サノフィ株式会社

efanesoctocog alfa

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.1 緒言

Total number of pages: 7

目　　次

2.6.1 緒言 1

目　　次 2

図　目　次 3

略号と用語の定義 4

1　　緒言 5

参 考 文 献 7

図　目　次

図 1 - BIVV001の分子構造 6

略号と用語の定義

a1、a2 及び a3:	FVIII の酸性領域 1、2 及び 3（FVIII acidic region1, 2 and 3）
Fc:	IgG1 の結晶化可能領域フラグメント（Fragment crystallizable region of IgG1）
FcRn:	胎児型 Fc 受容体（Neonatal Fc receptor）
FVIII:	血液凝固第 VIII 因子（Factor VIII）
HemA:	血友病 A（Hemophilia A）
PK:	薬物動態（Pharmacokinetics）
rFVIII:	遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（Recombinant factor VIII）
VWF:	フォンヴィレブランド因子（von Willebrand factor）
XTEN ポリペプチド:	６つの天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド。XTEN は Amunix Pharmaceuticals Inc.の登録商標である。（Unstructured hydrophilic polypeptide, composed of repeating motifs of 6 natural amino acids (Gly, Ala, Pro, Glu, Ser, Thr or G,A,P,E,S,T). XTEN is a registered trademark of Amunix Pharmaceuticals Inc.）

1　緒言

血友病 A（HemA）（先天性血液凝固第 VIII 因子欠損）患者の治療においては、現在利用可能な製剤よりも消失半減期が延長した遺伝子組換え第 VIII 因子（rFVIII）製剤に対するアンメットメディカルニーズが依然として存在している。高レベルの FVIII 活性が持続することにより出血及び関節障害に対する保護効果が増加する可能性があり、投与頻度の減少により投与の負担が軽減されるからである。

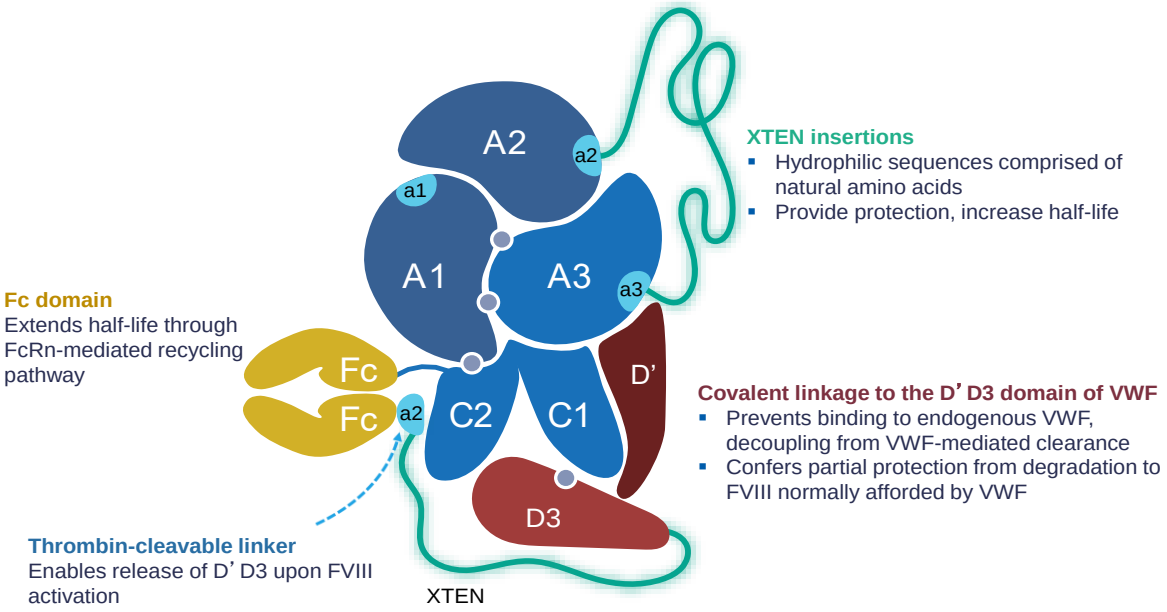
天然型 FVIII は、循環血中でフォンヴィレブランド因子（VWF）と不活性な複合体を形成しており、それによって FVIII 分子が安定化され、FVIII と血液凝固経路成分との意図しない結合が抑制され、FVIII のタンパク質分解も抑制される。しかし、内因性 VWF と結合することによって、FVIII は VWF を介して除去されるようになる。現在市販されているいずれの半減期延長型 rFVIII 製剤も VWF と相互作用するため、延長されたとはいえ循環血漿中の消失半減期は極めて類似しており、内因性 VWF の半減期によって規定される消失半減期延長の上限値（約 15～18 時間）に一致している(1)。

Efanesoctocog alfa（開発コード：BIVV001；以下、本薬）は、遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子 Fc－von Willebrand 因子－XTEN 融合タンパク質（rFVIIIFc-VWF-XTEN）である。

本薬は、FVIII と VWF との相互作用による消失半減期の制限を克服するようにデザインされた最初の FVIII 補充療法薬である。本薬は、1 本鎖の B ドメイン除去ヒト FVIII が VWF の D′D3 ドメインに結合し、ヒト免疫グロブリン G1 の Fc ドメイン及び 2 つの XTEN ポリペプチド（XTEN ポリペプチドは、6 つの天然アミノ酸［グリシン、アラニン、プロリン、セリン、グルタミン酸、トレオニン、すなわち G、A、P、E、S、T］からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド）が挿入された新規の遺伝子組換え融合タンパク質である。

本薬では、天然型 FVIII の B ドメインの大部分が XTEN ポリペプチドに置換されている。1 つ目の XTEN ポリペプチドは、FVIII の B ドメインを置換するように FVIII N745～E1649 に挿入されている。2 つ目の XTEN ポリペプチドは、D′D3 と Fc との間に挿入されている。FVIII の酸性領域 2（a2）のトロンビン切断部位が D′D3-XTEN と Fc との間に位置しており、トロンビンによる活性化時には、FVIII-Fc 融合タンパク質から D′D3-XTEN が分離される。本薬の各成分（Fc、VWF 及び XTEN ポリペプチド）は、血漿中 FVIII 分子の消失半減期が最大限に延長されるよう慎重にデザインされている（図 1）。

図 1 - BIVV001 の分子構造



略号：a1、a2 及び a3 = FVIII の酸性領域 1、2 及び 3、Fc = IgG1 の結晶化可能領域フラグメント、FcRn = 胎児型 Fc 受容体、FVIII = 血液凝固第 VIII 因子、VWF = von Willebrand 因子、XTEN ポリペプチド = 6 つの天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド

注：緑色の線 = XTEN ポリペプチド

本薬は、HemA 患者における出血エピソードの発現頻度の低減を目的とした定期補充療法薬並びに出血エピソードの管理及び周術期の出血の管理を目的とした用時補充療法薬として開発されている。

HemA を対象とした本薬の臨床開発及び製造販売承認をサポートするため、マウス、ラット及びサルを用いた本薬の広範な非臨床試験プログラムを実施した。非臨床試験プログラムは、*in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験、薬物動態（PK）試験及び毒性試験からなる。薬理試験では、本薬の *in vitro* における血液凝固活性並びに HemA マウスの予防的モデル及び急性出血モデルにおける *in vivo* 効果を評価した。これらの試験で本薬を rFVIII 製剤と並べて比較した。HemA マウス、ラット及びサルを用いた PK 試験では、本薬の消失半減期を含む体内動態を評価し、VWF に非依存的であることを確認した。ラット及びサルを用いた毒性試験では、本薬を臨床試験及び製造販売承認申請で十分な安全域が得られる用量範囲（750 IU/kg/回まで）で反復投与したときの安全性及びトキシコキネティクスを評価した。

結論として、非臨床 Module に記載する十分な範囲の非臨床薬理、PK 及び毒性試験で本薬を広範に検討した。これらの試験結果から、HemA を対象とした本薬の臨床試験プログラムの実施が支持されるとともに、その製造販売承認も支持される。

参 考 文 献

1. Pipe SW, Montgomery RR, Pratt KP, Lenting PJ, Lillicrap D. Life in the shadow of a dominant partner: the FVIII-VWF association and its clinical implications for hemophilia A. Blood. 2016 20;128(16):2007–16.

サノフィ株式会社

efanesoctocog alfa

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.2 薬理試験の概要文

Total number of pages: 32

目　　次

2.6.2 薬理試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

図　目　次 5

略号と用語の定義 6

1　　まとめ 8

2　　効力を裏付ける試験 11

2.1　　*In vitro*試験 11

2.1.1　　*In vitro*活性測定 12

2.1.1.1　aPTT凝固一段法 13

2.1.1.2　二段階発色合成基質法 14

2.1.1.3　効力の決定を目的としたアッセイ 15

2.1.2　　止血能／血液凝固促進活性 16

2.1.3　　トロンビンによる活性化速度 20

2.2　　*In vivo*試験 21

2.2.1　　尾切断出血モデルにおける急性効果 22

2.2.2　　尾静脈切断モデルにおける出血予防効果 24

3　　副次的薬理試験 28

4　　安全性薬理試験 29

5　　薬力学的薬物相互作用試験 30

6 考察及び結論 31

参 考 文 献 32

表　目　次

表 1 - 本薬の非臨床*in vitro*薬理試験の要約 11

表 2 - 凝固一段法による本薬の活性測定結果 （3種類のaPTT試薬で測定、WHO第8次国際標準品との比較） 14

表 3 - 二段階発色合成基質法における本薬の活性測定結果 （4種類のキットで測定、WHO第8次国際標準品との比較） 15

表 4 - 非臨床*in vivo*薬理試験の要約 22

図　目　次

図 1 - トロンビンによる本薬の活性化で生じる様々な断片 12

図 2 - HemAドナーの全血を用いた本薬及びアドベイトの全血凝固線溶分析 17

図 3 - HemAドナー血漿における本薬及びアドベイトのトロンビン生成プロファイル 18

図 4 - HemAドナー血漿における本薬及びアドベイトのフィブリン生成／重合化プロファイル 20

図 5 - 本薬及びBDD FVIIIのトロンビンによる分解速度の解析 21

図 6 - HemAマウスの尾切断後の失血量 23

図 7 - HemAマウス尾静脈切断モデルにおける予防的投与の概略図 25

図 8 - HemAマウスの尾静脈切断後の生存率（上図）及び再出血率（下図） 26

図 9 - 本薬及びアドベイトの生存保護作用（ED_{50}） 27

略号と用語の定義

a1、a2 及び a3:	FVIII の酸性領域 1、2 及び 3（FVIII acidic region 1, 2 and 3）
アドベイト:	武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（Full length recombinant factor VIII molecule from Takeda Pharmaceutical）
aPTT:	活性化部分トロンボプラスチン時間（Activated partial thromboplastin time）
AU:	任意単位（Arbitrary unit）
BD:	血液ドナー（Blood donor）
BDD:	B ドメイン除去（B domain deleted）
BDD FVIII:	B ドメイン除去遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（B domain deleted recombinant factor VIII）
CAP:	米国病理学会（College of American Pathologists）
CNS:	中枢神経系（Central nervous systems）
CT:	凝固時間（Clotting time）
DS:	原薬（Drug substance）
ED_{50}:	50%有効用量（Half maximal effective dose）
EHL:	半減期延長型（Extended half-life）
ETP:	内因性トロンビン生成能（Endogenous thrombin potential）
Fc:	IgG1 の結晶化可能領域フラグメント（Fragment crystallizable region of IgG1）
FDA	米国食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration ）
FIXa:	活性化血液凝固第 IX 因子（Activated factor IX）
FVIII:	血液凝固第 VIII 因子（Factor VIII）
FVIIIa:	活性化血液凝固第 VIII 因子（Activated factor VIII）
FX:	血液凝固第 X 因子（Factor X）
FXa:	活性化血液凝固第 X 因子（Activated factor X）
GLP:	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good laboratory practice）
GMP:	医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（Good manufacturing practice）
HemA:	血友病 A（Hemophilia A）
hFVIII:	ヒト血液凝固第 VIII 因子（Human factor VIII）
ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use）
IgG1:	免疫グロブリン G1（Immunoglobulin G1）
IS:	国際標準品（International standard）

IU:	国際単位（International unit）
IV:	静脈内（Intravenous）
mins:	分（Minutes）
mOD:	ミリ光学密度（Milli optical density）
PD:	薬力学（Pharmacodynamics）
PK:	薬物動態（Pharmacokinetics）
pmol:	ピコモル（Picomole）
rFVIII:	遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（Recombinant factor VIII）
rFVIIIFc:	BDD 血液凝固第 VIII 因子及び Fc からなる遺伝子組換え融合タンパク質（Recombinant fusion protein comprising a BDD factor VIII and an Fc）
rFVIIIFc-VWF-XTEN:	遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子 Fc－von Willebrand 因子－XTEN 融合タンパク質（Recombinant coagulation factor VIII Fc-von Willebrand factor-XTEN fusion protein）
ROTEM:	全血凝固線溶分析（Rotational thromboelastography）
SD:	標準偏差（Standard deviation）
SDS-PAGE:	ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動（Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis）
TGA:	トロンビン生成アッセイ（Thrombin generation assay）
TVT:	尾静脈切断（Tail vein transection）
VWF:	フォンヴィレブランド因子（von Willebrand factor）
WHO:	世界保健機関（World health organization）
XTEN ポリペプチド:	6 つの天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド。XTEN は Amunix Pharmaceuticals Inc.の登録商標である。（Unstructured hydrophilic polypeptide, composed of repeating motifs of 6 natural amino acids (Gly, Ala, Pro, Glu, Ser, Thr or G,A,P,E,S,T). XTEN is registered trademark of Amunix Pharmaceuticals Inc.）

1　まとめ

Efanesoctocog alfa（開発コード：BIVV001）は、遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子 Fc（rFVIIIFc）、フォンヴィレブランド因子（VWF）及び XTEN の融合タンパク質（rFVIIIFc-VWF-XTEN）である。本文書を通して、efanesoctocog alfa を本薬と記載する。本提出資料及び裏付けとなる試験報告書では、本薬を BIIB073 とも称する。

本薬は、1 本鎖の B ドメイン除去（BDD）ヒト FVIII（hFVIII）が VWF の FVIII 結合 D'D3 ドメイン並びにヒト免疫グロブリン G1（IgG1）の Fc ドメインと共有結合した新規の遺伝子組換え融合タンパク質である。本薬には 2 つの XTEN ポリペプチドが挿入されており、それによって薬物動態（PK）プロファイルが改善されている。本薬の 1 つ目の XTEN ポリペプチドは、天然型 FVIII B ドメインの FVIII N745～E1649 のアミノ酸残基との置換により挿入されており、2 つ目の XTEN ポリペプチドは、D'D3 ドメインと Fc との間に挿入されている(1)。XTEN ポリペプチドは、6 つの天然アミノ酸（G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチドであり、これを挿入した融合タンパク質のクリアランスを減少させることにより消失半減期を延長させる（すなわち、曝露を持続させる）ことが知られている。

本薬は、FVIII の C1-C2 ドメインと融合タンパク質の VWF-D'D3 ドメインとの間の分子内会合による FVIII-VWF 相互作用によって規定される消失半減期の制限を克服するために、内因性 VWF には結合しないようデザインされた最初の遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）製剤である。Meso Scale Discovery ベースの試験において、本薬は、溶液中の遊離型 VWF-D'D3 ドメイン（完全長 VWF のサロゲート）に結合しないことが示されている（Module 3.2.S.1.3）。さらに、PK 試験において、本薬は内因性 VWF に結合しないことが示された（Module [2.6.4] 薬物動態試験の概要文及び Module 2.6.5 薬物動態試験概要表 [表 2.6.5.3]、R-BV001-11 試験参照）。また本薬の D'D3-XTEN と Fc との間には、FVIII のトロンビン切断部位と同じ a2 が導入されており、トロンビンによる活性化時には、rFVIII-Fc 融合タンパク質から D'D3-XTEN が効率的に切り離される。また、天然型 FVIII B ドメインの大部分が XTEN ポリペプチドに置換されているが、XTEN ポリペプチドの両側に天然型 FVIII の B ドメインのトロンビン切断部位が配置されているため（N 末端側は a2、C 末端側は a3）、トロンビンによる活性化時には、融合タンパク質からもう一つの XTEN ポリペプチドも分離される。したがって、本薬の活性化では rFVIII と Fc の融合タンパク質 (2)(3) が生じる。

全ての非臨床薬理試験（Rsch-[redacted]-043 試験を除く）において、10 mmol/L L-ヒスチジン、250 mmol/L L-アルギニン塩酸塩、5%（w/v）精製白糖、5 mmol/L $CaCl_2$、0.05%ポリソルベート 80（pH 7）で調製した原薬（DS）（ロット[redacted]）を使用した。ロット[redacted]の物質は、臨床試験で使用した DS を代表するものである。Rsch-[redacted]-043 試験では研究グレードの原薬 rFVIIIFc-VWF-XTEN (　　分子A*　　)を使用しており、それについては2.2項で説明している。

＊新薬承認情報提供時に置換

本薬の非臨床薬理評価は主要な薬力学（PD）作用に焦点を当て、*in vitro* 試験及び非臨床動物種（血友病 A［HemA］マウス）において全身止血作用の回復効果の評価を行った。

これらの試験の目的は、急性出血を管理するための治療薬として、また、定期補充療法薬として用いる長期作用型血液凝固促進剤として本薬を評価することであった。これらの試験は、本薬の臨床で予定されている使用法をモデル化した。

PD 試験では、本薬の活性をアドベイト（武田薬品工業の完全長 rFVIII 製剤）と比較した。アドベイトは、広く使用されている rFVIII 製剤であり、血友病研究において広範な PK 及び有効性データが得られていることから、本薬の比較対照薬として選択した。

本薬の *in vitro* 薬理作用の評価には、以下の生化学アッセイを使用した。

- FVIII 欠乏血漿を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）に基づく凝固一段法による FVIII 活性（活性化剤として 3 種類の aPTT 試薬を使用）
- 二段階発色合成基質法（発色法）による FVIII 活性（4 種類の市販キットを使用）
- HemA 患者の全血を用いた全血凝固線溶分析（ROTEM）
- HemA 患者の血漿を用いたトロンビン生成アッセイ（TGA）
- HemA 患者の血漿を用いたフィブリン生成アッセイ
- ヒト α-トロンビンによる活性化

aPTT 凝固一段法及び二段階発色合成基質法（以下、発色法）の両方により、本薬の FVIII 活性を評価した。凝固一段法で得られた活性をもとに *in vitro* 血液凝固アッセイ（TGA、ROTEM、フィブリン生成）を実施した結果、本薬は rFVIII 製剤と同程度の血液凝固能を有することが示された。また、トロンビンによる本薬の活性化速度も rFVIII 製剤と同程度であった。以下に述べる *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果に基づくと、本薬の活性が最も良好に評価できたのは、aPTT 凝固一段法であった。したがって、FDA の助言に従い、本薬の効力は Actin FSL を活性化剤として用いる aPTT 凝固一段法で得られた値とした。

In vivo 薬理試験では、FVIII 欠損 HemA マウスを用いて本薬の HemA に対する FVIII 補充療法薬としての効果を評価した。試験結果を以下に示す。

- 本薬の効果はアドベイトよりも持続し、これは本薬の消失半減期が長いことと一致していた。
- *In vivo* 出血モデルでの急性出血の管理における本薬とアドベイトの効果は同程度であり、これは本薬とアドベイトの全血凝固活性が同程度であることに一致していた。
- マウスを用いた 2 つの試験から、本薬の *in vivo* 効果は、aPTT 凝固一段法で得られた活性と相関することが示された。

医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)及び S7A ガイドラインに従い、本薬の心血管系、呼吸系又は中枢神経系（CNS）に対する影響の有無を検討するための独立した安全性薬理試験は実施しなかっ

た。関連する安全性薬理評価項目は、カニクイザル及びラットを用いた医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用反復投与毒性試験の一環として評価した。安全性薬理評価項目において、本薬に関連する懸念は認められなかった。

要約すると、本薬を既承認の完全長 rFVIII 製剤アドベイトと比較したときの *in vivo* における血液凝固促進活性の持続は、消失半減期の延長と相関していた。*In vitro* における本薬の特性検討の結果は、*in vivo* における HemA 動物モデルの結果に一致していた。生化学アッセイ及び急性効果のモデルにおいて、本薬と rFVIII 製剤の作用は同程度であった。本薬の予防効果の持続時間は、rFVIII 製剤と比較して 3 倍長く、これは本薬の方が消失半減期が長く、血液凝固活性が持続することに一致していた。

2　効力を裏付ける試験

2.1　*In vitro* 試験

本薬はマウス、ラット及びサルを用いた PK 試験で消失半減期が長かった（Module [2.6.4]薬物動態試験の概要文参照）ことから、非臨床 PD 試験は、半減期延長型 rFVIII として本薬を評価するようデザインした。遺伝子組換え BDD FVIII を IgG1 Fc 及び VWF-D′D3 ドメインと融合させ、XTEN ポリペプチドを導入することにより、*in vivo* クリアランスが減少することが示されている。

精製タンパク質、全血又は血漿を用いた一連の生化学及び活性アッセイにおいて、本薬の *in vitro* 活性を完全長 rFVIII（アドベイト）又は社内で作製した BDD FVIII のいずれかと比較評価した。

In vitro 試験の目的は、本薬の共有結合的修飾による補因子機能の差の有無を検討することであった。具体的には、トロンビンの FVIII-Fc 融合タンパク質活性化作用による本薬の活性化速度、トロンビン生成アッセイ、ROTEM 及びフィブリン生成試験を行った（表 1 及び Module [2.6.3] 薬理試験概要表）。

表 1 - 本薬の非臨床 *in vitro* 薬理試験の要約

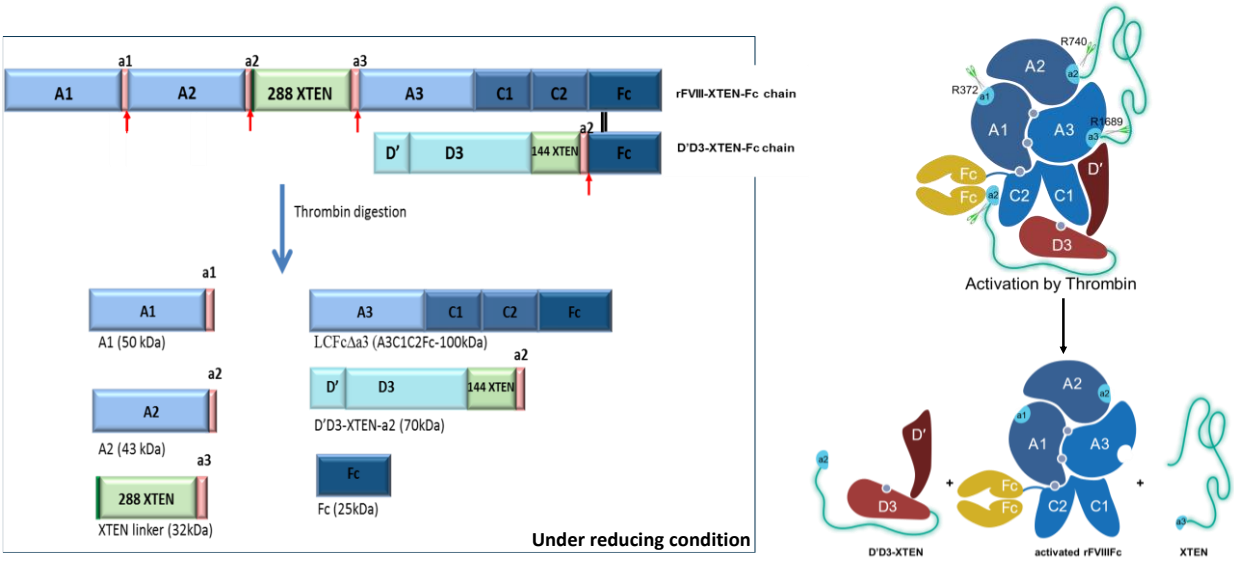
試験番号及び説明	試験系	主要な所見
R-BV001-03 aPTT 凝固一段法及び二段階発色合成基質法を用いた活性の評価	ヒト FVIII 欠乏血漿	発色法で得られた本薬とアドベイトの活性はモルベースで同程度であり、aPTT 凝固一段法で得られた本薬の比活性は、発色法で得られた値の 2 分の 1 未満であった。
R-BV001-04 TGA、ROTEM 及びフィブリン生成による本薬の血液凝固能の評価	ヒト HemA 患者の血漿又は全血	aPTT 凝固一段法で得られた本薬の効力を用いて測定した結果、本薬とアドベイトの全血凝固（ROTEM）、トロンビン生成及びフィブリン重合化作用は同程度であった。
R-BV001-07 トロンビンによる本薬及び BDD FVIII の活性化速度（SDS-PAGE による評価）	ヒト α トロンビン	本薬と社内で作製した BDD FVIII のトロンビンによる活性化プロファイルは同様であった。
R-BV001-10 トロンビンで消化された本薬の逆相液体クロマトグラフィー分析	ヒト α トロンビン	本薬の複数の GMP 適用バッチでトロンビンによる活性化プロファイルは同様であった。

略号：アドベイト = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、BDD FVIII = B ドメイン除去遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子、GMP = 医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準、ROTEM = 全血凝固線溶分析、SDS-PAGE = ドデシル硫酸ナトリウムーポリアクリルアミドゲル電気泳動、TGA = トロンビン生成アッセイ

2.1.1 *In vitro* 活性測定

本薬は 2 つのポリペプチド鎖からなる。すなわち 1）rFVIII-XTEN-Fc 及び 2）D′D3-XTEN-a2-Fc が、それぞれの Fc ドメイン間に存在するジスルフィド結合によって結合している（図 1）。本薬の FVIII には R1648 プロセシング部位がないため、重鎖及び軽鎖を含む 2 本鎖分子ではなく 1 本鎖 FVIII として分泌される。

図 1 - トロンビンによる本薬の活性化で生じる様々な断片



略号：a1、a2 及び a3 = FVIII の酸性領域 1、2 及び 3、Fc = IgG1 の結晶化可能領域フラグメント、rFVIIIFc = BDD 血液凝固第 VIII 因子及び Fc からなる遺伝子組換え融合タンパク質、XTEN ポリペプチド = 6 つの天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド

赤色矢印及びはさみはトロンビン切断部位を表す。トロンビンは FVIII を R372、R740 及び R1689（アミノ酸番号は天然の完全長 FVIII に基づく）の位置で切断する。本薬は D′D3-XTEN ポリペプチド内にもう 1 か所 R740 を有するため、トロンビンによる活性化時に FVIII-Fc 融合タンパク質から D′D3-XTEN が遊離される。

本薬を十分に機能させるためには、FVIII を VWF から分離させなければならないが、これにはトロンビンにより酸性領域 3（a3）ペプチドを切断する必要がある。rFVIIIFc の 1 本鎖アイソフォームは凝固一段法による比活性が低いことが過去に示されている。2 本鎖 FVIII の活性化にはトロンビンによる切断箇所が 1 か所のみ（R1689）でよいが、1 本鎖 FVIII が a3 を完全に分離するためにはトロンビンによる 2 か所の切断（R740 及び R1689）が必要である(4)。したがって、1 本鎖 FVIII の活性はこれら 2 か所での切断速度及び VWF からの遊離速度により決定されるが、それらの速度は試験系のトロンビン濃度及びテンナーゼ複合体会合前のトロンビンとのインキュベーション時間による影響を受ける。

FVIII 活性は、aPTT 凝固一段法又は発色法を用いて測定した。2 つのアッセイの主要な違いは、発色法には最初にトロンビンとのインキュベーションにより FVIII を活性化させて活性化 FVIII（FVIIIa）を生成させる段階が含まれていることである。FVIIIa は、その後、活性化血液凝固第 IX

因子（FIXa）の補因子として働き、血液凝固第 X 因子（FX）を活性化血液凝固第 X 因子（FXa）に変換させるため、FXa を発色性基質で検出できる。凝固一段法では、希釈した血漿検体を血液凝固活性化剤とともにインキュベートした後、$CaCl_2$ で処理して血液凝集反応を開始させ、フィブリン塊形成までの時間を測定する。しかし発色法とは異なり、凝固一段法には FVIIIa を生成するための独立したトロンビンによる活性化段階がない。したがって、トロンビンによる FVIII 分子の早期の活性化速度に軽度の差があるときの影響は、発色法よりも凝固一段法の方が大きいと考えられる。下記の 2 つの方法を用いて、本薬の活性をアドベイトと比較評価した。

2.1.1.1 aPTT 凝固一段法

aPTT 凝固一段法では、一般的な内因性血液凝固経路の活性が測定される。原理的には、本試験において人工の内在性経路誘導剤（aPTT 活性化剤）を使用したときのフィブリン塊形成までの時間を測定し、それはテンナーゼ複合体及びプロトロンビナーゼ複合体の形成並びにその後のフィブリン塊形成に左右される。FVIII は内在性経路の重要な補因子であることから、FVIII 活性を測定するために、FVIII に特異的な凝固一段法が広く使用されている。FVIII の凝固一段法では、FVIII 製剤の FVIII 欠乏血漿凝固活性回復能が定量される。本アッセイは、FVIII 補充療法製剤の投与を受けた患者の検体における FVIII 活性の測定に広く使用されており、臨床での PK 評価に使用するアッセイとして推奨されている。

FVIII の凝固一段法では、共通の FVIII 標準に対する測定値が、使用する aPTT 活性化剤によって異なる場合がある(5)。2012 年の米国病理学会（CAP）の調査に基づくと、米国において臨床血液凝固検査で実施された FVIII アッセイのうち、合計で 94%を占める 3 つの主要な aPTT 試薬の間における本薬（Lot [redacted]、毒性試験用ロット）の変動係数は約 28%であった（表 2）。

凝固一段法で得られた本薬のモル比活性は、比較対照薬のアドベイトよりも低く（R-BV001-03 試験、Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）（表 2）、FVIII 製剤で過去に報告された値（例；アドベイト：0.68～2.3 IU/pmol (6)、サノフィ社の BDD FVIII-Fc 融合タンパク質［イロクテイト／Elocta］：0.88～2.24 IU/pmol (7)、ファイザー社の BDD FVIII［ReFacto］：1.85～2.56 IU/pmol (8)）の範囲の最低値に近かった。この原因は、上述したように、本薬を活性化するにはトロンビンによる 2 段階の切断が必要であることから、凝固一段法では本薬による凝固時間が延長するためと考えられる(4)。本薬のそのほかの医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準（GMP）適用ロットは、Actin FSL を活性化剤として用いた凝固一段法において [redacted]～[redacted] IU/pmol のモル比活性を示した（Module 3.2.S.2.6 及び Module 3.2.S.4.4）。

表 2 - 凝固一段法による本薬の活性測定結果
（3 種類の aPTT 試薬で測定、WHO 第 8 次国際標準品との比較）

供給元	aPTT 試薬	活性化剤	リン脂質	本薬の比活性（IU/pmol）平均値 ± SD（n=3）	アドベイトの比活性[a]（IU/pmol）平均値 ± SD（n=3）
Siemens	Actin FSL	エラグ酸、0.1 mmol/L	大豆リン脂質及びウサギ脳セファリン	0.66 ± 0.01	1.29 ± 0.05
Instrumentation laboratory	SynthASil	コロイド状二酸化ケイ素	合成リン脂質	0.39 ± 0.01	1.15 ± 0.02
Diagnostica stago	PTT-A	二酸化ケイ素	ウサギ脳セファリン	0.80 ± 0.02	1.22 ± 0.02

略号：アドベイト = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、IU = 国際単位、pmol = ピコモル、SD = 標準偏差、WHO = 世界保健機関

a **様々なロットで報告されたアドベイトの活性は 0.8～2.24 IU/pmol であったことから、試薬によって本薬の測定値にみられた差は、FVIII 活性化時間が短く、トロンビン濃度（不明）が低かったことによって説明できると考えられる。**

2.1.1.2 二段階発色合成基質法

FVIII の発色法では、FVIII が FIXa による FX 活性化の補因子として働く能力が測定される。第 1 段階において、希釈血漿検体中 FVIII をトロンビンで活性化する。FIXa、FX、リン脂質及びカルシウムを添加すると、FVIIIa は FIXa の補因子として働き、FX が FXa に変換される。第 2 段階では、FXa により発色性基質が加水分解され、生じた物質（酵素により遊離された p-ニトロアニリン）の発色強度は FXa の量に直接比例するため、最初の検体における FVIII の量に比例する。したがって、アッセイの構成成分を組み合わせることにより、FVIII 活性を定量的に評価することができる。FVIII の発色法は、欧州医薬品庁により FVIII の効力決定の際に参照する方法として推奨されている。ただし、臨床検査において FVIII の発色法が凝固一段法よりも信頼性が高いことを示す証拠はない(9)。

発色法における本薬の活性を、4 種類の市販の発色法アッセイキット（Siemens 社の発色法キット、Hyphen Biomed 社の FVIII:C キット、Chromogenix 社の COATEST 及び COAMATIC）を用いて評価した。比較対照の FVIII 製剤としてアドベイトを使用し、FVIII 濃縮物の WHO 第 8 次国際標準品（IS）を用いて全てのアッセイをキャリブレートした（R-BV001-03 試験、Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]参照）（表 3）。

本薬及びアドベイトのモル比活性は、FVIII 製剤で過去に報告された値（例；アドベイト：0.68～2.3 IU/pmol (6)、イロクテイト／Elocta：0.88～2.24 IU/pmol (7)、ReFacto：1.85～2.56 IU/pmol (8)）の範囲内であった。本薬のそのほかの GMP 適用ロットは、Siemens 社の FVIII の発色法アッセイにおいて [redacted]～[redacted] IU/pmol のモル比活性を示した（Module 3.2.S.2.6 及び Module 3.2.S.4.4）。

したがって、発色法におけるモル比活性が同程度であったことから、本薬は一度活性化されると十分に機能し、発色法における比活性はほかの FVIII 分子と同程度であることが示された。

表 3 - 二段階発色合成基質法における本薬の活性測定結果
（4 種類のキットで測定、WHO 第 8 次国際標準品との比較）

供給元	方法	本薬の比活性（IU/pmol）平均値 ± SD（n=3）	アドベイトの比活性[a]（IU/pmol）平均値 ± SD（n=3）
Siemens	FVIII 発色法	1.50 ± 0.04	1.25 ± 0.11
Hyphen biomed	FVIII:C	1.75 ± 0.07	1.08 ± 0.08
Chromogenix	COATEST	1.76 ± 0.09	1.19 ± 0.02
Chromogenix	COAMATIC	1.91 ± 0.06	1.34 ± 0.06

略号：アドベイト = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、FVIII = 血液凝固第 VIII 因子、IU = 国際単位、pmol = ピコモル、SD = 標準偏差、WHO = 世界保健機関

a 4 種類の市販の発色法アッセイキットで差がみられたが、これは FVIII 活性化時間（約 3 分から 5 分の間で変動）又はトロンビン濃度（不明）の差によって説明できると考えられる。

2.1.1.3 効力の決定を目的としたアッセイ

FVIII 濃縮物の WHO 第 8 次 IS の平行性及び線形性が、3 種類の aPTT 試薬（標準曲線の範囲：0.125～1.5 IU/mL）及び発色法キット（標準曲線の範囲：3.125～200 mIU/mL）の全てで認められた。したがって、国際血栓止血学会学術標準化委員会による推奨事項(10)に基づくと、これらの試薬のいずれを使用したときも、原則として、本薬の活性測定値は、FVIII の国際単位（IU）で示すことができる。

アドベイトの比活性は、凝固一段法と発色法とで同程度の値が得られたが、本薬の比活性は、凝固一段法で得られた値が発色法の 2 分の 1 未満であった。凝固一段法と発色法の間の本薬のモル比活性の差は、本薬中の 1 本鎖 FVIII が VWF-D′D3 ドメインに共有結合している（2.1.1項）ため、活性化にトロンビンによる切断が 2 か所必要であること、又は XTEN ポリペプチド周囲のトロンビン切断及び／若しくは D′D3-XTEN の遊離にわずかな差があることにより説明できると考えられる。これらは試験系におけるトロンビン濃度及びテンナーゼ複合体会合前のトロンビンとのインキュベーション時間による影響を受けるため、凝固一段法では凝固時間が延長したと考えられる(1)(4)。

一方、発色法では、最初にトロンビンとのインキュベーションにより完全に XTEN ポリペプチド及び D′D3 部分を切断・遊離させた後、テンナーゼ複合体のほかの成分及び FXa 発色性基質とのインキュベーションを行うため、発色法で得られた活性は、概して活性化速度には依存しない。

FVIII 活性測定におけるこれらの知見並びに下記の *in vitro* 及び *in vivo* 試験結果に基づき、効力の決定には、Actin FSL を活性化剤として用いる aPTT 凝固一段法を選択した。凝固一段法の活性に基

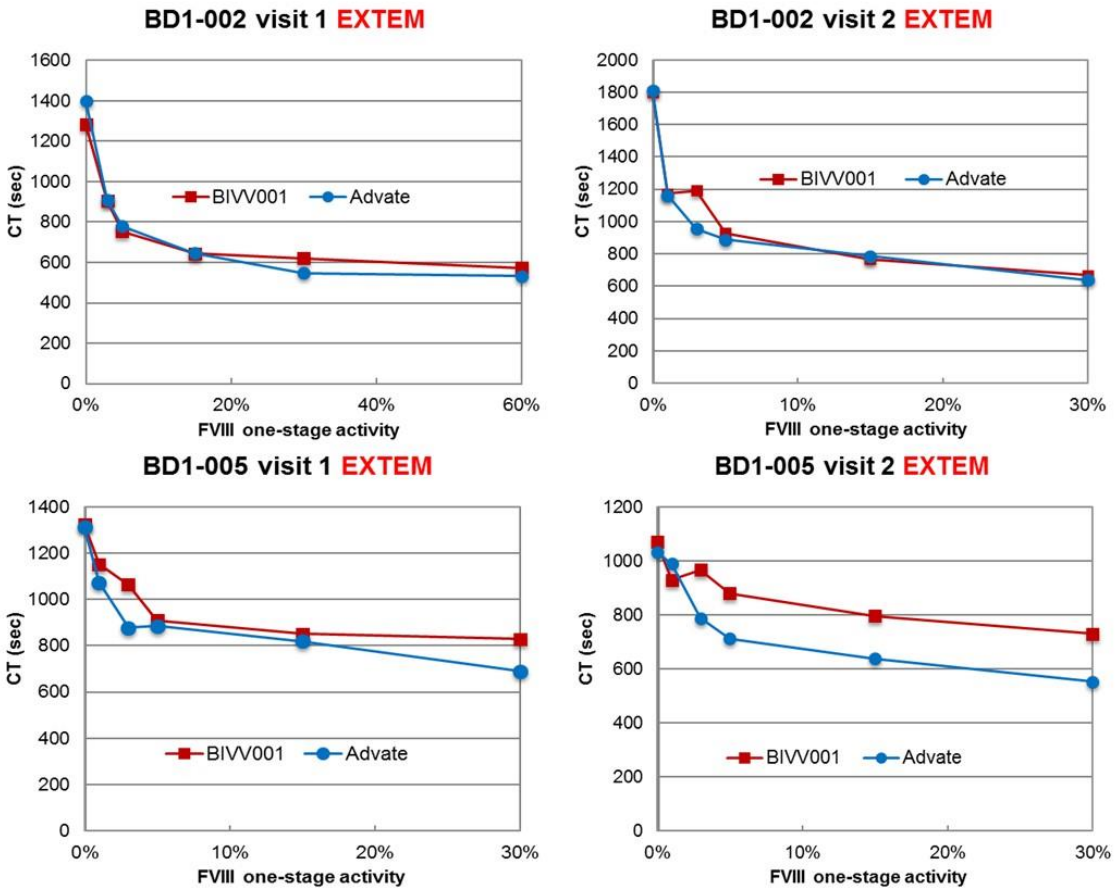
づいて本薬を処理したとき、*in vitro* 試験における血液凝固能はアドベイトと同程度であり（2.1.2項）、HemA マウス出血モデルを用いて *in vivo* での有効性を比較評価したときもアドベイトと同程度であった（2.2項）。したがって、本薬の凝固一段法での活性は、*in vivo* での活性を反映するものである。

2.1.2 止血能／血液凝固促進活性

本薬の止血能を評価するため、全血凝固アッセイ（ROTEM）、トロンビン生成アッセイ（TGA）及びフィブリン生成アッセイで本薬とアドベイトとを比較した。

ヒトの出血に組織因子が関与していることから、ROTEM では EXTEM アッセイ（組織因子による活性化）を使用した。R-BV001-04 試験（Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）では、HemA を有する 2 名の血液ドナー（BD；BD1-002 及び BD1-005）から、各ドナーとも 2 回の来院で採取した全血を ROTEM に使用した。全血に本薬及びアドベイトの漸増量（凝固一段法に基づき FVIII 活性 0～30%又は 60%まで）を添加すると、いずれも凝固時間を短縮させた（図 2）。これら 2 つの FVIII 分子を同じ FVIII 活性で添加したところ、被験者間及び被験者内でばらつきがみられたものの、類似した全血凝固プロファイルが認められた（図 2）。患者 BD1-005 は 2 回の来院でばらつきがみられたが、その原因は不明であり、TGA 及びフィブリン生成アッセイではこのようなばらつきは認められなかった（図 3、図 4）。

図 2 - HemA ドナーの全血を用いた本薬及びアドベイトの全血凝固線溶分析



略号： Advate = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（アドベイト）、BD = 血液ドナー、CT = 凝固時間、HemA = 血友病 A、FVIII = 血液凝固第 VIII 因子、sec = 秒

これらの HemA ドナーの血液から調製した血漿を用いて、TGA におけるトロンビン生成能の測定及びフィブリン生成アッセイを行うことにより、本薬の血液凝固促進活性の評価も行った（R-BV001-04 試験、Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）。

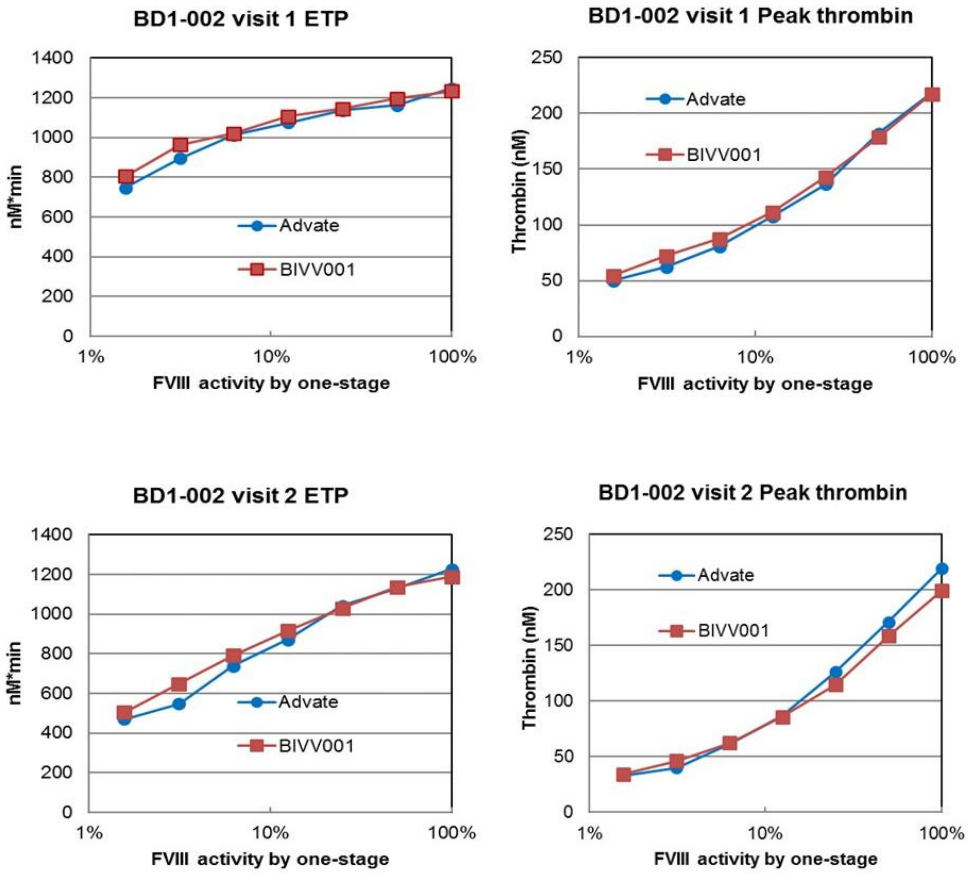
組織因子誘発 TGA において、本薬及びアドベイトは測定した活性範囲（0～100%）で明らかな活性-反応関係を示し、これらの薬物のトロンビン生成パラメータは同程度であった。Actin FSL を活性化剤として用いる凝固一段法で得られた活性を使用したとき、いずれのドナーにおいても、本薬とアドベイトによるトロンビンの最高濃度及び内因性トロンビン生成能（ETP）は同程度であった（図 3）。

フィブリン生成アッセイ（活性範囲：0～100%）において、フィブリン重合速度を測定することにより、フィブリン線維形成速度を評価した。重合速度は血漿濁度の経時的変化により測定し、凝固一段法のような従来の血液凝固アッセイで一般的に測定されるゲル化点を超えて長期間測定した。フィブリン重合速度はトロンビン生成量に直接相関し、フィブリン塊の最終的な 3 次元ネットワーク構造

に影響を及ぼす。したがって、フィブリン形成速度及び最終的なネットワーク構造の評価によりトロンビン生成を超える更なる知見が得られる（R-BV001-04 試験、Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）。本アッセイにおいて、本薬及びアドベイトはいずれも同程度かつ用量依存的にフィブリン形成及び重合化速度を増加させた（図 4）。

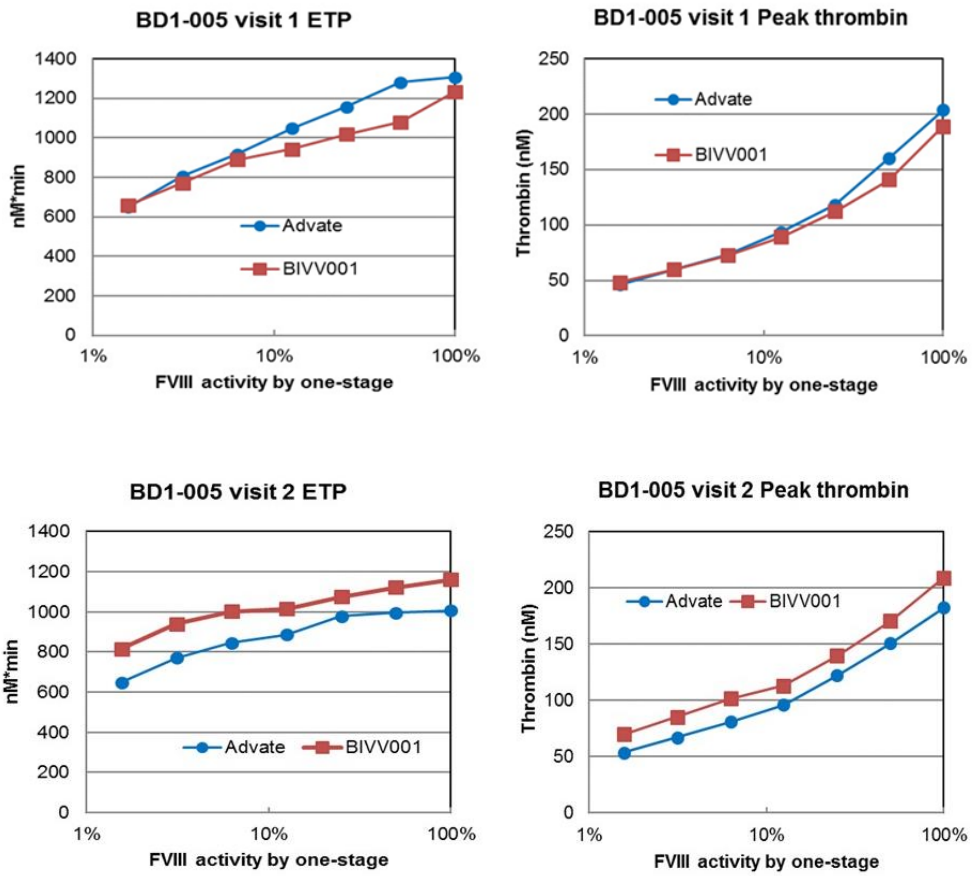
図 3 - HemA ドナー血漿における本薬及びアドベイトのトロンビン生成プロファイル

被験者 BD1-002



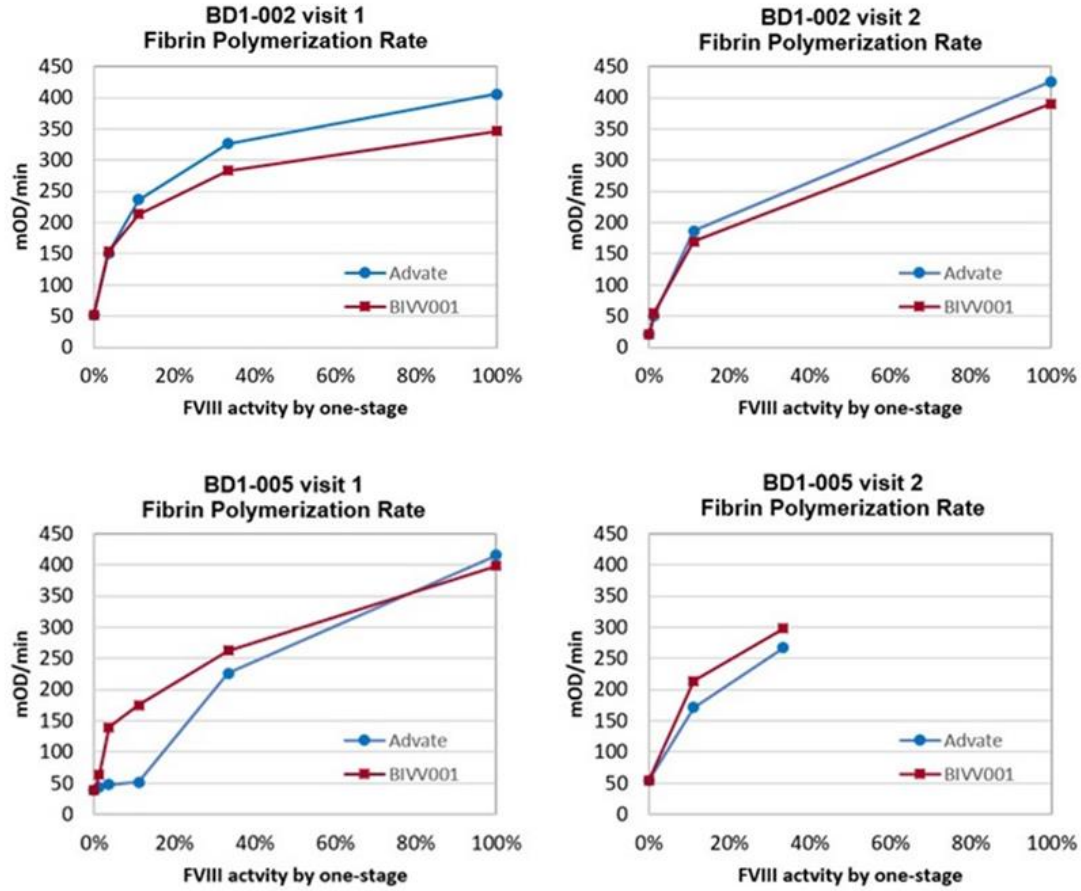
略号：Advate = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（アドベイト）、BD = 血液ドナー、ETP = 内因性トロンビン生成能、HemA = 血友病 A、FVIII = 血液凝固第 VIII 因子、nM = nmol/L

被験者 BD1-005



略号：Advate = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（アドベイト）、BD = 血液ドナー、ETP = 内因性トロンビン生成能、FVIII = 血液凝固第 VIII 因子、nM = nmol/L

図 4 - HemA ドナー血漿における本薬及びアドベイトのフィブリン生成／重合化プロファイル

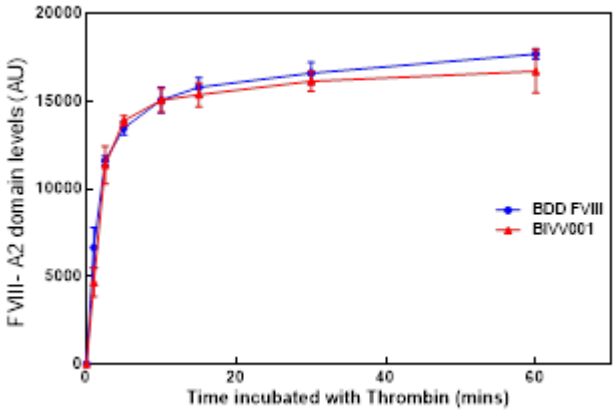


略号：アドベイト = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、BD = 血液ドナー、FVIII = 血液凝固第 VIII 因子、HemA = 血友病 A、mOD = ミリ光学密度
注：BD1-005（visit 2）は、血漿が不十分であったため、完全な濃度曲線が得られなかった。

2.1.3　トロンビンによる活性化速度

本薬の特性を更に評価するため、トロンビンによる活性化速度を測定する SDS-PAGE ベースのアッセイを実施し、本薬の活性化速度を社内で作製した BDD-FVIII と比較した。活性化速度は、生成した FVIII A2 ドメインのバンド強度を測定し、時間の関数として表すことにより求めた。全体として、トロンビンによる 2 つの分子の動態は同様であった（図 5）。なお、1 分の時点では、本薬のトロンビンによる活性化の程度が BDD FVIII よりもわずかに小さかったが、その差は統計学的に有意なものではなかった。このようなトロンビンによる活性化の程度の早期におけるわずかな低下は、凝固一段法と発色法との差により更に説明することができる（R-BV001-07 試験；Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）。本薬の複数の早期 GMP バッチでもトロンビンによる分解プロファイルの比較を行い、品質を検査した。複数のバッチでトロンビンによる分解プロファイルは同程度であった（R-BV001-10 試験；Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]、及び Module 3.2.S.1.3）。

図 5 - 本薬及び BDD FVIII のトロンビンによる分解速度の解析



略号：AU = 任意単位、BDD FVIII = B ドメイン除去遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子、mins = 分

要約

要約すると、aPTT 凝固一段法で得られた本薬の比活性は、発色法で得られた値の 2 分の 1 未満であった。この活性の差が生じた原因は、本薬の活性化には 2 か所のトロンビン切断が必要であること又は XTEN ポリペプチド周囲のトロンビン切断及び D′D3-XTEN の遊離にわずかな差があることから、本薬の活性化早期段階にわずかな差が生じた結果、凝固一段法の方が凝固時間が長くなったためと考えられる。

In vitro 血液凝固アッセイ（TGA、ROTEM、フィブリン生成及びトロンビンによる活性化）の結果から、Actin FSL（2012 年の CAP の調査に基づくと、2 番目によく使用されている aPTT 試薬）を活性化剤として用いる凝固一段法で得られた活性で検討したとき、本薬のトロンビンによる活性化速度及び血液凝固能はアドベイトと同程度であることが示された。

したがって、これらの *in vitro* 試験に基づくと、aPTT 凝固一段法は本薬の効力を設定するのに適している。

2.2 *In vivo* 試験

マウス HemA モデル（HemA マウス）は、非臨床試験において HemA 治療薬の止血能の評価に使用される最も一般的なモデルである(11)。FVIII 欠損 HemA マウスは、FVIII 活性が正常値の 1%未満であり、HemA 患者に類似した凝固時間の延長などの HemA の主要な特徴を再現している。マウスの FVIII タンパク質は hFVIII と約 74%一致しており、凝固経路の特性は高度に保存されていることから、HemA マウスに hFVIII を投与すると血液凝固能が回復する。したがって、本 HemA マウスは FVIII 補充療法の検討に使用できる優れたモデルである。

HemA マウスの 2 つの出血モデル（急性効果を評価する尾切断出血モデル及び予防効果を評価する尾静脈切断［TVT］モデル）を用いて本薬を評価した（表 4 及び Module [2.6.3] 薬理試験概要表）。

TVT 試験では、臨床試験で使用される本薬の原薬（DS）の代表的なものを用いた。尾切断試験では、研究用の安定細胞株プールから得られた研究グレードの原薬 rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）を用いており、この分子には、最終的な DS と比較して、[redacted]部位に[redacted]つの[redacted]が含まれていた。これら[redacted]つの[redacted]は本薬の PK 及び PD へ影響しない（Rsch-[redacted]-043 試験；Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1] 参照）。

表 4 - 非臨床 *in vivo* 薬理試験の要約

試験番号及び表題	動物種	用量 （使用した物質）	主要な所見
Rsch-[redacted]-043 尾切断出血モデルにおける rFVIIIFc-VWF-XTEN[a]とアドベイトとの急性効果の比較	HemA マウス又は C57BL/6	rFVIIIFc-VWF-XTEN[a]： 37.5、75 又は 150 IU/kg（aPTT 凝固一段法） アドベイト：37.5、75 又は 150 IU/kg	HemA マウスに rFVIIIFc-VWF-XTEN 及びアドベイトを 3 つのいずれの用量で投与したときも、溶媒対照と比較して、急性出血に対する予防効果及び失血量の有意な減少が認められた。 rFVIIIFc-VWF-XTEN とアドベイトの急性効果は同程度かつ用量依存的であった。
R-BV001-05 TVT モデルにおける BIVV001 とアドベイトの予防効果の比較	HemA マウス	本薬：1.5、5、15、50 又は 100 IU/kg（aPTT 凝固一段法） アドベイト：1.5、5、15、50 又は 100 IU/kg	本薬を TVT の 72 時間前に投与したときと、アドベイトを TVT の 24 時間前に投与したときとで、生存率及び再出血率は同程度であった。 本薬の予防効果の持続時間は、アドベイトの 3 倍であった。

略号：アドベイト = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、HemA = 血友病 A、IU = 国際単位、rFVIIIFc-VWF-XTEN = 遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子 Fc－von Willebrand 因子－XTEN 融合タンパク質、TVT = 尾静脈切断、XTEN ポリペプチド = 6 種類の天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド

a **研究グレード原薬（rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　））**

2.2.1 尾切断出血モデルにおける急性効果

広く使用されている FVIII 欠損 HemA マウス尾切断出血モデル(3)(12)において、rFVIIIFc-VWF-XTEN（本薬の研究グレード原薬 rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　））の急性効果を評価し、アドベイトと比較した（Rsch-[redacted]-043 試験；Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）。尾切断出血モデルは、マウスの尾の先端を切断することによる動脈及び静脈の出血モデルであり、血友病患者の手術又は外傷時の重度の出血事象を模倣したものである。尾の出血事象を誘発したときの失血量の減少を測定することにより、血液凝固因子補充療法の効果を定量的に評価することができる。静脈内（IV）投与 5

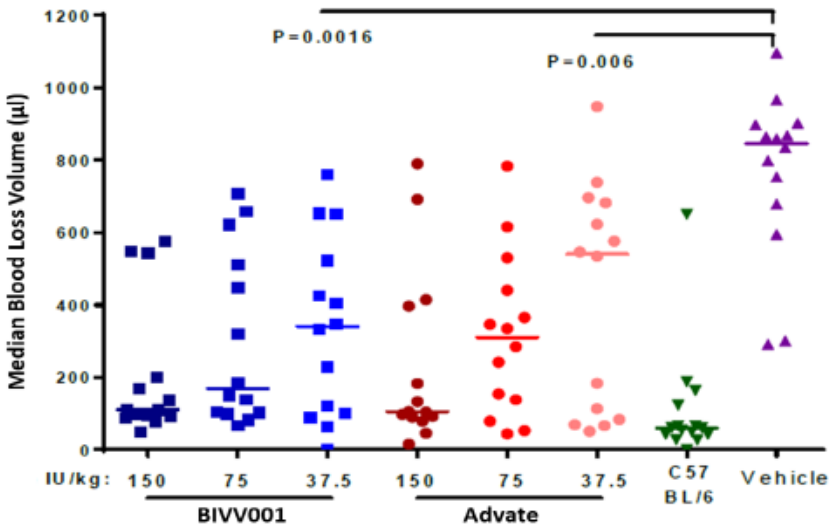
＊新薬承認情報提供時に置換

分後（被験物質の IV 投与後の均一な分布に必要な時間）という早期に尾切断を行うことが可能であるため、本モデルは医薬品候補品の急性止血能を評価するのに最も適している。

これらの試験において、rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）の効力は、Actin FSL を活性化剤として用いる凝固一段法で得られた値を使用した。

HemA マウスに rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）又はアドベイトを 37.5、75 又は 150 IU/kg IV の用量で単回投与した。溶媒を投与した HemA マウスを陰性対照群として使用した（薬物投与群及び溶媒群について 1 群当たり N=14）。正常な C57BL/6 マウスを、ベースライン失血量を測定するための陽性対照として使用した。投与 5 分後に尾を切断し、その後 30 分間の失血量を測定した。失血量は採取した血液の重量測定により評価し、出血が予防された HemA マウスの比率を算出した。失血量が 0.175 mL（陽性対照 C57BL/6 マウスにおける失血量の平均値 + 2 SD［標準偏差］）以下の場合、その個体は出血が予防されたと判定した。rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）、アドベイト又は溶媒対照のいずれかを投与した HemA マウス及び正常な C57BL/6 マウスの失血量を図 6に要約する。

図 6 - HemA マウスの尾切断後の失血量



略号：アドベイト（Advate）= 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、BIVV001 = rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）（研究グレード原薬）、HemA = 血友病 A、IU = 国際単位
（薬物投与群及び溶媒群について 1 群当たり n=14）

rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）及びアドベイトのいずれも、溶媒対照と比較して、出血が予防された HemA マウスの比率を有意に増加させた。150 IU/kg の用量では、rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）投与時の出血予防率は 73%、失血量中央値は 0.111 mL であり、アドベイト投与時の出血予防率は 67%、失血量中央値は 0.105 mL であった。75 IU/kg の用量では、rFVIIIFc-VWF-XTEN（　　分子A*　　）投与時の出血予防率は 53%、失血量中央値は 0.169 mL であり、アドベイ

＊新薬承認情報提供時に置換

ト投与時の出血予防率は 40%、失血量中央値は 0.310 mL であった。37.5 IU/kg の用量では、rFVIIIFc-VWF-XTEN (分子A*) 及びアドベイトのいずれの投与時も出血予防率は 40%であり、失血量中央値は rFVIIIFc-VWF-XTEN (分子A*) 投与時が 0.341 mL、アドベイト投与時が 0.541 mL であった。溶媒対照群では、失血量中央値が 0.847 mL であり、出血が予防されたマウスは認められなかった。

rFVIIIFc-VWF-XTEN (分子A*) 及びアドベイトでは 3 つの用量のいずれにおいても、溶媒対照と比較して失血量の有意な減少が認められた（$p \leq 0.05$、ノンパラメトリック、Kolmogorov-Smirnov t 検定）。一方、rFVIIIFc-VWF-XTEN (分子A*) とアドベイトとを同じ用量で比較したとき、失血量に有意差は認められなかった（$p = 0.33$）。

全体として、検討した用量範囲（37.5～150 IU/kg）において、rFVIIIFc-VWF-XTEN (分子A*) 及びアドベイトは失血量及び出血予防率のいずれについても用量依存的な同程度の *in vivo* 急性効果を示した。

本試験で使用した研究グレード原薬（rFVIIIFc-VWF-XTEN (分子A*)）の効力は、Actin FSL を活性化剤として用いる aPTT 凝固一段法で決定されたものであることを考慮すると、アドベイトと本薬の研究グレード原薬で同程度の効果が得られたことから、凝固一段法における本薬の活性は *in vivo* 効果を的確に反映するものであることが示された。

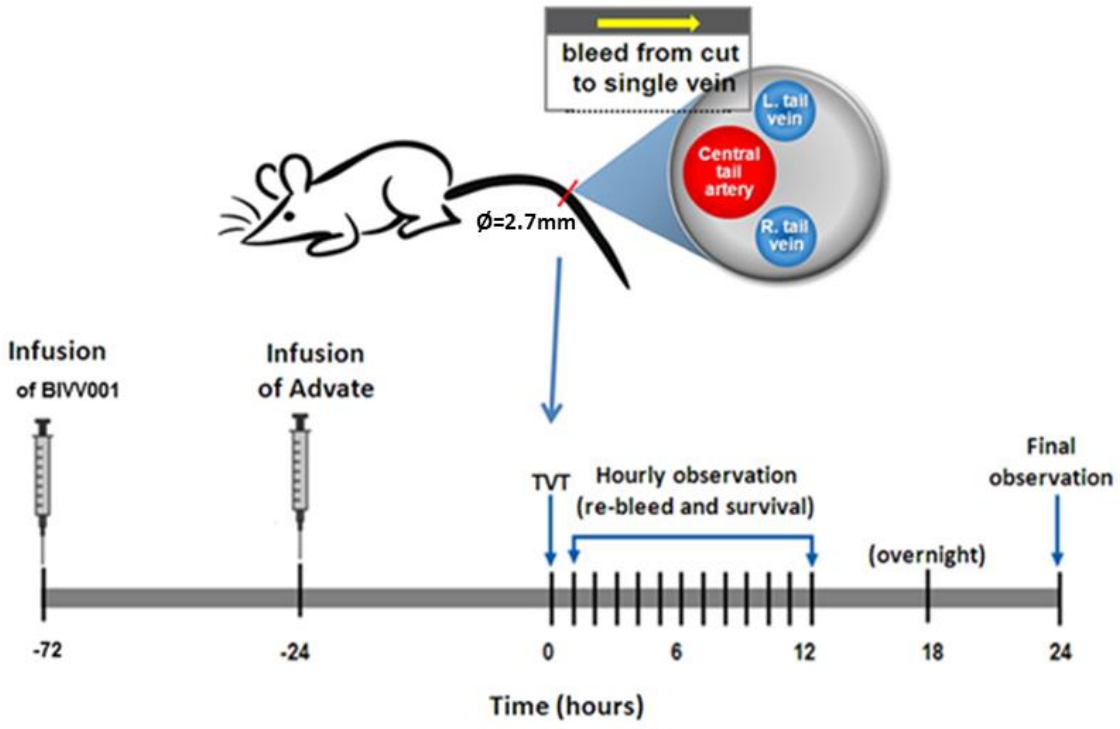
これらのデータから、尾切断による重度の急性出血に対する 50%有効用量（ED_{50}）は、本薬で 80 IU/kg、アドベイトで 105 IU/kg と算出された（Rsch-[redacted]-043 試験；Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）。

2.2.2 尾静脈切断モデルにおける出血予防効果

HemA マウス TVT モデルは、重症 HemA 患者における静脈出血の特徴を模倣したものであり、FVIII 補充療法による出血予防効果の定量的評価に使用することが可能である(3)(12)。本モデルにおける投与の概略図を図 7 に示す。

＊新薬承認情報提供時に置換

図 7 - HemA マウス尾静脈切断モデルにおける予防的投与の概略図



略号：Advate = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、HemA = 血友病 A、TVT = 尾静脈切断

本モデルを用いて、本薬の長い消失半減期が *in vivo* における長期の予防効果につながるか否かを評価した。HemA マウスでアドベイトと比較して消失半減期が 3 倍長い（Module [2.6.4] 薬物動態試験の概要文）ことにより、アドベイトよりも 3 倍長い予防効果が得られるか否かを評価するため、本薬を TVT の 72 時間前に、アドベイトを TVT の 24 時間前に投与して、2 つの分子の出血及び死亡予防能を比較した（R-BV001-05 試験；Module 2.6.3 [表 2.6.3.2.1]）。

マウスに本薬又はアドベイトを、Actin FSL を活性化剤として用いる凝固一段法の結果に基づき、5 用量（100、50、15、5 及び 1.5 IU/kg）のいずれかで単回 IV 投与した。この 1.5～100 IU/kg の用量範囲により、TVT モデルでみられる可能性のある予防効果の全ての範囲（すなわち 0～100%の予防）がカバーされる。TVT 後 24 時間にわたりマウスを観察し、生死及び初回血栓形成後の再出血についてスコア化した。

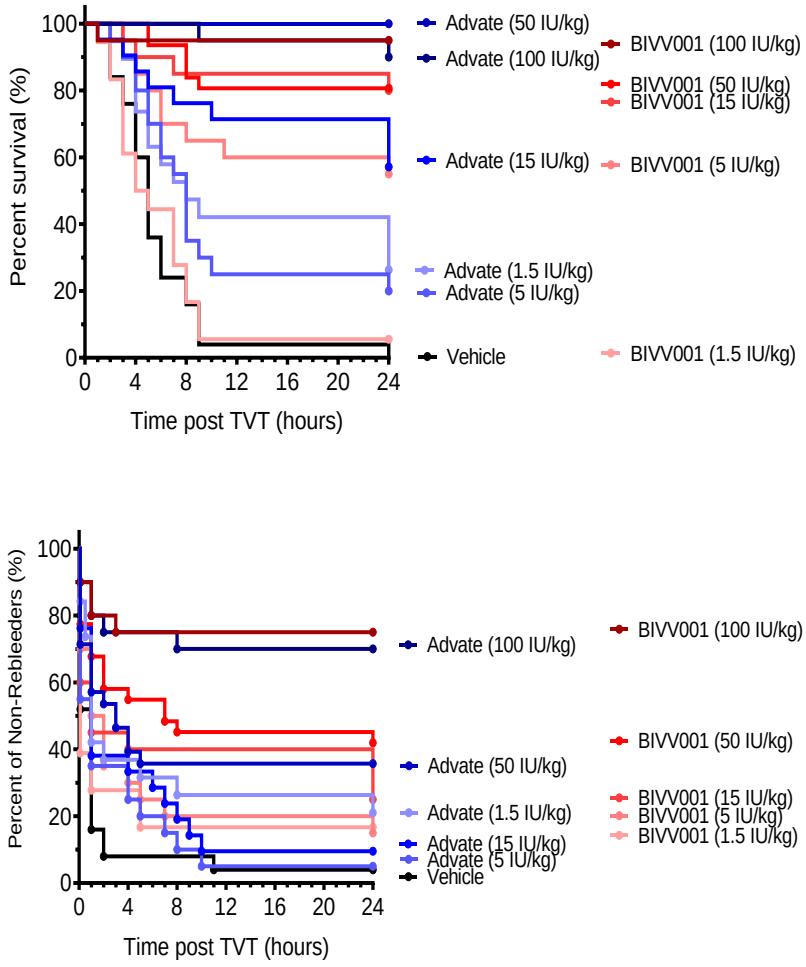
その結果、本薬の 1.5 IU/kg を除く本薬及びアドベイトのいずれの用量においても、溶媒投与と比較して、TVT 後の生存率が有意に高かった（$p < 0.05$）（図 8）。同じ用量間で生存率を直接比較したとき、100 及び 15 IU/kg の用量では有意差が認められなかったが、5 IU/kg の用量では本薬投与時の方がアドベイト投与時よりも生存率がわずかに高かった（$p = 0.03$）。50 及び 1.5 IU/kg の用量では、アドベイト投与時の方が生存率がわずかに高かった（いずれも $p = 0.02$）。しかし、生存に対する

ED_{50}を算出するためにデータをフィッティングさせたところ（図 9）、アドベイト（TVT の 24 時間前に投与）と本薬（TVT の 72 時間前に投与）の間に効果の差は認められなかった。

TVT 後の再出血率には、本薬とアドベイトとの間に有意差は認められなかった（図 8）。したがって、HemA マウスに本薬を投与したときの TVT 後の生死存及び再出血に対する効果の結果から、本薬は TVT による出血に対する予防効果がアドベイトと同程度であることが示された。

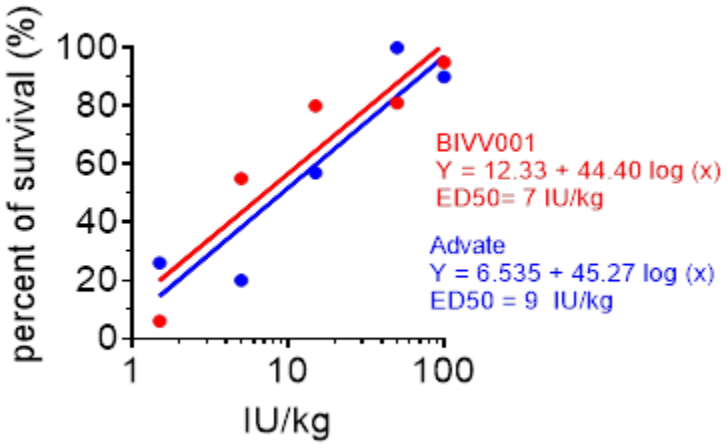
全体として、HemA マウスにおいて本薬は検討した用量範囲でアドベイトと比較して予防効果を 3 倍持続させ（図 8）、これは本薬の消失半減期が 3 倍長いこととよく相関していた。また、本薬の投与 72 時間後とアドベイトの投与 24 時間後の生存保護作用（ED_{50}）は同程度であった（図 9）ことから、効果が 3 倍持続することが更に裏付けられた。

図 8 - HemA マウスの尾静脈切断後の生存率（上図）及び再出血率（下図）



略号：アドベイト（Advate） = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、HemA = 血友病 A、IU = 国際単位、TVT = 尾静脈切断
マウスに対し、TVT の 72 時間前に本薬を、又は TVT の 24 時間前にアドベイトを投与した。

図 9 - 本薬及びアドベイトの生存保護作用（ED_{50}）



略号：アドベイト（Advate） = 武田薬品工業の完全長遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤、ED_{50} = 50%有効用量、IU = 国際単位

要約

HemA マウスにおいて、本薬は尾切断出血モデルでアドベイトと同程度の急性効果を示し、TVT 出血モデルでアドベイトより長い予防効果を示したことから、本薬は *in vivo* で十分に作用し、持続的な凝固促進活性を示すことが明らかになった。これらの結果は、*in vitro* の全血凝固データ（2.1.3 項）に一致していた。

また、これらの結果は、本薬がほとんどの生化学的機能試験でアドベイトと同様の結果を示したことにも一致していた。本薬は発色法では標準的な比活性を示した一方、凝固一段法で得られた比活性はそれよりも低かったが、マウスを用いた出血試験において、aPTT 凝固一段法（Actin FSL を活性化剤として使用）の結果に基づいて投与を行ったとき、本薬はアドベイトと同様の有効性プロファイルを示した。このことから、本薬の凝固一段法で得られた効力は *in vivo* 効果とよく相関することが示唆され、したがってこの値は生理学的に意義があるものと考えられた。

結論として、凝固一段法での活性に基づいて投与を行ったとき、本薬は急性効果モデルにおいてアドベイトと同程度の効果を示し、TVT の長期効果モデルにおいてアドベイトよりも効果が 3 倍持続した。このことから、凝固一段法での活性に基づいて投与を行ったときの本薬の効果はアドベイトと同程度であることが示された。

3　副次的薬理試験

本薬は、HemA で欠損又は機能障害がみられる FVIII の補充療法薬であるため、本薬の副次的薬理試験は実施しなかった。

4　安全性薬理試験

ICH S6(R1)(13)及び S7A(14)に従い、本薬の心血管系、呼吸系又は CNS に対する影響の有無を検討するための独立した安全性薬理試験は実施しなかった。関連する安全性薬理評価項目は、カニクイザル及びラットを用いた GLP 適用反復投与毒性試験の一環として評価した（Module 2.6.6 毒性試験の概要文 [3.2 項]参照）。これらの項目には、心電図並びにケージサイドでの呼吸困難及び CNS の異常な変化の徴候の観察が含まれた。検討した最高用量（750 IU/kg を 3～4 日に 1 回投与）まで、サルの 4 週間試験における心電図検査で心血管系への有害な影響を示す所見は認められず、ラット及びサルの 4 週間試験における一般状態の観察で神経系及び呼吸系への有害な影響を示す所見は認められなかった。

5　薬力学的薬物相互作用試験

薬力学的薬物相互作用は該当しないため、本薬の薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

6　考察及び結論

本薬の非臨床薬理評価として、aPTT 凝固一段法及び発色法による *in vitro* 薬理作用の評価、ROTEM、TGA、フィブリン重合化並びにトロンビン活性化速度を検討した。*In vivo* 薬理作用は、HemA マウスの 2 つの出血モデル、すなわち急性効果を評価する尾切断出血モデル及び予防効果を評価する TVT モデルを用いて評価した。

試験結果を以下に示す。

- HemA マウスの *in vivo* 出血モデル（尾切断モデル）における本薬とアドベイトの急性効果は同程度であり、全血中の本薬とアドベイトの急性血液凝固活性が同程度であることに一致していた。
- HemA マウスの予防的出血モデル（TVT モデル）における本薬の効果は、アドベイトよりも持続し、本薬の消失半減期が長いことに一致していた。
- *In vivo* 効果は、Actin FSL を活性化剤として用いる aPTT 凝固一段法で得られた活性と相関した。

aPTT 凝固一段法は、本薬の効力を決定するための適切な方法であった。このことは、*in vitro* 血液凝固アッセイ（TGA、ROTEM、フィブリン重合化）において、凝固一段法で得られた効力を用いて検討を行ったとき、本薬の血液凝固能はアドベイト（完全長 rFVIII）と同程度であった結果に基づいており、マウスの *in vivo* で効果がみられた結果によって更に裏付けられた。Actin FSL を活性化剤として用いる凝固一段法は、[redacted]の FDA からのフィードバックにおいて、効力を決定するアッセイとしても同意が得られている。

マウスモデルにおける本薬の予防効果持続時間はアドベイトよりも 3 倍長く、このことは、本薬ではアドベイトと比較して消失半減期が長く、凝固活性が持続することに一致していた。

安全性薬理の評価に特化した試験は実施しなかったが、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験の安全性薬理評価項目において、検討した最高用量（750 IU/kg を 3～4 日に 1 回投与）まで、本薬に関連する懸念は認められなかった。

全体として、非臨床薬理試験の結果から、本薬は消失半減期が長い新規クラスの血液凝固因子であり、循環血中で rFVIII が VWF から解離するため、rFVIII 製剤と比較して消失半減期が延長し、効果が持続すると考えられる。本資料に示すデータから、HemA の治療に用いる半減期延長型血液凝固第 VIII 因子補充療法薬として本薬の製造販売承認申請を行うことが支持される。

参 考 文 献

1. Seth Chhabra E, Liu T, Kulman J, Patarroyo-White S, Yang B, Lu Q, et al. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. Blood. 2020 Apr 23;135(17):1484–96.
2. Peters RT, Toby G, Lu Q, Liu T, Kulman JD, Low SC, et al. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein. J Thromb Haemost. 2013 Jan;11(1):132–41.
3. Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, Sakorafas P, et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. Blood. 2012 Mar 29;119(13):3024–30.
4. Buyue Y, Liu T, Kulman JD, Toby GG, Kamphaus GD, Patarroyo-White S, et al. A single chain variant of factor VIII Fc fusion protein retains normal in vivo efficacy but exhibits altered in vitro activity. PLoS One. 2014;9(11):e113600.
5. Kitchen S, Kershaw G, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX - chromogenic and one-stage assays issues. Haemophilia. 2016 Jul;22 Suppl 5:72–7.
6. Advate Canadian Product Monograph. Antihemophilic Factor (Recombinant), Plasma/Albumin Free Method (rAHF-PFM) 250, 500, 1000, 1500, 2000 and 3000 International Units (IU) per vial. Baxter Corporation. 2013 December 19.
7. Eloctate Canadian Product Monograph. Biogen Canada Inc. 2016 July.
8. ReFacto Summary of Basis for Approval - N° 98-0137. ReFacto® (Antihemophilic Factor Recombinant) by Pharmacia & Upjohn AB for Genetics lnstitute, lnc. 2000 April 05.
9. Kitchen S, Beckmann H, Katterle Y, Bruns S, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: results from an International comparative laboratory field study. Haemophilia. 2016 May;22(3):e192-9.
10. Hubbard AR, Dodt J, Lee T, Mertens K, Seitz R, Srivastava A, et al. Recommendations on the potency labelling of factor VIII and factor IX concentrates. J Thromb Haemost. 2013 May;11(5):988–9.
11. Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. Nat Genet. 1995 May;10(1):119–21.
12. Pan J, Liu T, Kim J-Y, Zhu D, Patel C, Cui Z-H, et al. Enhanced efficacy of recombinant FVIII in noncovalent complex with PEGylated liposome in hemophilia A mice. Blood. 2009 Sep 24;114(13):2802–11.
13. ICH S6(R1)ガイドライン「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」（2012）
14. ICH S7Aガイドライン「安全性薬理試験ガイドライン」（2001）

サノフィ株式会社

efanesoctocog alfa

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.3 薬理試験概要表

Total number of pages: 10

目　　次

2.6.3 薬理試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 3

1　　薬理試験一覧表 4

2　　効力を裏付ける試験 6

3　　副次的薬理試験 8

4　　安全性薬理試験 9

5　　薬力学的薬物相互作用試験 10

表　目　次

表2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program 4

表2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings 6

1 薬理試験一覧表

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Primary pharmacodynamics					
Evaluation of activity by aPTT-based 1-stage clotting assay and chromogenic assay	Human FVIII-depleted plasma	In vitro	[redacted], USA	[R-BV001-03]	4.2.1.1-1
Evaluation of BIVV001 clotting potential by TGA, ROTEM and Fibrin generation	Human HemA patient plasma or whole blood	In vitro	[redacted], USA	[R-BV001-04]	4.2.1.1-2
Kinetics of thrombin activation of BIVV001 and BDD FVIII by SDS-PAGE	Human α-thrombin	In vitro	[redacted], USA	[R-BV001-07]	4.2.1.1-3
Reversed-phase liquid chromatography analysis of thrombin digested BIVV001	Human α-thrombin	In vitro	[redacted], USA	[R-BV001-10]	4.2.1.1-4
Acute efficacy of rFVIIIFc-VWF-XTEN[a] versus Advate in the tail clip bleeding model	HemA mice	Intravenous	[redacted], USA	[Rsch-[redacted]-043]	4.2.1.1-5
Prophylactic efficacy of BIVV001 versus Advate in the TVT Model	HemA mice	Intravenous	[redacted] USA	[R-BV001-05]	4.2.1.1-6

Abbreviations: Advate: full length recombinant factor VIII molecule from Takeda Pharmaceutical; aPTT: activated partial thromboplastin time; BDD: B domain deleted; FVIII: factor VIII; HemA: hemophilia A; TGA: thrombin generation assay; rFVIIIFc-VWF-XTEN: Recombinant coagulation factor VIII Fc-von Willebrand factor-XTEN fusion protein; ROTEM: rotational thromboelastography; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel; TVT: tail vein transection; XTEN polypeptide: unstructured hydrophilic polypeptide, composed of repeating motifs of 6 natural amino acids (Gly, Ala, Pro, Glu, Ser, Thr, or G, A, P, E, S, T). XTEN is registered trademark of Amunix Pharmaceuticals Inc.

a For Rsch-[redacted]-043, research grade molecule that has [redacted] was used. These [redacted] were part of a [redacted] and do not impact the pharmacodynamics or PK of the molecule and were removed from the final BIVV001.

表 2.6.3.1 - Pharmacology tabulated summary – overview - study program (continued)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study number	Location
Secondary pharmacodynamics					
Not applicable					
Safety pharmacology					
Not applicable					
Pharmacodynamic drug interactions					
Not applicable					

2　効力を裏付ける試験

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Evaluation of activity aPTT-based 1-stage clotting assay and automated chromogenic substrate assay	Human FVIII-depleted plasma	In vitro	NA	NA	On a molar basis, activities of BIVV001 and Advate were similar in the chromogenic assay, and the specific activity of BIVV001 by aPTT-based 1-stage assay was >2-fold lower than chromogenic assay.	[R-BV001-03]	4.2.1.1-1
Evaluation of BIVV001 clotting potential by TGA, ROTEM and Fibrin generation	Human HemA patient plasma or whole blood	In vitro	NA	NA	Whole blood clotting, thrombin generation, and fibrin polymerization by BIVV001 and Advate were comparable when BIVV001 potency was assigned based on the aPTT-based 1-stage assay.	[R-BV001-04]	4.2.1.1-2
Kinetics of thrombin activation of BIVV001 and BDD FVIII by SDS-PAGE	Human α-thrombin	In vitro	NA	NA	The thrombin activation profiles for BIVV001 and in house produced BDD rFVIII were comparable.	[R-BV001-07]	4.2.1.1-3
Reversed-phase liquid chromatography analysis of thrombin digested BIVV001	Human α-thrombin	In vitro	NA	NA	The thrombin activation profiles of multiple GMP batches of BIVV001 were comparable.	[R-BV001-10]	4.2.1.1-4

Abbreviations: Advate: full length recombinant factor VIII molecule from Takeda Pharmaceutical; aPTT: activated partial thromboplastin time; BDD FVIII: B domain deleted recombinant factor VIII; F: female; FVIII: factor VIII; GMP: good manufacturing practice; HemA: hemophilia A; M: male, NA: not applicable; rFVIII: recombinant factor VIII; ROTEM: rotational thromboelastography; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel; TGA: thrombin generation assay

表 2.6.3.2.1 - Primary pharmacodynamics - noteworthy findings (continued)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Type of study	Test system	Method of administration	Dose or concentration	No. per group and gender (M/F)	Noteworthy findings	Study number	Location
Acute efficacy of rFVIIIFc-VWF-XTEN[a] versus Advate in the tail clip bleeding model	Mouse; HemA or C57BL/6	Intravenous	rFVIIIFc-VWF-XTEN[a] 37.5, 75, or 150 IU/kg (by aPTT-based 1-stage assay) Advate: 37.5, 75, or 150 IU/kg	14 (M) per group	Acute bleeding protection and significant reduction in blood loss for rFVIIIFc-VWF-XTEN and Advate in HemA mice at all 3 doses compared to vehicle control. Acute efficacy of rFVIIIFc-VWF-XTEN and Advate comparable and dose-dependent.	[Rsch-[redacted]-043]	4.2.1.1-5
Prophylactic efficacy of BIVV001 versus Advate in the TVT model	HemA mice	Intravenous	BIVV001: 1.5, 5, 15, 50,100 IU/kg (by aPTT-based 1-stage assay) Advate: 1.5, 5, 15, 50, 100 IU/kg	5 to 20 (M) per group	Survival and re-bleeding rates were similar for BIVV001 dosed 72 hours before TVT and Advate dosed 24 hours before TVT. The duration of prophylactic efficacy for BIVV001 is 3-fold longer than Advate	[R-BV001-05]	4.2.1.1-6

Abbreviations: Advate: Full length recombinant factor VIII molecule from Takeda Pharmaceutical; aPTT: activated partial thromboplastin time; HemA: hemophilia A; IU: international unit; M: male; F: female; rFVIIIFc-VWF-XTEN: recombinant FVIIIFc-von Willebrand factor-XTEN; TVT: tail vein transection; XTEN polypeptides are unstructured hydrophilic polypeptide, composed of repeating motifs of 6 natural amino acids (Gly, Ala, Pro, Glu, Ser, Thr, or G, A, P, E, S, T). XTEN is registered trademark of Amunix Pharmaceuticals Inc.

a For Rsch-[redacted]-043, research grade molecule that has [redacted] was used. These [redacted] were part of [redacted] and do not impact the pharmacodynamics or PK of the molecule and were removed from the final BIVV001.

3　副次的薬理試験

該当なし。

4　安全性薬理試験

該当なし。

5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。