botulinum under physiological conditions. Toxicon. 2008;51(1):10.

3）Draft Guidance for Industry, Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2009.

4）Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, Committee for Medicinal Products for Human Use. 2011.

5）Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, et al. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. J Immunol Methods. 2004 Jun;289(1-2):1-16.

6）Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. J Pharm Biomed Anal. 2008 Dec 15;48(5):1267-81.