目次

略号一覧表 2
2.6.1 緒言 3
2.6.1.1 予定する効能又は効果、用法及び用量 4
2.6.1.2 参考文献一覧 5

表

表 2.6.1.1-1 予定する効能又は効果、用法及び用量 5

図

図 2.6.1.1-1 ADAMTS13 の構造式 4

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, number 13	トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番
cTTP	congenital thrombotic thrombocytopenic purpura	先天性血栓性血小板減少性紫斑病
ERT	enzyme replacement therapy	酵素補充療法
FVIII	factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
iTTP	immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura	後天性（免疫原発性）血栓性血小板減少性紫斑病
IV	intravenous(ly)	静脈内
PE	plasma exchange	血漿交換
rADAMTS13	recombinant a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, number 13	ADAMTS13（遺伝子組換え）
TSP-1	thrombospondin-1	トロンボスポンジン 1 型
TTP	thrombotic thrombocytopenic purpura	血栓性血小板減少性紫斑病
VWF	von Willebrand factor	フォン・ヴィレブランド因子

2.6.1 緒言

トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番（ADAMTS13）（遺伝子組換え）（rADAMTS13、以下、TAK-755、別名 SHP655 又は BAX930）は、先天性血栓性血小板減少性紫斑病〔先天性 TTP（cTTP）、ADAMTS13 の先天性欠乏症〕患者に対する酵素補充療法（ERT）として開発中である。ADAMTS13 は、フォン・ヴィレブランド因子（VWF）の A2 ドメイン内に存在する Tyr1605-Met1606 を切断して VWF フラグメントを形成することにより、VWF マルチマーのサイズを調節する。形成された VWF フラグメントは高分子量 VWF マルチマーとは異なり、血栓症の発症を促進しない[1]。VWF は、主に血管内皮細胞及び巨核球によって合成される多量体糖タンパク質である[2]。VWF は正常な 1 次止血に必須であり、また血液凝固第 VIII 因子（FVIII）のキャリアータンパク質としても働き、FVIII と非共有結合複合体を形成し血液中を循環している。cTTP の根本原因は、常染色体潜性遺伝の ADAMTS13 欠乏及び臨床的な VWF-ADAMTS13 の機能不全である。cTTP 患者では、VWF の切断作用が低下していることにより、微小血管系の血栓性疾患である TTP を発症しやすくなる。

TTP には、cTTP と後天性又は免疫介在性 TTP（iTTP）の 2 つの型が知られている。疾患の機序及び治療プロトコールが異なるため、この区別は臨床的に重要である。

cTTP は Upshaw-Schulman 症候群[3][4]とも呼ばれ、常染色体潜性遺伝を有し、ADAMTS13 遺伝子の変異により引き起こされる。ADAMTS13 は、ADAMTS ファミリーの 1 つであり、亜鉛メタロプロテイナーゼをコードし、VWF の切断に関与する遺伝子である[5]。ADAMTS13 の重度の欠乏は、TTP の特徴である超大型 VWF の蓄積を生じる。

iTTP は cTTP よりも一般的に知られており、酵素機能を阻害する ADAMTS13 に対する自己抗体の発現を特徴とし、その結果として ADAMTS13 活性が欠乏する疾患である[6]。iTTP は医学的緊急治療を要し、適切な治療が行われない場合の死亡率は 90%超に及ぶ。iTTP の治療の中心は、少なくとも 1 日 1 回の血漿交換（PE）及び免疫抑制療法（主にコルチコステロイドによる治療）であり、PE が直ちに施設で利用できない場合は血漿輸注を行う[5][7]。

TTP の病態生理の中心は、1 次及び 2 次止血において中心的な役割を果たす巨大な血漿糖タンパク質である VWF に対する ADAMTS13 の切断作用の欠損であることが明らかとなっている。TTP 患者の血漿中には異常な大きさの VWF マルチマーが発現しており、血栓には VWF 及び血小板が多量に含まれ、VWF が血小板膜表面にみられる[7]。

現在、新鮮凍結血漿輸注の形で行われている補充療法は、ADAMTS13 欠乏を一時的に補正し、VWF 切断活性の正常化と臨床症状の発現を予防し、臨床的寛解をもたらす。TAK-755 による ADAMTS13 の補充療法は、血漿中に ADAMTS13 が存在しない又は顕著に低下している TTP 患者において、血漿中 ADAMTS13 濃度を特異的に上昇させる。

臨床試験及び承認申請のため、TAK-755 の一連の非臨床試験として、げっ歯類及び非げっ歯類（非ヒト霊長類を含む）を用いた in vivo での薬理、安全性薬理、薬物動態及び毒性試験を実施した。cTTP に対する ERT としての静脈内（IV）投与の臨床使用を裏付けるために、TAK-755 を用いた一連の非臨床試験を実施した。これらの試験成績により、TAK-755 は有効であり、良好な安全性プロファイルを有することが示された。

ADAMTS13 ポリペプチドの前駆体（1427 個のアミノ酸残基）は、シグナルペプチド及びフューリンによって切断される部位を有するプロペプチドと、それに続く成熟 VWF 切断プ

ロテイナーゼで構成される（図 2.6.1.1-1）。成熟 rADAMTS13 は、N 末端側からメタロプロテイナーゼドメイン、ディスインテグリンドメイン、トロンボスポンジン 1 型（TSP-1）モチーフ、システインリッチドメイン、スペーサードメイン、7 個の TSP-1 モチーフ及び 2 個の CUB ドメインを含む三次元構造に折畳まれた 1353 個のアミノ酸残基からなる。

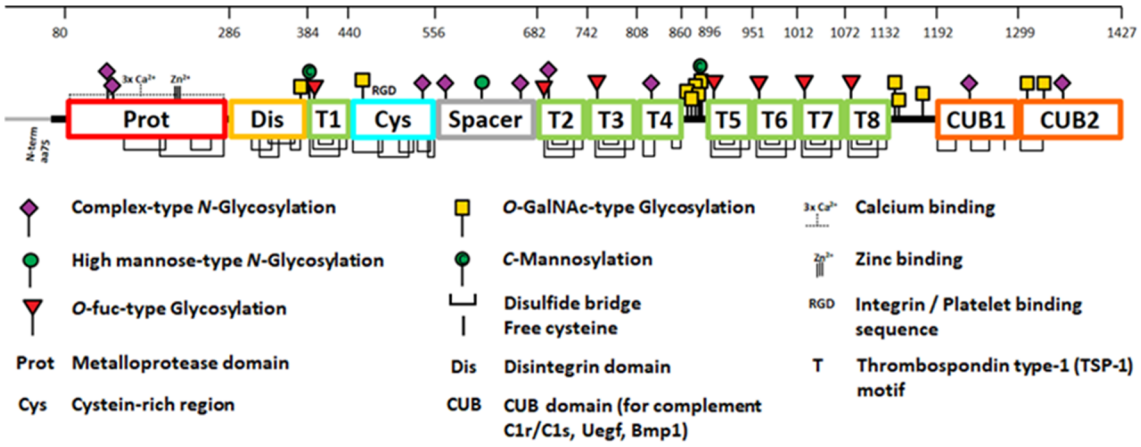


図 2.6.1.1-1　ADAMTS13 の構造式

質量分析による rADAMTS13 の平均分子量は 172 kDa である。ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動では、rADAMTS13（TAK-755）及び血漿由来 ADAMTS13 は一つの主要バンドに出現し、見かけの分子量は両者ともに約 190 kDa と推定された。

TAK-755 は、2 種類のタンパク質の混合物からなる。1 つは rADAMTS13 天然型〔グルタミン（Q）97 天然型〕で、もう 1 つは rADAMTS13 天然型の 97 位のアミノ酸が Q からアルギニン（R）に置換された rADAMTS13 変異型（R97 変異型）である（3.2.S.3.1 参照）。重要な非臨床試験で使用した TAK-755 のロットには、Q97 天然型及び R97 変異型タンパク質が含まれている。この両者を含む rADAMTS13 の酵素特性の評価により、rADAMTS13 は血漿由来の ADAMTS13 の酵素特性を強く反映していることが示された。

TAK-755 は、IV 投与用 rADAMTS13 の凍結乾燥製剤である。有効成分は、哺乳類の発現系であるチャイニーズハムスター卵巣細胞株で産生された完全グリコシル化 rADAMTS13 タンパク質である。TAK-755 の最終製剤の製造、精製及び製剤化にヒト又は動物由来の原材料は使用していないため、外来性物質由来の感染リスクは低減されている。高い安全性を確保するため、TAK-755 の製造工程には独立した 2 つのウイルス不活化／除去工程が含まれている。

2.6.1.1 予定する効能又は効果、用法及び用量

この非臨床試験の要約は、cTTP 患者に対する ERT としての TAK-755 の開発を支持するものである。TAK-755 の予定する効能又は効果、用法及び用量を表 2.6.1.1-1 に示す。

表 2.6.1.1-1　予定する効能又は効果、用法及び用量

適応症（効能又は効果）	先天性血栓性血小板減少性紫斑病
用法及び用量	本剤を添付の溶解液 5mL で溶解し、2～4mL/分の速度で緩徐に静脈内に注射する。 定期的に投与する場合、通常、成人及び 12 歳以上の小児には、1 回 40 国際単位/kg を隔週投与するが、患者の状態に応じて 1 回 40 国際単位/kg を週 1 回投与することができる。 急性増悪時に投与する場合、通常、成人及び 12 歳以上の小児には、1 日目に 1 回 40 国際単位/kg、2 日目に 1 回 20 国際単位/kg、3 日目以降は 1 日 1 回 15 国際単位/kg を投与する。

2.6.1.2 参考文献一覧

[1] Gao W, Anderson PJ, Sadler JE. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. Blood. 2008;112(5):1713-9.

[2] Zheng XL. ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. Annu Rev Med. 2015;66:211-25.

[3] Schulman I, Pierce M, Lukens A, Currimbhoy Z. Studies on thrombopoiesis. I. A factor in normal human plasma required for platelet production; chronic thrombocytopenia due to its deficiency. Blood. 1960;16:943-57.（添付なし）

[4] Upshaw JD Jr. Congenital deficiency of a factor in normal plasma that reverses microangiopathic hemolysis and thrombocytopenia. N Engl J Med. 1978;298(24):1350-2.（添付なし）

[5] Levy GG, Nichols WC, Lian EC, Foroud T, McClintick JN, McGee BM, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature. 2001;413(6855):488-94.（添付なし）

[6] Scully M, Brown J, Patel R, McDonald V, Brown CJ, Machin S. Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. J Thromb Haemost. 2010;8(2):257-62.（添付なし）

[7] Tsai HM. Advances in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. J. Am. Soc. Nephrol. 2003;14(4):1072-81.（添付なし）

目次

略号一覧表....2
2.6.2 薬理試験の概要文....3
2.6.2.1 まとめ....3
2.6.2.2 効力を裏付ける試験....4
2.6.2.2.1 In vitro 試験....4
2.6.2.2.2 In vivo 試験....5
2.6.2.3 副次的薬理試験....21
2.6.2.4 安全性薬理試験....22
2.6.2.4.1 中枢神経系....22
2.6.2.4.2 心血管系及び呼吸系....23
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験....23
2.6.2.6 考察及び結論....23
2.6.2.7 参考文献一覧....24

表

表 2.6.2.2-1 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を治療的投与したときの心臓及び腎臓の病理組織学的所見....16

図

図 2.6.2.2-1 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的に投与したときの血小板数....7
図 2.6.2.2-2 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的に投与したときの血清 LDH 値....8
図 2.6.2.2-3 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的に投与したときの破砕赤血球の重症度....9
図 2.6.2.2-4 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を経時的に予防的投与したときの血小板数....11
図 2.6.2.2-5 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を経時的に予防的投与したときの血清 LDH 値....12
図 2.6.2.2-6 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を治療的投与したときの血小板数....14
図 2.6.2.2-7 ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を治療的投与したときの血清 LDH 値....15
図 2.6.2.2-8 TAK-755（400 U/kg）を投与したラットにおける高分子量 VWF マルチマーバンドの消失（低分解能アガロースゲル画像）....20
図 2.6.2.2-9 TAK-755（400 U/kg）を投与したサルにおける高分子量 VWF マルチマーバンドの消失（低分解能アガロースゲル画像）....21

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, number 13	トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番
cTTP	congenital thrombotic thrombocytopenic purpura	先天性血栓性血小板減少性紫斑病
FVIII	coagulation factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HCl	hydrochloride	塩酸塩
ICH	International Council for Harmonization	医薬品規制調和国際会議
IV	intravenous(ly)	静脈内
KO	knock-out	ノックアウト
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
rADAMTS13	recombinant a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, number 13	ADAMTS13（遺伝子組換え）
RBC	red blood cell(s)	赤血球
RCo	ristocetin cofactor activity	リストセチン・コファクター活性
rVWF	recombinant von Willebrand factor	遺伝子組換え VWF
SD	Sprague Dawley	－
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
TTP	thrombotic thrombocytopenic purpura	血栓性血小板減少性紫斑病
VWF	von Willebrand factor	フォン・ヴィレブランド因子

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番（ADAMTS13）（遺伝子組換え）（rADAMTS13、以下、TAK-755、別名 SHP655 又は BAX930）は、先天性血栓性血小板減少性紫斑病〔先天性 TTP（cTTP）、ADAMTS13 の先天性欠乏症〕患者に対する酵素補充療法として開発中である。TAK-755 の臨床予定投与経路は静脈内（IV）投与である。ADAMTS13 は、フォン・ヴィレブランド因子（VWF）の A2 ドメイン内に存在する Tyr1605-Met1606 を切断して VWF フラグメントを形成することにより、VWF マルチマーのサイズを調節する。形成された VWF フラグメントは、高分子量 VWF マルチマーとは異なり、血栓症の発症を促進しない[1]。VWF は、主に血管内皮細胞及び巨核球によって合成される多量体糖タンパク質である[2]。VWF は正常な 1 次止血に必須であり、また血液凝固第 VIII 因子（FVIII）のキャリアータンパク質としても働き、FVIII と非共有結合複合体を形成し血液中を循環している。cTTP の根本原因は、常染色体潜性遺伝の ADAMTS13 欠乏及び臨床的な VWF-ADAMTS13 の機能不全である。cTTP 患者では、VWF の切断作用が低下していることにより、微小血管系の血栓性疾患である TTP を発症しやすくなる。

TAK-755 の生理学的有効性を in vivo で評価するため、まずは TAK-755 による異なる動物種の VWF の認識及び切断作用について in vitro で検討した（2.6.2.2.1）。各動物種由来の VWF 基質に対するマルチマー切断作用の程度には違いがみられたが、検討したすべての動物種〔ADAMTS13 ノックアウト（KO）マウス、Sprague Dawley（SD）ラット、Dunkin-Hartley モルモット、カニクイザル及びミニブタ〕が TAK-755 の in vivo での非臨床評価に適していると考えられた。

cTTP の動物モデルとして ADAMTS13 KO マウスを確立し、TAK-755 の有効性評価に用いた[3]。ADAMTS13 KO マウスは、超大型マルチマーを含有する遺伝子組換え VWF（rVWF）を投与すると、血小板減少症、ヘマトクリット値の減少、並びに心室の血小板凝集及び心筋壊死を伴う血清乳酸脱水素酵素（LDH）の上昇といった TTP 様症状が誘発されるモデルである[3]。rVWF 投与前に TAK-755 を予防的に投与したとき、ADAMTS13 KO マウスの TTP 様症状の発症が予防された。rVWF 投与後に TAK-755 を治療的に投与したとき、TTP 様症状の発現頻度及び重症度が低下し、また、その効果は rVWF 投与後から TAK-755 投与前までの投与間隔に依存した[3]。

効力を裏付ける試験では、ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的及び治療的に投与したときの有効性を検討した（2.6.2.2.2）。TAK-755 の有効性は、TTP のマーカーである血小板減少及び LDH 上昇の抑制の程度と定義した。さらに、臓器損傷を病理組織学的に評価した。その結果、ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおいて、TAK-755 の予防的投与及び治療的投与による有効性が示された。TAK-755 の有効性は、TTP 誘発前又は誘発後に投与した場合のいずれにおいても、投与間隔及び用量に依存した。TAK-755 は、Octaplas（現在の標準治療である新鮮凍結ヒト血漿、欧米にて販売）と同程度又はわずかに上回る有効性を示した。

SD ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、TAK-755 の投与前後で血漿中の VWF マルチマーのサイズを解析し、内因性 VWF の切断作用を検討した。その結

果、SD ラット及びカニクイザルにおける in vivo での TAK-755 による VWF の切断作用が示された。

TAK-755 は、よく知られた特異的な作用機序を有するバイオテクノロジー由来のヒト rADAMTS13 であることから、TAK-755 の独立した安全性薬理試験は実施しなかった。安全性薬理の評価項目は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）を適用した毒性試験に含めた。単回漸増投与毒性試験及び反復投与毒性試験では、TAK-755 をラット及びサルにそれぞれ 1,820 IU/kg 及び 1,790 U/kg を IV 投与したとき中枢神経系に関連する影響は認められなかった。カニクイザルを用いた主要な反復投与毒性試験において、生命機能（心血管系及び呼吸系パラメータ）が評価された。カニクイザルに TAK-755 を最高用量である 400 U/kg の用量まで IV 投与したときの忍容性は良好であり、心血管系及び呼吸系に対して有害な作用は認められなかった（2.6.6）。

GLP 適用条件も含めた個々の試験の概要表は 2.6.3（2.6.3.1、2.6.3.2.1、2.6.3.2.2、2.6.3.3.2 及び 2.6.3.4）に示した。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 試験

：**添付資料番号 4.2.1.1-1（参考）**

TAK-755 の生理学的有効性を in vivo で評価するために、まずは in vitro で ADAMTS13 KO マウス、SD ラット、Dunkin-Hartley モルモット、カニクイザル及びミニブタの血漿中に含まれる VWF に対する TAK-755 によるタンパク質分解作用を VWF マルチマー解析により検討し、各動物種の in vivo モデルとしての適切性を評価した。また、TAK-755 による VWF 切断作用の特異性について、ADAMTS13 中和抗体又は金属イオンキレート剤のエチレンジアミン四酢酸で ADAMTS13 活性を阻害することにより解析した（2.6.3.2.1、4.2.1.1-1）。

精製した TAK-755〔1、5 及び 10 U/mL、1.5 M 尿素及び 5 mM Tris-HCl 溶液（pH 8.0）で希釈〕を 8.5 mM 塩化バリウムとともに 37°C で 30 分間プレインキュベートした（反応容量 110 µL）。続いて、ADAMTS13 KO マウス、SD ラット、Dunkin-Hartley モルモット、カニクイザル及びミニブタからクエン酸添加条件で採血し得られた血漿を VWF 基質として添加し（総反応容量 330 µL に対して血漿 33 µL を添加）、変性条件下〔5 mM Tris-HCl 及び 1.5 M 尿素緩衝液（pH 8.0）〕で 37°C で 24 時間インキュベートした。50 mM 硫酸ナトリウム（最終濃度）を添加して反応を停止させた後、試料を遠心分離し、得られた上清を凍結又は直接使用して、VWF マルチマー解析を実施した。

対照実験及び阻害実験を実施した結果、VWF は個々の動物血漿検体中に存在している内因性 VWF 切断プロテイナーゼによってではなく、TAK-755 によって特異的に切断されることが示された。

VWF マルチマー解析において、種々の動物（ADAMTS13 KO マウス、SD ラット、Dunkin-Hartley モルモット、カニクイザル及びミニブタ）由来の血漿を TAK-755 とともにインキュベートすると VWF マルチマー数の減少及び典型的な triplet バンドの出現が認められたことから、これら動物血漿中の VWF は、in vitro の変性条件下で TAK-755 により切断を受けやすいことが示された。また、ADAMTS13 中和抗体及びエチレンジアミン四酢酸で

ADAMTS13 活性を阻害することにより VWF マルチマーの切断が阻害されたことから、動物血漿中で認められた VWF の切断は、TAK-755 の特異的な作用によるものであることが確認された。各動物種由来の VWF 基質に対するマルチマー切断作用の程度には違いがみられたが、検討したすべての動物種が TAK-755 の in vivo での非臨床評価に適していると考えられた。

2.6.2.2.2 In vivo 試験

2.6.2.2.2.1 TTP 動物モデル

TTP の異なる動物モデルが文献で報告されている。ボトロセチン[4][5]又は 2-ブトキシエタノール[6]により TTP 様症状を誘発させる化学誘発性 TTP モデルが数種の動物種で確立されている。もう 1 つの異なるモデルは、細菌病原体由来のシガトキシン及び遺伝子ターゲティングを用いて構築された ADAMTS13 KO マウスを用いたシガトキシン誘発性 TTP モデルである[7][8]。シガトキシン誘発性 TTP マウスモデルでは、ADAMTS13 KO マウスのサブセットにおいて自然発生的な血小板減少症及び生存率低下が認められ、シガトキシンを投与することで、ヒトの TTP に良く似た症状が認められた。

しかし、これらの動物モデルが非臨床で効力を裏づける薬力学試験での使用に適していることは証明されていない。化学誘発性 TTP モデルは非常に人工的であり、ヒトにおける TTP 発症の病態生理を反映していない。シガトキシン誘発性 TTP モデルはヒトにおける臨床状態をやや反映している可能性があるが、マウス VWF 濃度は個体間で非常にばらつきがあること及びシガトキシン投与後の反応にも大きなばらつきが認められることから、再現性の高い結果が得られない。このような問題点があるため、上記モデルはいずれも薬力学試験のモデルとして適切ではないと考えられた。

そのため、新たな TTP 動物モデルが構築された[3]。ADAMTS13 KO マウスに超大型 VWF マルチマーを含有する rVWF を高用量で投与することにより、TTP 様症状を誘発させるモデルである。このマウスモデルでは、ヒト高分子量 VWF マルチマーが切断されず、高用量の rVWF を投与すると、重度の一般状態の異常所見を示し、重度の血小板減少症及びいくつかの臓器で血栓塞栓性変化が認められた。これらの症状は TTP 患者の臨床症状に酷似していた。また、rVWF を投与した多くの ADAMTS13 KO マウスで、体重減少、重度の血小板減少症、血清 LDH 値の上昇及び心臓の血栓性変化が認められたことから、TTP 様症状の誘発は均質、安定かつ再現性があることが確認された（4.2.1.1-2、4.2.1.1-3、4.2.1.1-4、4.2.1.1-5）。

被験物質の有効性は、TTP のマーカーである血小板減少及び LDH 上昇の抑制の程度と定義した。さらに、臓器損傷を病理組織学的に評価した。ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルに TAK-755 を予防的及び治療的に投与したときの有効性を評価した結果を以降に示す。さらに、ADAMTS13 KO マウスにおいて、TAK-755 の予防的投与により rVWF を介した軟膜微小血管血栓症の発症を効果的に防ぎ、TAK-755 の治療的投与により rVWF を介して脳血管内で発生した血栓又は形成中の血栓が速やかに消失した結果も併せて示す[9]。

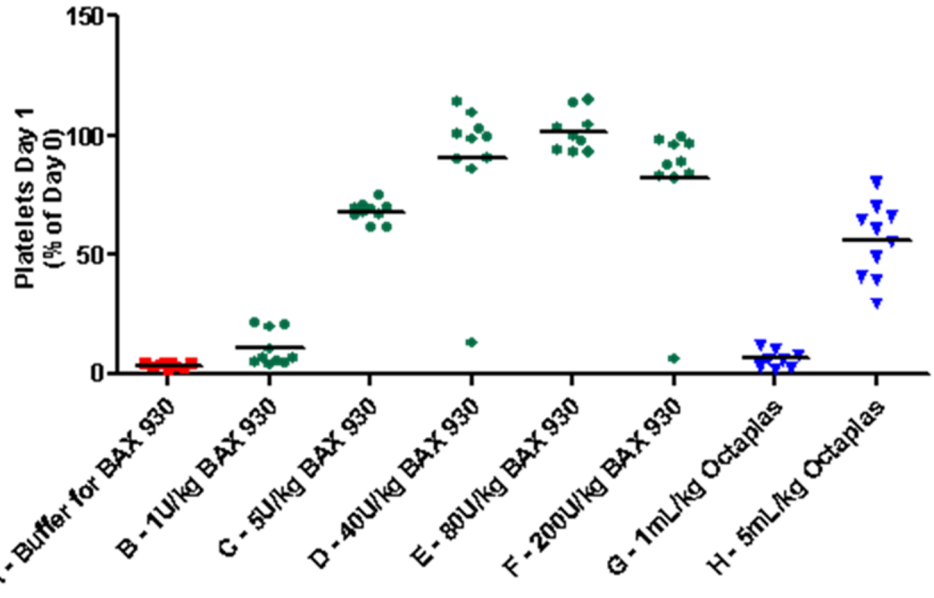
2.6.2.2.2.2 ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおける TAK-755 の予防的投与による有効性

：**添付資料番号 4.2.1.1-2（評価）**

TAK-755 の予防的投与による有効性を評価するため、ADAMTS13 KO マウス（雌雄各 5 匹／群）に、rVWF〔2,000 VWF：リストセチン・コファクター活性（RCo）U/kg〕を投与して TTP を誘発する直前に、TAK-755 を 1、5、40、80 又は 200 U/kg で投与した（2.6.3.2.2、4.2.1.1-2）。陽性対照として、現在 TTP 患者の治療に使用されている新鮮凍結ヒト血漿製剤である Octaplas を 1 又は 5 mL/kg の用量で投与した動物を用いた。ヒト血漿 1 mL 中に 1 U の ADAMTS13 が含まれることから、陽性対照の用量は TAK-755 の低用量群（1 又は 5 U/kg）と同程度であり、同一用量の TAK-755 と Octaplas による作用を比較検討した。投与容量の制限により、より高用量の Octaplas は投与できなかった。陰性対照（vehicle）として、製剤緩衝液及び高用量の rVWF を投与した動物を用いた。また、背景対照（control）として ADAMTS13 KO マウスに製剤緩衝液及び高用量の rVWF のいずれも投与しない無投与動物を用いた。TAK-755 の有効性は、TTP の特徴である血小板減少及び LDH 上昇の抑制の程度と定義した。さらに、臓器損傷を病理組織学的に評価し、スコア化した。

TAK-755 のいずれの用量群でも一般状態の異常所見は認められなかった。Octaplas（5 mL/kg）群では 10 匹中 4 匹に軽度から中等度の行動抑制が認められた。Octaplas（1 mL/kg）群では 10 匹中 5 匹に軽度から中等度の行動抑制が認められ、そのうち 1 匹では行動抑制に加え、側臥位及び筋痙攣などの重度の一般状態の異常所見が認められたため、Octaplas 投与 1 時間後に安楽死させた。

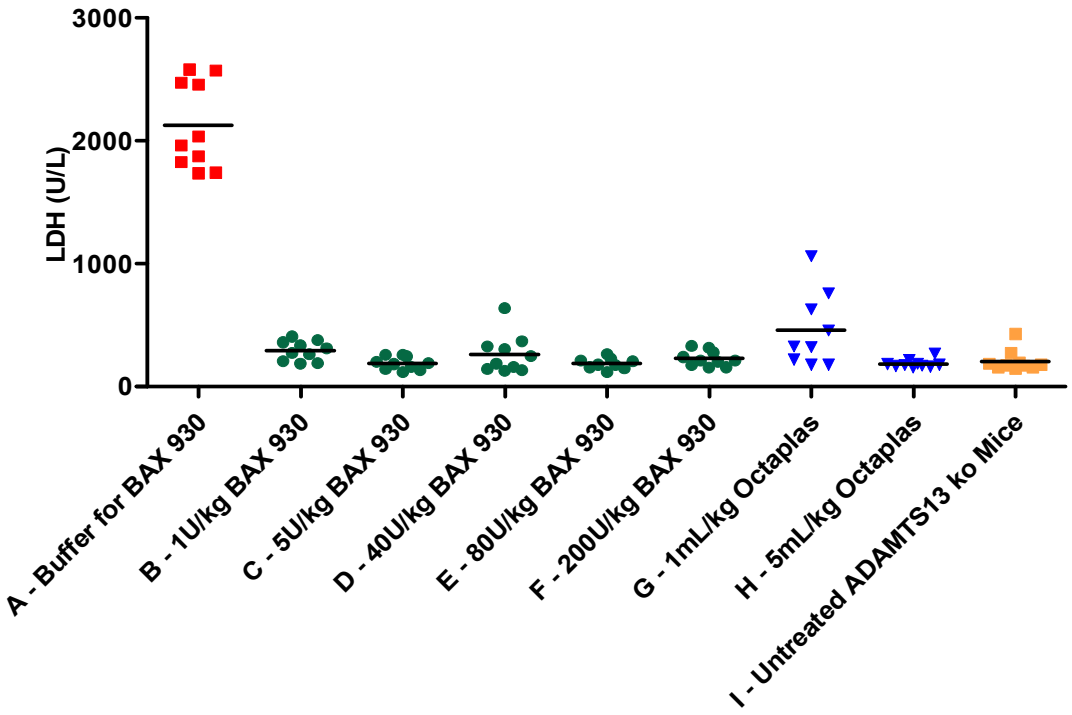
TAK-755（1～200 U/kg）を予防的に単回投与したとき、rVWF により誘発される TTP 様症状に対する用量依存的な予防効果が示された。TAK-755 群のすべての用量で vehicle 群に比して血小板数が統計学的に有意に高かった（$p \leq 0.0003$）。TAK-755（1 U/kg）群では重度の血小板減少症が発症している（血小板数は試験開始前の Day 0 に評価したベースライン値の 10.3%であった）一方、より高用量の TAK-755 群では血小板数はベースライン値の 67.9%～101.5%であった。また、臨床的に意味のある予防効果は TAK-755 の 40 U/kg 以上の用量で認められた。Octaplas（1 又は 5 mL/kg）群では、血小板数はそれぞれベースライン値の 6.2%及び 55.8%であり、Octaplas（5 mL/kg）群のみ vehicle 群に比して血小板数が統計学的に有意に高かった（$p<0.0001$）（図 2.6.2.2-1）。



出典：4.2.1.1-2
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト
Group A：vehicle 群

図 2.6.2.2-1　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的に投与したときの血小板数

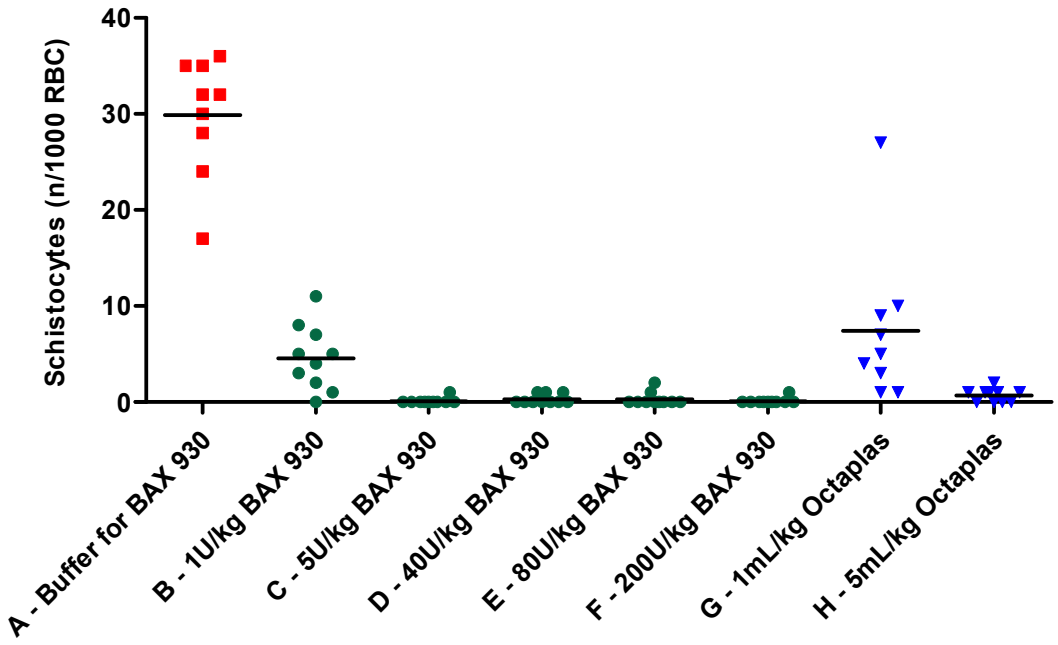
TAK-755 群では、ヘマトクリット値及びヘモグロビン値は用量依存的に control 群と近似し、血清 LDH 値はすべての用量で vehicle 群と比較して上昇が予防された（$p<0.0001$）。同一用量の ADAMTS13 を TAK-755（1 又は 5 U/kg）又は Octaplas（1 又は 5 mL/kg）として投与した動物のヘマトクリット値は、同程度であった（TAK-755 対 Octaplas は 1 又は 5 U（mL）/kg で、それぞれ 31.3%対 31.5%又は 33.6%対 32.8%）。予防的投与の Octaplas（1 又は 5 mL/kg）群でも、ヘモグロビン値に対する用量依存的な予防効果が示された。しかし、Octaplas（1 mL/kg）群では、control 群と比較して血清 LDH 値が 2 倍に上昇した（図 2.6.2.2-2）。



出典：4.2.1.1-2
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト、LDH：乳酸脱水素酵素
Group A：vehicle 群、Group I：control 群

図 2.6.2.2-2　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的に投与したときの血清 LDH 値

Vehicle 群のすべての動物で、破砕赤血球、すなわち断片化した赤血球（RBC）がみられたことから、溶血性貧血の発症が示唆された。TAK-755（1 U/kg）群では、破砕赤血球数/RBC 1,000 個で定義される破砕赤血球の重症度が低下した。より高用量の TAK-755 群では、破砕赤血球の発現頻度及び重症度が低下した。また、Octaplas（1 又は 5 mL/kg）群でも、破砕赤血球の発現頻度及び重症度が用量依存的に低下した。同一用量の ADAMTS13 を TAK-755 又は Octaplas として投与したときの破砕赤血球の発現頻度及び／又は重症度は同程度であった（図 2.6.2.2-3）。



出典：4.2.1.1-2
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト、RBC：赤血球
Group A：vehicle 群

図 2.6.2.2-3　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を予防的に投与したときの破砕赤血球の重症度

心臓及び腎臓における TTP 関連の病理組織学的所見として、vehicle 群では、心筋壊死、出血及び急性心筋炎、並びに急性腎尿細管壊死及び尿細管円柱の重症化が認められた。また、大動脈内側の半月弁に付着した急性線維性血栓が認められ、これが脳で記録された線維性血栓塞栓を引き起こした可能性が最も高いと考えられた。一般状態の異常所見は心臓及び脳における病理組織学的所見と相関し、TTP 関連病変を反映している可能性がある。TAK-755 群では、vehicle 群に比して、心臓の病理組織学的所見の重症度が用量依存的に低下し、TAK-755（80 U/kg 以上）群では心筋壊死及び急性心筋炎の発現頻度の低下が認められた。TAK-755 群のすべての用量で、腎臓の TTP 関連病変は認められなかった。TAK-755 群と同様に、Octaplas 群では心臓における TTP 関連の病理組織学的所見の重症度が用量依存的に低下した。Octaplas の低用量（1 mL/kg）群では急性腎尿細管壊死の発現頻度が低下し、Octaplas の高用量（5 mL/kg）群では急性腎尿細管壊死が完全に抑制された。

以上より、TAK-755（1～200 U/kg）を予防的に単回投与したとき、一般状態、血小板数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン値、血清 LDH 値、破砕赤血球数、並びに病理組織学的検討から評価した TTP 様症状が用量依存的に軽減されることが示された。また、TAK-755 は、TTP の現在の標準治療である Octaplas と比較して、ヘマトクリット値については同程度の有効性を示し、体重を含む一般状態、ヘモグロビン、破砕赤血球数及び病理組織学的所見については同程度以上の有効性を示した。

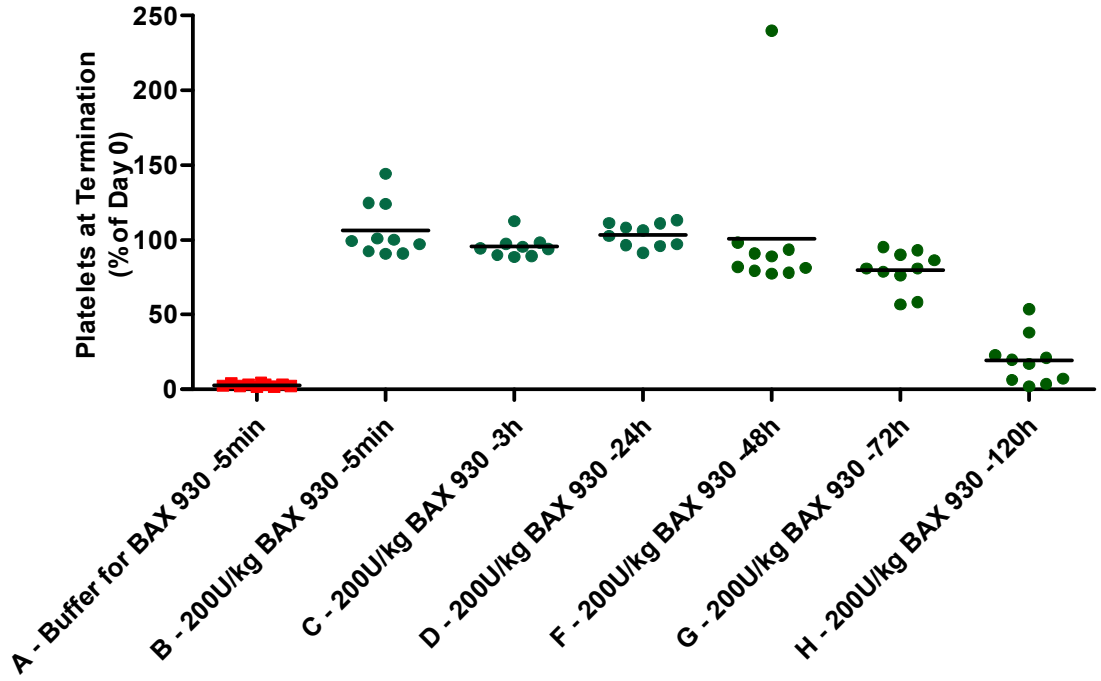
2.6.2.2.2.3 ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおける TAK-755 の予防的投与による経時的有効性

：添付資料番号 4.2.1.1-3（評価）

TAK-755 の予防的投与による経時的有効性を評価するため、ADAMTS13 KO マウス（雌雄各 5 匹／群）に、rVWF（2,000 VWF:RCoU/kg）を投与して TTP を誘発する 5 分前又は 3、24、48、72 及び 120 時間前に、TAK-755（200 U/kg）を予防的に投与した（2.6.3.2.2、4.2.1.1-3）。TAK-755 の用量として選択した 200 U/kg は rVWF 誘発性 TTP モデルにおいて有効性が示されている用量である（4.2.1.1-2）。陰性対照（vehicle）として、製剤緩衝液及び高用量の rVWF を投与した動物を用いた。また、背景対照（control）として ADAMTS13 KO マウスに製剤緩衝液及び高用量の rVWF のいずれも投与しない無投与動物を用いた。TAK-755 の有効性は、TTP の特徴である血小板減少及び血清 LDH 上昇の抑制の程度と定義した。さらに、臓器損傷を病理組織学的に評価しスコア化した。

Vehicle 群又は TAK-755 群において、製剤緩衝液又は TAK-755 の投与後では一般状態の異常所見は記録されなかった。一方、rVWF 投与後では、vehicle 群及び rVWF 投与の 72 時間前に TAK-755 を予防的に投与した群で、それぞれ 10 匹中 1 匹に軽度から中等度の行動抑制がみられた。また、vehicle 群では 10 匹中 1 匹に側臥位が認められたため、rVWF 投与 2 時間後に安楽死させた。

rVWF 投与の 5 分前から 24 時間前に TAK-755 を投与した群で、血小板減少症の発症が予防された。rVWF 投与の 48 時間前から 72 時間前に TAK-755 を投与した群では、軽度の血小板数の減少傾向がみられた。一方、rVWF 投与の 120 時間前に TAK-755 を投与した群では血小板減少症が認められ、血小板数はベースライン値の 19.2%であった。しかし、すべての TAK-755 群で、試験終了時の血小板数は vehicle 群と比べて統計学的に有意に高かった（$p \leq 0.0001$、図 2.6.2.2-4）。

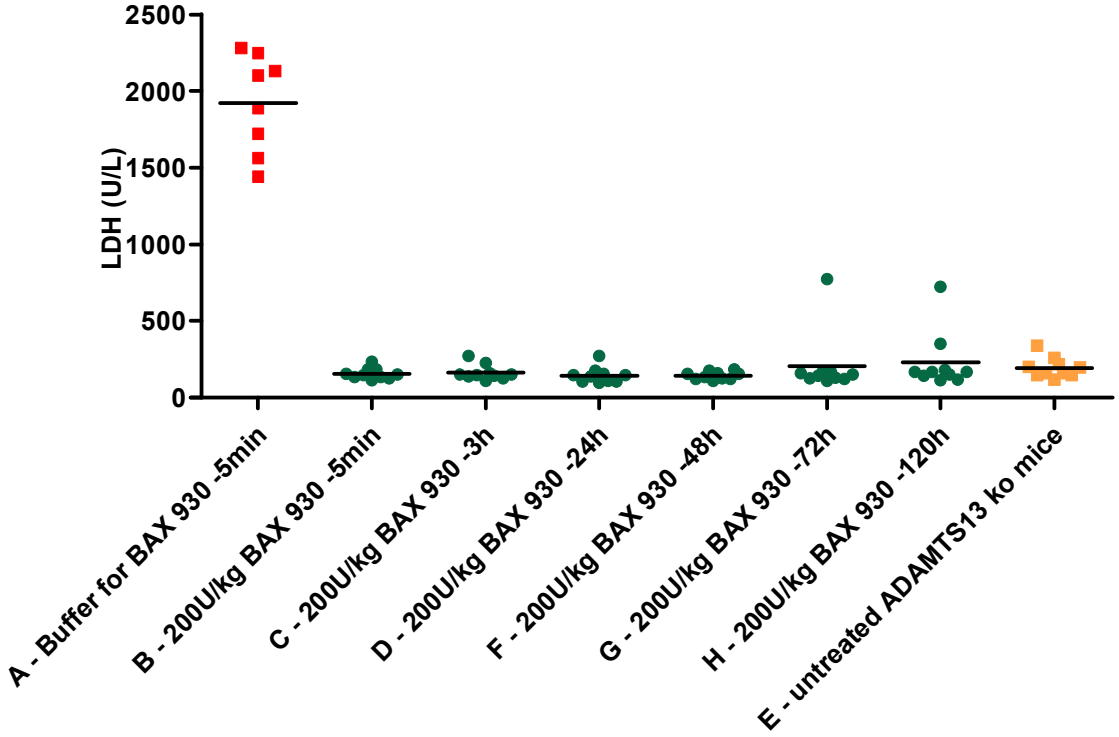


出典：4.2.1.1-3
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト
Group A：vehicle 群

図 2.6.2.2-4　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を経時的に予防的投与したときの血小板数

Vehicle 群では、ヘマトクリット値が 24.5%と顕著に低下した。特に vehicle 群の 1 匹では、ヘマトクリット値は 6.8%と非常に低く、重度の貧血が示唆された。一方、すべての TAK-755 群では、ヘマトクリット値は 32.8%～35.7%であり、TAK-755 によるヘマトクリット値低下に対する予防効果が示された。rVWF の投与前の 72 時間以内に TAK-755 を投与した群では、ヘマトクリット値及びヘモグロビン値の変化並びに破砕赤血球の発現に対する予防効果が示された。rVWF 投与の 120 時間前に TAK-755 を投与した群でも、ヘマトクリット値及びヘモグロビン値は軽度な低下に留まり、破砕赤血球の重症度は一番高い個体でも破砕赤血球 17 個/RBC 1,000 個であった。一方、vehicle 群の破砕赤血球の重症度は、破砕赤血球 35.3 個/RBC 1,000 個であった。

すべての TAK-755 群で、血清 LDH 値は vehicle 群（1,922 U/L）と比較して統計学的に有意に低かった（144～227 U/L、$p \leq 0.0001$、図 2.6.2.2-5）。



出典：4.2.1.1-3
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト、LDH：乳酸脱水素酵素
Group A：vehicle 群、Group E：control 群

図 2.6.2.2-5　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を経時的に予防的投与したときの血清 LDH 値

すべての TAK-755 群で、TTP 関連の心臓病変及び腎臓病変が顕著に減少した。rVWF 投与の 5 分前及び 3 時間前に TAK-755 を投与した群では、心筋病変を含む TTP 関連病変が完全に予防された。rVWF 投与の 24 時間前から 120 時間前に TAK-755 を投与した群では、TAK-755 の投与後から rVWF を投与するまでの投与間隔の延長に伴い、心筋壊死、急性心筋炎及び出血の重症度が上昇した。ただし、これら重症度は、rVWF 投与の 120 時間前に TAK-755 を投与した群の雌における急性心筋炎の重症度を除いて、vehicle 群と比較して低かった。すべての TAK-755 群で、TTP 関連の腎臓病変は認められなかった。

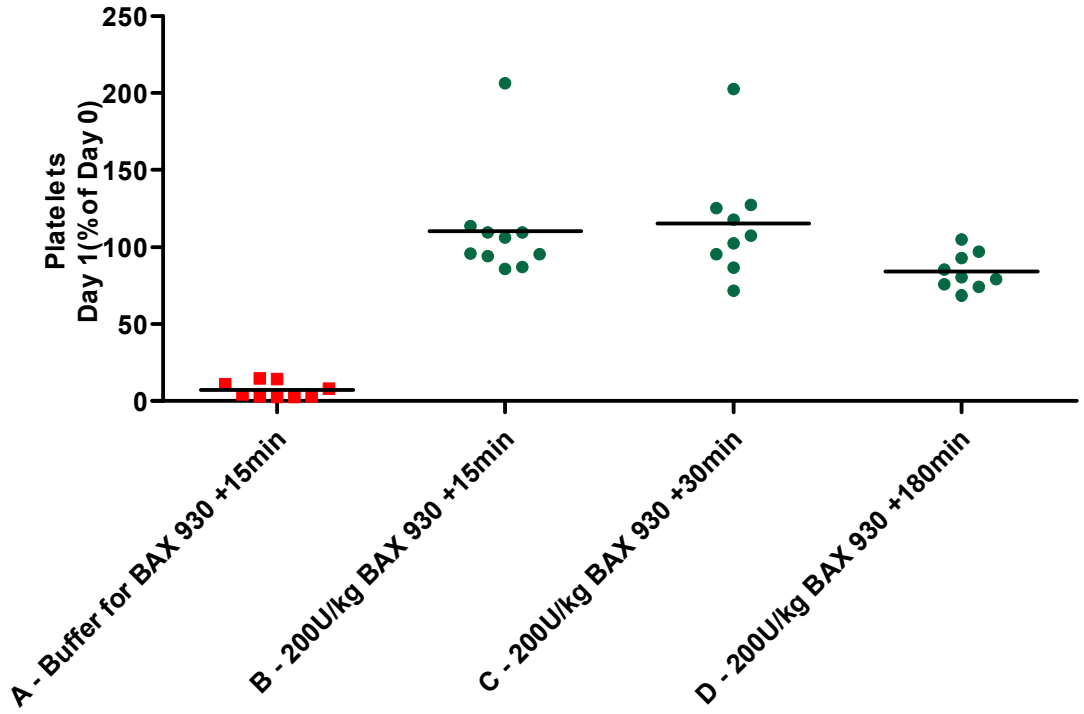
以上より、rVWF 投与の 5 分前から 120 時間前に TAK-755（200 U/kg）を予防的に単回投与したとき、一般状態、血小板数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン値、血清 LDH 値、破砕赤血球数、並びに病理組織学的検討から評価した TTP 様症状が、TAK-755 の投与後から rVWF を投与するまでの投与間隔依存的に軽減されることが示された。

2.6.2.2.2.4 ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおける TAK-755 の治療的投与による有効性

：添付資料番号 4.2.1.1-4（参考）

TAK-755 の治療的投与の有効性を評価するため、ADAMTS13 KO マウス（雌雄各 5 匹／群）に、rVWF（2,000 VWF:RCoU/kg）を投与して TTP を誘発した 15、30 又は 180 分後に TAK-755（200 U/kg）を投与した（2.6.3.2.2、4.2.1.1-4）。TAK-755 の用量として選択した 200 U/kg は rVWF 誘発性 TTP モデルにおいて有効性が示されている用量である（4.2.1.1-2）。陰性対照（vehicle）として、製剤緩衝液及び高用量の rVWF を投与した動物を用いた。また、背景対照（control）として ADAMTS13 KO マウスに製剤緩衝液及び高用量の rVWF のいずれも投与しない無投与動物を用いた。TAK-755 の有効性は、TTP の特徴である血小板減少及び血清 LDH 上昇の抑制の程度と定義した。さらに、臓器損傷を病理組織学的に評価しスコア化した。

rVWF 投与の 15 分後に TAK-755 を投与した群では、一般状態の異常所見は記録されなかった。rVWF 投与の 30 分後又は 180 分後に TAK-755 を投与した群の各群 10 匹中 1 匹で、軽度から中等度の行動抑制がみられた。また、rVWF 投与の 180 分後に TAK-755 を投与する予定であった動物の 10 匹中 1 匹が TAK-755 投与前に死亡したため、この動物は以降の解析から除外した。rVWF 投与の 15 分後又は 30 分後に TAK-755 を投与した群では、血小板数は安定しており、血小板減少症の発症が抑制された。rVWF 投与の 15 分後又は 30 分後に TAK-755 を投与した群の Day 1 における血小板数は、Day 0 において TAK-755 投与直前に評価したベースライン値と同程度であった（110.4%～115.3%）。rVWF 投与の 180 分後に TAK-755 を投与した群では、Day 1 における血小板数は Day 0 と比較してわずかに減少した（84.3%）が、すべての動物で重度の血小板減少症の発症は抑制された（図 2.6.2.2-6）。

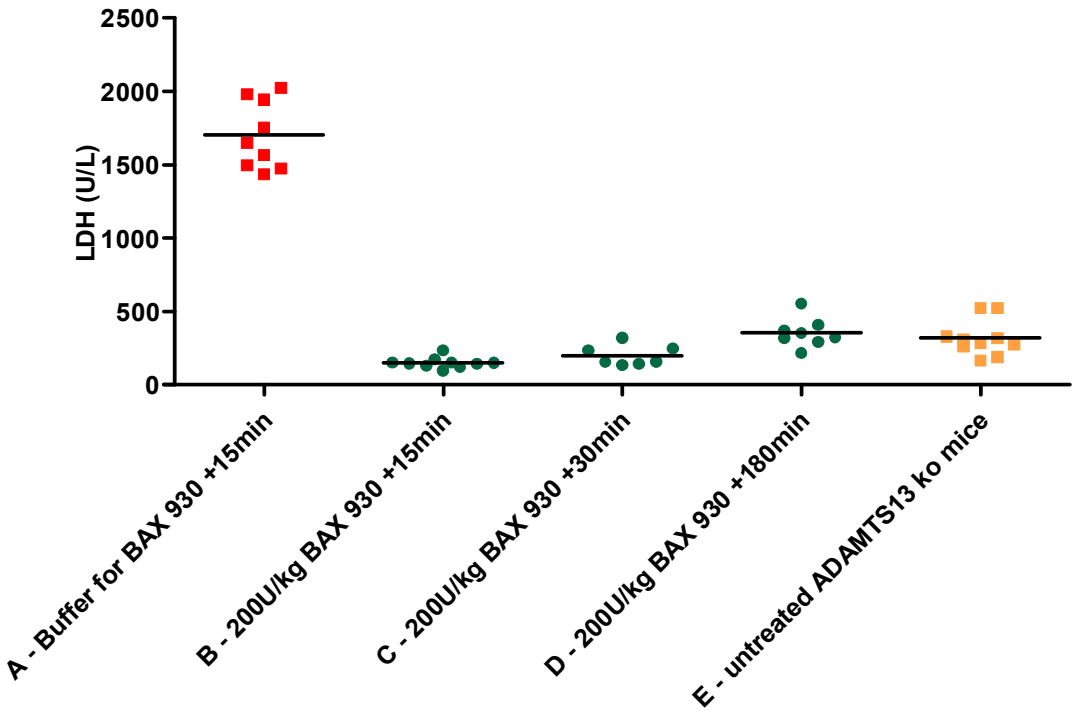


出典：4.2.1.1-4
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト
Group A：vehicle 群

図 2.6.2.2-6　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を治療的投与したときの血小板数

ヘマトクリット値及びヘモグロビン値は、vehicle 群及びすべての TAK-755 群で、control 群と比較して低かったことから、これらパラメーターに対する TAK-755 の治療的投与による短期的な有効性は認められないことが示唆された。

血清 LDH 値は、すべての TAK-755 群で、vehicle 群（1,701 U/L）と比較して統計学的に有意に低く（149～354 U/L、$p \leq 0.0001$）、TAK-755 による血清 LDH 値の上昇抑制作用は rVWF の投与後から TAK-755 を投与する前までの投与間隔に依存していた（図 2.6.2.2-7）。



出典：4.2.1.1-4
ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、BAX 930：TAK-755、KO：ノックアウト、LDH：乳酸脱水素酵素
Group A：vehicle 群,、Group E：control 群

図 2.6.2.2-7　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を治療的投与したときの血清 LDH 値

rVWF 投与の 15 分後又は 30 分後に TAK-755 を投与した群で、破砕赤血球の発現頻度及び重症度が control レベルまで低下した（発現頻度：rVWF 投与の 15 分後又は 30 分後に TAK-755 を投与した群でそれぞれ 10 匹中 3 匹又は 10 匹中 5 匹に対し、control 群で 10 匹中 4 匹、重症度：rVWF 投与の 15 分後又は 30 分後に TAK-755 を投与した群でそれぞれ 0.4 個又は 0.9 個/RBC 1,000 個に対し、control 群で 0.4 個/RBC 1,000 個）。一方、rVWF 投与の 180 分後に TAK-755 を投与した群では、破砕赤血球が 9 匹中 7 匹で認められ、破砕赤血球の重症度は 5.6 個/RBC 1,000 個であった。

rVWF 投与の 180 分後に TAK-755 を投与したすべての動物で TTP 関連の肉眼的又は病理組織学的所見が認められた。TTP 関連の病理組織学的病変は、rVWF 投与の 15 分後又は 30 分後に TAK-755 を投与した群でも認められたが、重症度はより低かった。rVWF 投与の 180 分後に TAK-755 を投与した動物では、TAK-755 の治療効果は小さく、心筋壊死の重症度は vehicle 群と比較して高い傾向を示した。TTP 関連の急性腎尿細管壊死は、vehicle 群でのみ認められ、TAK-755 群では、通常、尿細管円柱は髄質に限定されていた（表 2.6.2.2-1）。

表 2.6.2.2-1　ADAMTS13 KO マウスに TAK-755 を治療的投与したときの心臓及び腎臓の病理組織学的所見

	緩衝液（Vehicle）		TAK-755（200 U/kg）rVWF 投与の 15 分後		TAK-755（200 U/kg）rVWF 投与の 30 分後		TAK-755（200 U/kg）rVWF 投与の 180 分後	
病理組織学的病変	M	F	M	F	M	F	M	F
急性心筋壊死								
発現頻度（匹数／総数）	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
重症度（平均）(a)	3.2	2.6	1.8	2.6	2.2	2.4	3.4	2.8
急性心筋炎								
発現頻度（匹数／総数）	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5
重症度（平均）(a)	3.0	1.8	2.2	2.0	2.6	2.6	3.2	3.0
急性心筋出血								
発現頻度（匹数／総数）	5/5	5/5	3/5	3/5	2/5	2/5	4/5	3/5
重症度（平均）(a)	2.2	1.4	1.0	1.0	1.5	1.0	2.0	2.3
血小板凝集								
発現頻度（匹数／総数）	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
重症度（平均）(a)	-	-	-	-	-	2.0	-	-
急性腎尿細管壊死								
発現頻度（匹数／総数）	2/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
重症度（平均）(a)	1.0	1.0	-	-	-	-	-	-
尿細管円柱								
発現頻度（匹数／総数）	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4/5
重症度（平均）(a)	1.0	1.4	1.0	1.0	1.0	1.3	1.0	1.0

出典：4.2.1.1-4

ADAMTS13：トロンボスポンジン 1 型モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ第 13 番、F：雌、KO：ノックアウト、M：雄、rVWF：遺伝子組換えフォン・ヴィレブランド因子

(a)　変化が認められた動物の重症度：-：特記すべき所見なし、グレード 1：極めて軽度／極めて少数／極めて小規模、グレード 2：軽度／少数／小規模、グレード 3：中等度／中等度の数／中規模、グレード 4：顕著／多数／大規模

以上より、rVWF 投与により TTP を誘発した後に TAK-755（200 U/kg）を治療的に投与したとき、一般状態、血小板数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン値、血清 LDH 値、破砕赤血球数、並びに病理組織学的検討から評価した TTP 様症状が、rVWF の投与後から TAK-755 を投与する前までの投与間隔依存的に軽減されることが示された。

2.6.2.2.2.5 ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおける TAK-755 の治療的投与による用量依存的有効性

：**添付資料番号 4.2.1.1-5（参考）**

TAK-755 の治療的投与による用量依存的な有効性を評価するため、ADAMTS13 KO マウス（雌雄各 5 匹／群）に、rVWF（2,000 VWF:RCoU/kg）を投与して TTP を誘発した 16 分後に、TAK-755（1、5、40、80 又は 200 U/kg）を投与した（2.6.3.2.2、4.2.1.1-5）。陽性対照として Octaplas（5 mL/kg）を投与した動物を用いた。陰性対照（vehicle）として、製剤緩衝液及び高用量の rVWF を投与した動物を用いた。また、背景対照（control）として ADAMTS13 KO マウスに製剤緩衝液及び高用量の rVWF のいずれも投与しない無投与動物を用いた。

rVWF を投与したすべての群で、rVWF 投与により TTP を誘発した直後から、各群数匹から全例で挙尾反応が認められた。Vehicle 群では、雌雄ともに重度の一般状態の異常所見

（例：立毛、運動性低下、呼吸亢進、円背位、半眼、側臥位、よろめき、浅呼吸、無関心、強直性麻痺及び血尿）が認められた。これら所見は本モデルにおける TTP 誘発に関連したものであった。

Control 群及び TAK-755 の最高用量（200 U/kg）群の動物に肉眼的所見は認められなかった。Vehicle 群では多くの肉眼的所見が認められた〔小腸の黒褐色便（雄 5 匹中 1 匹）、肝臓の淡褐色変色（雄 5 匹中 4 匹、雌 5 匹中 4 匹）、黒褐色の液で満たされた胆嚢（雄 5 匹中 4 匹）、左側下顎リンパ節の赤色化（雄 5 匹中 2 匹、雌 5 匹中 1 匹）、胸骨の赤色斑（雌 5 匹中 1 匹）、胸腔の血性液（雄 5 匹中 1 匹、雌 5 匹中 1 匹）及び膀胱の血性液（雌 5 匹中 1 匹）〕。これらの所見は、本モデルにおける TTP 誘発に関連することが示唆される。Octaplas 群では、肉眼的所見が vehicle 群と比較してわずかに減少した〔腹腔の血性液（雄 5 匹中 1 匹）、肝臓の淡褐色変色（雌 5 匹中 1 匹）、胃の赤色斑（雄 5 匹中 1 匹）、黒褐色の液で満たされた胆嚢（雄 5 匹中 1 匹、雌 5 匹中 2 匹）、並びに胸骨の赤色斑及び両側下顎リンパ節の赤色化（いずれも雄 5 匹中 2 匹、雌 5 匹中 1 匹）〕。

TAK-755 群の肉眼的所見を vehicle 群と比較したところ、肉眼的所見は TAK-755 の用量依存的に減少した。Vehicle 群と比較して、TAK-755 の最低用量（1 U/kg）群では肉眼的所見の発現頻度がわずかに低下したのみであったが、TAK-755 の最高用量（200 U/kg）群ではいずれの肉眼的所見の発現も抑制された。

TAK-755 の投与用量の増加に伴い、一般状態の異常所見が減少した。TAK-755（5 U/kg）群では、顕著な又は重度の一般状態の異常所見（例：軽度の立毛、半眼、円背位、血尿、又は尾側後方へ引きずるような症状）が 10 匹中 8 匹に認められた。一方、TAK-755（40、80 及び 200 U/kg）群では、それぞれ 10 匹中 2 匹、10 匹中 1 匹及び 10 匹中 4 匹に一般状態の異常所見が認められたが、それらの多くの所見は中等度であるか、TTP 誘発又は TAK-755 の投与に関連しないものであった（例：TAK-755 高用量群の 2 匹にみられた尾端欠損及び尾の変形）。

Vehicle 群及び TAK-755 群では、control 群と比較して Day 1 の血小板数が顕著に減少した（雄：-20%～-38%、雌：-23%～-46%）。一方、TAK-755 群では、vehicle 群と比較して Day 2 の血小板数が増加し、TAK-755（200 U/kg）群では、vehicle 群と比較して血小板数の増加量が最も大きかった（雄：17 倍、雌：27 倍）。TAK-755（40、80 及び 200 U/kg）群では、vehicle 群と比較して統計学的に有意な血小板数の増加が認められた（$p<0.001$）が、TAK-755（1 及び 5 U/kg）群では vehicle 群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。Octaplas 群では、vehicle 群と比較して Day 2 の血小板数の中等度の増加が認められたが、Octaplas 群の Day 2 の血小板数の増加量は雌では TAK-755 の低用量（5 U/kg）群よりも、雄では TAK-755 の中用量（40 U/kg）群よりも低かった。

破砕赤血球は control 群では 1 匹のみに認められたが、control 群以外の群ではほぼすべての動物で認められた。破砕赤血球の重症度は、雌雄ともに vehicle 群で最も高く、TAK-755 群又は Octaplas 群では、vehicle 群と比較して破砕赤血球の重症度の中等度から顕著な低下がみられた。Vehicle 群と比較した破砕赤血球の重症度の低下程度は、被験物質、用量及び動物の性別に依存して異なっており、TAK-755 の最高用量（200 U/kg）群で破砕赤血球の重症度の低下が最大であった。

Vehicle 群では、血清 LDH 値が control 群と比較して大幅に上昇した（雄：60 倍、雌：8 倍）。TAK-755 群の雄では、血清 LDH 値が用量依存的に低下し、最高用量（200 U/kg）群では control 群と同程度であった。TAK-755 群の雌では、TAK-755（5 U/kg）群で既に血清 LDH 値が control 群よりも低い値を示した。Octaplas 群では、血清 LDH 値は雌雄ともに TAK-755 の最低用量（1 U/kg）群とほぼ同程度まで低下した。

以上より、rVWF 投与の 16 分後に TAK-755 を治療的に投与したとき、誘発された TTP 様症状に対する TAK-755 の用量依存的な治療効果が示された。TAK-755 の最低用量（1 U/kg）群では、破砕赤血球数、LDH 値及び血小板数に対する治療効果は軽度であり、vehicle 群又は Octaplas 群と同程度であった。TAK-755 の用量増加（5～200 U/kg）に伴って、TTP 関連所見の発現頻度及び重症度はさらに低下し、TAK-755（40、80 及び 200 U/kg）群では、vehicle 群と比較して血小板数が統計学的に有意に増加した。TAK-755 の最高用量（200 U/kg）群では、一般状態の異常所見がわずかに認められたのみであり、破砕赤血球数、肉眼的所見、血小板減少症はほとんど認められず、control 群と比較して血清 LDH 値及びヘマトクリット値は正常の範囲であった。

2.6.2.2.2.6 ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおける微小血管血栓の形成及び消失に対する TAK-755 の有効性

TTP の特徴的な病態は微小血管血栓症であり、90%を超える患者に神経機能障害がみられる。このことから、TTP のモデルである ADAMTS13 KO マウスの脳における微小血管血栓の形成及び消失について検討した（2.6.3.2.2）[9]。合計 15 匹の ADAMTS13 KO マウスに rVWF（2,000 VWF:RCoU/kg）を IV 投与して TTP を誘発し、リアルタイム生体顕微鏡を用いて脳における微小血管をモニターし記録した。次に、マウス〔3 群（各 5 匹／群）〕に、溶媒（生理食塩液）若しくは TAK-755（320 U/kg）を rVWF 投与の 10 分前に予防的に、又は rVWF 投与の 30～60 分後（血栓が血管径の約 70%を閉塞した時点）に治療的に、尾静脈内から投与した。頭蓋内顕微鏡を用いた観察から、可溶性 rVWF が血管壁の内皮に接着して自己会合し、血小板の接着が開始した結果、脳の血管損傷を伴わない軟膜微小血管血栓が形成されたことが示された。この際、脳血管内で発生した血栓は、フィブリンを含まない超大型 VWF に付着した活性化していない血小板から構成されていた。rVWF を投与した ADAMTS13 KO マウスの脳血管内において、TAK-755 の予防的投与により rVWF による微小血管血栓の発生が予防され、TAK-755 の治療的投与により rVWF 投与後に脳血管内で発生した血栓又は形成中の血栓が速やかに消失した。

2.6.2.2.2.7 SD ラット及びサルにおける TAK-755 の in vivo 薬理活性の評価

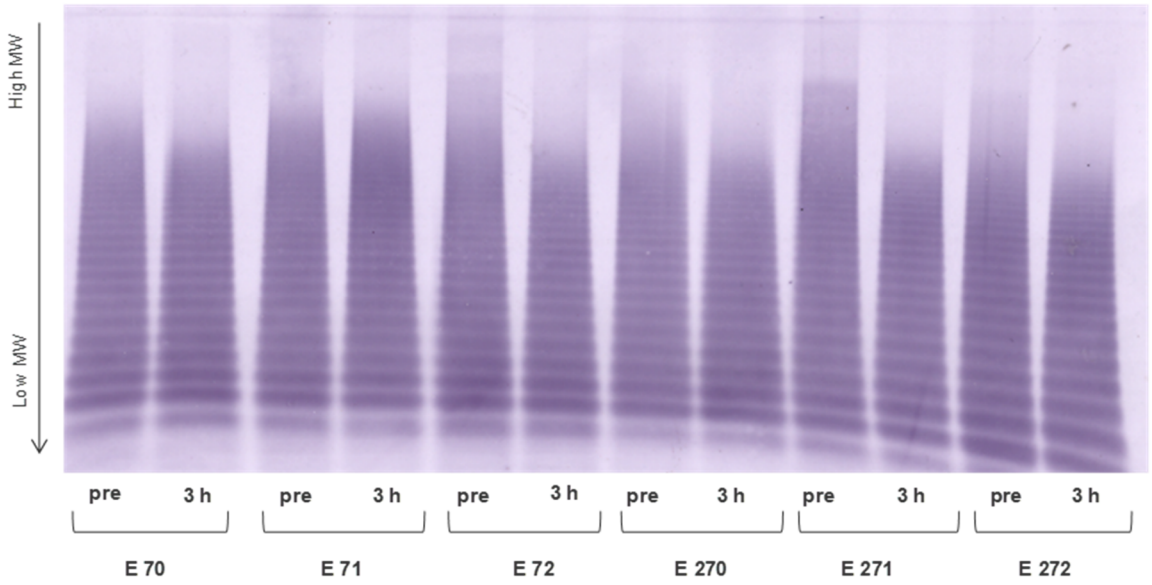
SD ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（2.6.6.3）の検体を用いて、TAK-755 がこれら 2 種の動物種において内因性 VWF の切断作用を示すことを VWF マルチマー解析により検討した。TAK-755 の in vivo 薬理活性は、凝固カスケードで活性を示す高分子量 VWF マルチマーをより小さなフラグメントに切断（又は分解）することである。ラット及びサルの毒性試験の検体を用いて薬理活性を確認するために、低分解能アガロースゲル電気泳動を用いて血漿検体中の VWF マルチマー及びフラグメントを分離し、VWF マルチマーの高さ、パターン、又はサテライトバンド構造の変化について視覚的に評価した。

（1）雌雄 SD ラットを用いた TAK-755 の 28 日間 IV（ボーラス）投与毒性及び 2 週間回復性試験（GLP 適用試験）（血漿検体を用いた VWF マルチマー解析）

：添付資料番号 4.2.3.2-2（評価）

雌雄 SD ラットに TAK-755（80、400 又は 800 U/kg）を 3 日ごとに 28 日間（10 回投与）IV ボーラス投与し、その後 2 週間の回復期間を設けた。なお、溶媒対照（vehicle）として、TAK-755 の製剤緩衝液を 5 mL/kg 容量で投与した動物を用いた（2.6.3.2.2、4.2.3.2-2）。各群は 10 匹（雌雄各 5 匹／群）で構成され、投与前、Day 29（最終投与 1 日後）及び回復期間後（Day 42）に血漿検体を採取し、VWF マルチマー解析を実施した。また、トキシコキネティクス（TK）試験に用いた動物のうち、各群 6 匹（雌雄各 3 匹／群）を用いて、初回投与前及び初回投与 3 時間後に血漿検体を採取し、VWF マルチマー解析を実施した。TK を含む反復投与毒性試験の結果は 2.6.6.3.2 に記載した。

Day 29 のバンドパターンから、TAK-755（400 U/kg）群の 10 匹中 3 匹及び TAK-755（800 U/kg）群の 10 匹中 5 匹において高分子量 VWF マルチマーの減少が認められた。Vehicle 群及び TAK-755（80 U/kg）群では、VWF マルチマーのサイズに明らかな違いは認められなかった。さらに、TK 試験の動物から TAK-755 の初回投与前及び初回投与 3 時間後に採取した検体を用いて VWF マルチマー解析を実施した。TAK-755（80 U/kg）群では、6 匹中 1 匹で投与前に採取した検体と比較して投与 3 時間後の検体で最も高分子量の VWF マルチマーバンドの消失が認められた。TAK-755（400 U/kg）群の 6 匹中 5 匹及び TAK-755（800 U/kg）群の 6 匹中 4 匹では、投与前に採取した検体と比較して投与 3 時間後の検体で、高分子量 VWF マルチマーバンドの消失が認められた。高分子量 VWF マルチマーバンドの消失の一例を図 2.6.2.2-8 に示す。



出典：4.2.3.2-2
MW：分子量、VWF：フォン・ヴィレブランド因子
pre：Day -1 の TAK-755 初回投与前に採取した検体。3 h：Day 1 の TAK-755 初回投与の 3 時間後に採取した検体。
バーの下の E 70、E 71 及び E 72 並びに E 270、E 271 及び E 272 は動物識別番号を示す（E 70、E 71 及び E 72：雄、E 270、E 271 及び E 272：雌）。
動物識別番号 E 70、E 72、E 270、E 271 及び E 272 では、投与前に採取した検体と比較して TAK-755 初回投与の 3 時間後の検体で最も高分子量の VWF マルチマーが消失した。

図 2.6.2.2-8　TAK-755（400 U/kg）を投与したラットにおける高分子量 VWF マルチマーバンドの消失（低分解能アガロースゲル画像）

本試験のラット血漿検体を用いた VWF マルチマー解析のバンドパターンから、TAK-755 の投与により最も高分子量の VWF マルチマーが消失することが示唆された。高分子量 VWF マルチマーの消失が認められた動物数は TAK-755 の用量増加に伴って増加した。また、高分子量 VWF マルチマーの減少は、TAK-755 の最終投与 1 日後と比較して初回投与 3 時間後の血漿検体でより顕著であった。Vehicle 群では高分子量マルチマーバンドの変化は認められなかった。

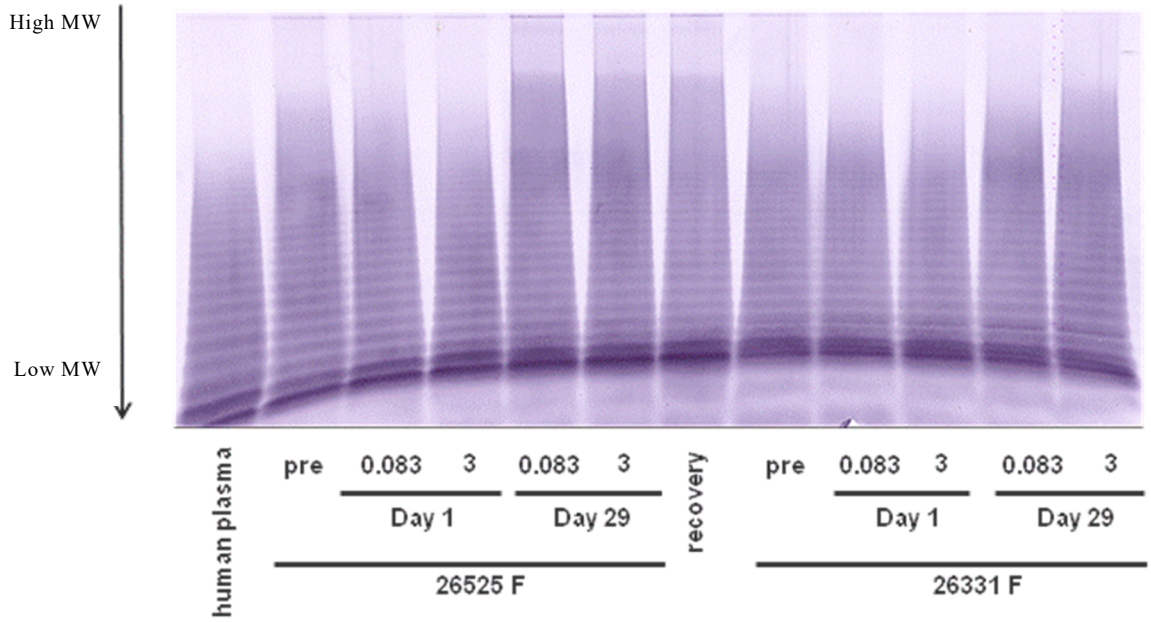
以上より、TAK-755 投与後のラットにおいて内因性 VWF マルチマーの切断が認められたことから、ラットにおける TAK-755 による in vivo での VWF の切断作用が示された。

（2）雌雄カニクイザルを用いた TAK-755 の 4 週間 IV（ボーラス）投与毒性（心血管系及び呼吸系の評価を含む）及び 2 週間回復性試験（GLP 適用試験）（血漿検体を用いた VWF マルチマー解析）

：添付資料番号 4.2.3.2-7（評価）

雌雄カニクイザルに TAK-755（80、200 又は 400 U/kg）を、週 1 回 4 週間（29 日間、5 回投与）、低速で IV ボーラス投与し、その後 2 週間の回復期間を設けた。なお、溶媒対照（vehicle）として TAK-755 の製剤緩衝液を投与した動物を用いた（2.6.3.2.2、4.2.3.2-7）。サルを 4 群に割り付け、各群は 10 匹（雌雄各 5 匹／群）で構成され、このうち 4 匹（雌雄各 2 匹／群）は回復性試験動物として用いた。VWF マルチマー解析のために血漿検体を採取した。TK を含む反復投与毒性試験の結果は 2.6.6.3.7 に記載した。

Vehicle 群では、投与前後の検体における VWF マルチマーバンドのパターンは非常に類似していた。TAK-755（80 U/kg）群では、10 匹中 3 匹で高分子量マルチマーが消失したが、この変化には一貫性がなく、Day 1 又は Day 29 のいずれかで認められた。TAK-755（200 U/kg）群では、投与前後で VWF マルチマーバンドの分布に違いは認められなかった。TAK-755（400 U/kg）群では、10 匹中 4 匹で初回投与前の検体と比較して初回投与後の検体で最も高分子量の VWF マルチマーバンドが消失していた。最も高分子量の VWF マルチマーバンドの消失は初回投与の 3 時間後には認められた（うち 1 匹では投与の 5 分後から認められた）が、反復投与後の Day 29 では認められなかった。すべての回復性試験動物の検体では、VWF マルチマーバンドの分布が初回投与前のバンド分布と非常に類似していた。高分子量 VWF マルチマーバンドの消失の一例を図 2.6.2.2-9 に示す。



出典：4.2.3.2-7
F：雌、MW：分子量、VWF：フォン・ヴィレブランド因子
初回投与前（pre）、Day 1 及び Day 29 の投与 0.083 時間後（5 分後）及び投与 3 時間後にカニクイザルから採取した血漿検体の VWF マルチマーをそれぞれ示す。Recovery：回復期間の最終週に血漿検体を採取した。ヒト血漿をコントロールとした。動物番号 26525F では Day 1（3 時間後）に、動物番号 26331F では、Day 1（0.083 及び 3 時間後）に、最も高分子量領域の染色強度が低下した。

図 2.6.2.2-9　TAK-755（400 U/kg）を投与したサルにおける高分子量 VWF マルチマーバンドの消失（低分解能アガロースゲル画像）

以上より、TAK-755 投与後のカニクイザルにおいて内因性 VWF マルチマーの切断が認められたことから、カニクイザルにおける TAK-755 による in vivo での VWF の切断作用が示された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

ラットの尾端出血モデルを用いて、超生理学的用量の TAK-755（3,111 U/kg）を単独、又は抗血栓薬（エノキサパリン 30 mg/kg 又はアセチルサリチル酸 30 mg/kg）と併用して IV 投与したときの相互作用の可能性について検討した。雄の SD ラット（6 匹／群）に、

TAK-755 を単独又は抗血栓薬と併用して IV 投与し、その 5 分後にラットの尾端を切断した。その結果、超生理学的用量の TAK-755 の単独投与、又はエノキサパリン若しくはアセチルサリチル酸との併用投与のいずれの条件においても、過剰な薬理作用による出血イベント増加のリスクは低いことが示唆された（2.6.3.3.2）[10]。

2.6.2.4 安全性薬理試験

通常、中枢神経系、心血管系及び呼吸系は、安全性薬理コアバッテリーで試験すべき生命維持を司る器官系と考えられている。しかし、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイダンス S7A によれば、試験の選択は被験物質の特性（例：被験物質の治療別分類に関連する作用、効力を裏づける薬力学的作用とは関係のない化学構造又は治療別分類の要素に関連した有害作用、既に実施された安全性薬理試験、副次的薬理試験、毒性試験からの結果又はヒトの使用から得られた結果）に応じて予想される薬理作用に基づくべき、と記されている。また、本ガイダンスには、「特異的受容体に対し高度に標的化を成し遂げたバイオテクノロジー応用製品に対しては、毒性若しくは薬力学的試験の一部分としての安全性薬理エンドポイントを評価することで十分な場合がしばしばある。従って、これらの製品に対しては、安全性薬理コアバッテリー試験を削減または省略することが出来る。」と記されている。

TAK-755 は、よく知られた特異的な作用機序を有するバイオテクノロジー由来のヒト rADAMTS13 であるため、TAK-755 に中枢神経系に影響を及ぼす可能性のある望ましくない薬力学的特性は予想されないことから、中枢神経系に対する独立した安全性薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4.1 中枢神経系

2.6.2.4.1.1 In vivo 中枢神経系評価

：**添付資料番号 4.2.3.1-1（評価）、4.2.3.2-4（評価）、4.2.3.2-7（評価）**

GLP 適用のカニクイザルを用いた単回漸増投与毒性試験（2.6.3.4、4.2.3.1-1）で、すべての動物について、少なくとも 1 日 1 回、行動を含む一般状態、外観及び体重を評価し、健康状態の異常又は TAK-755 投与に対する反応の有無を確認した。TAK-755 の 1,790 U/kg 投与では、中枢神経系への影響を示唆する変化は認められなかった。

GLP 適用のラット（2.6.3.4、4.2.3.2-4）及びカニクイザル（2.6.3.4、4.2.3.2-7）を用いた反復投与毒性試験で、すべての動物の行動、外観及び健康状態の異常について毎日観察した。いずれの試験においても、TAK-755 投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。また、TAK-755 に起因する中枢神経系に関連した所見や脳の病理組織学的所見は認められなかった。ラット及びカニクイザルを用いた試験における無毒性量は、それぞれ 1,820 IU/kg 及び 400 U/kg であった。

以上より、TAK-755 は中枢神経系に影響を及ぼさないと判断した。

2.6.2.4.2 心血管系及び呼吸系

2.6.2.4.2.1 In vivo 心血管系及び呼吸系評価

：**添付資料番号 4.2.3.2-7（評価）**

GLP 適用のカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（2.6.3.4、4.2.3.2-7）で、心血管系及び呼吸系パラメータに及ぼす TAK-755 投与の影響を検討した。カニクイザル（雌雄各 5 匹／群）に、TAK-755 を 80、200 又は 400 U/kg の用量で週 1 回、29 日間（Day 1、8、15、22 及び 29 に計 5 回投与）低速で IV ボーラス投与した。溶媒対照群の動物（雌雄各 5 匹／群）には、製剤緩衝液を投与した。

無麻酔の自由行動下の動物を用いて、投与前 3 時間、投与 2 回目（Day 8）及び 4 回目（Day 22）の投与後並びに回復期間中に、心電図測定用のジャケット式体外テレメトリーシステムを用いて、心血管系〔測定時間（第 II 誘導）：心拍数、PR（心房脱分極開始から心室脱分極開始までの時間）、QRS（心室筋脱分極時間）、QT（心室の脱分極から再分極までの時間）、QTcF（Fridericia 式を用いて心拍数で補正した QT）、不整脈の有無〕の検査を実施した。

無麻酔下の動物を一時的に拘束し、投与前、2 回目、3 回目及び 4 回目の投与後並びに回復期間中に、呼吸数（拘束動物の呼吸相を手動で 15 秒間カウントし、1 分間の呼吸数を算出）及び血圧（高解像度オシロメトリック法による拡張期、収縮期及び平均動脈圧）を測定した。

試験期間を通して、TAK-755 に起因する心毒性、不整脈を含む心電図の異常又は心拍数及び血圧の変化は認められなかった。また、TAK-755 に関連すると考えられる呼吸数の変化は認められなかった。

以上より、カニクイザルに TAK-755 を 400 U/kg の用量まで投与したときの忍容性は良好であり、心血管系又は呼吸系に対する作用は認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

副次的薬理試験（2.6.2.3）として、ラットの尾端出血モデルを用いた TAK-755 とエノキサパリン又はアセチルサリチル酸との相互作用試験を実施した結果、出血傾向は増加しなかった。

2.6.2.6 考察及び結論

In vitro において、TAK-755 は、ADAMTS13 KO マウス、SD ラット、Dunkin Hartley モルモット、カニクイザル及びミニブタの血漿中 VWF を切断することが示された。

In vivo では、ADAMTS13 KO マウスを用いた rVWF 誘発性 TTP モデルにおいて、TAK-755 の予防的投与及び治療的投与による有効性が示された。これらの試験の TAK-755 の用量範囲には cTTP 患者における臨床予定用量（40 IU/kg）の 2 倍及び 5 倍が含まれており、これらの用量における有効性が認められた。TAK-755 の有効性は、TTP 誘発前又は誘発後に投与した場合のいずれにおいても、投与間隔及び用量に依存した。TAK-755 は、現在の標準治療である Octaplas（新鮮凍結ヒト血漿）[11]と比べて、同程度又はわずかに上回る有効性を示した。また、ADAMTS13 KO マウスにおいて、TAK-755 の予防的投与により

rVWF を介した微小血管血栓症の発症を予防し、TAK-755 の治療的投与により rVWF を介して脳血管内で発生した血栓又は形成中の血栓が速やかに消失した[9]。

SD ラット及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、血漿中の VWF マルチマーを解析し、TAK-755 による内因性 VWF の切断作用を示した。本試験において、TAK-755 の投与後に内因性 VWF マルチマーが切断されたことから、SD ラット及びカニクイザルにおいて TAK-755 による in vivo での VWF 切断作用が示された。

ラットの尾端出血モデルにおいて、TAK-755 を超生理学的用量で単独投与又は抗血栓薬であるエノキサパリン若しくはアセチルサリチル酸と併用投与したとき、出血傾向は増加しなかった[10]。

カニクイザルにおける TAK-755 の反復投与後の呼吸機能及び心血管系機能を評価するため、安全性薬理評価を実施した。カニクイザルに TAK-755 を 400 U/kg の用量まで投与したときの忍容性は良好であり、心血管系及び呼吸系に対する有害作用は認められなかった。ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験で TAK-755 をそれぞれ 1,820 IU/kg 及び 400 U/kg の用量で IV 投与したとき、TAK-755 と関連した中枢神経系関連臨床徴候及び脳の病理組織学的所見は認められなかった。さらに、サルに 1,790 U/kg の用量で IV 投与したとき、TAK-755 と関連した CNS 関連臨床徴候は認められなかった。

2.6.2.7 参考文献一覧

[1] Gao W, Anderson PJ, Sadler JE. Extensive contacts between ADAMTS13 exosites and von Willebrand factor domain A2 contribute to substrate specificity. Blood. 2008;112(5):1713-9.

[2] Zheng XL. ADAMTS13 and von Willebrand factor in thrombotic thrombocytopenic purpura. Annu Rev Med. 2015;66:211-25.

[3] Schiviz A, Wuersch K, Piskernik C, Dietrich B, Hoellriegl W, Rottensteiner H, et al. A new mouse model mimicking thrombotic thrombocytopenic purpura: correction of symptoms by recombinant human ADAMTS13. Blood. 2012;119(25):6128-35.

[4] Sanders WE, Read MS, Reddick RL, Garris JB, Brinkhous KM. Thrombotic thrombocytopenia with von Willebrand factor deficiency induced by botrocetin. An animal model. Lab Invest. 1988;59(4):443-52.（添付なし）

[5] Sanders WE Jr, Reddick RL, Nichols TC, Brinkhous KM, Read MS. Thrombotic thrombocytopenia induced in dogs and pigs. The role of plasma and platelet vWF in animal models of thrombotic thrombocytopenic purpura. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995;15(6):793-800.（添付なし）

[6] Ezov N, Levin-Harrus T, Mittelman M, Redlich M, Shabat S, Ward SM, et al. A chemically induced rat model of hemolysis with disseminated thrombosis. Cardiovasc Toxicol. 2002;2(3):181-94.（添付なし）

[7] Chauhan AK, Walsh MT, Zhu G, Ginsburg D, Wagner DD, Motto DG. The combined roles of ADAMTS13 and VWF in murine models of TTP, endotoxemia, and thrombosis. Blood. 2008;111(7):3452-7.（添付なし）

[8] Motto DG, Chauhan AK, Zhu G, Homeister J, Lamb CB, Desch KC, et al. Shigatoxin triggers thrombotic thrombocytopenic purpura in genetically susceptible ADAMTS13-deficient mice. J Clin Invest. 2005;115(10):2752-61.（添付なし）

[9] Adili R, Holinstat M. Formation and resolution of pial microvascular thrombosis in a mouse model of thrombotic thrombocytopenic purpura. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019;39(9):1817-30.

[10] Rossato P, Glantschnig H, Leidenmühler P, Kopic A, Ruthsatz T, Majer B, et al. Absence of exaggerated pharmacology by recombinant ADAMTS13 in the rat and monkey. Blood Coagul Fibrinolysis. 2022;33(1):56-60.

[11] Pandey S, Vyas GN. Adverse effects of plasma transfusion. Transfusion. 2012;52 Suppl 1 (Suppl 1):65s-79s.（添付なし）

目次

2.6.3 薬理試験概要表 2
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....5
2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験：In vitro 試験 5
2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験：In vivo 試験....6
2.6.3.3 副次的薬理試験 11
2.6.3.3.1 副次的薬理試験：In vitro 11
2.6.3.3.2 副次的薬理試験：In vivo.... 11
2.6.3.4 安全性薬理試験 12
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験.... 14

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

Test Article: TAK-755

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP	Testing Facility	Report	添付資料番号	区分
Primary Pharmacodynamics							
In Vitro Studies							
In vitro functional activity/physiological efficacy in different animal species	ADAMTS13 KO mouse, Sprague Dawley rat, Dunkin Hartley guinea pig, minipig, cynomolgus monkey	In vitro	No	[redacted]	ATS0007T01	4.2.1.1-1	参考
In Vivo Studies							
Prophylactic efficacy	ADAMTS13 KO mouse	IV (bolus)	No	[redacted]	WH0610	4.2.1.1-2	評価
Prophylactic efficacy	ADAMTS13 KO mouse	IV (bolus)	No		WH0211	4.2.1.1-3	評価
Therapeutic efficacy	ADAMTS13 KO mouse	IV (bolus)	No		WH0710	4.2.1.1-4	参考
Therapeutic efficacy	ADAMTS13 KO mouse	IV	No		248.220.5098	4.2.1.1-5	参考
Prophylactic and therapeutic efficacy	ADAMTS13 KO mouse	IV (bolus)	No		Adili and Holinstat, 2019 [a]	4.3-1	参考
Pharmacological activity – VWF multimer analysis	Sprague Dawley rat	IV	Yes		PV2511001	4.2.3.2-2	評価
Pharmacological activity – VWF multimer analysis	Cynomolgus monkey	IV (bolus)	Yes		8243420	4.2.3.2-7	評価

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: TAK-755

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP	Testing Facility	Report	添付資料番号	区分
Secondary Pharmacodynamics							
Receptor Binding and Effects on Enzymatic Activity							
None.							
In Vivo Studies							
Bleeding risks – supraphysiologic challenge alone or in combination with antithrombotic drugs in a tail tip bleeding model	Sprague Dawley rat	IV	No	[redacted]	Rossato et al., 2022 [b]	4.3-6	参考
Safety Pharmacology							
Effects on the Central Nervous System							
General conditions, single escalating and repeat dose toxicity	Cynomolgus monkey	IV (bolus)	Yes	[redacted]	8234215 [c]	4.2.3.1-1	評価
General conditions, repeat-dose toxicity	Sprague Dawley rat	IV	Yes	[redacted]	504247 [c]	4.2.3.2-4	評価
General conditions, repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	IV (bolus)	Yes	[redacted]	8243420 [c]	4.2.3.2-7	評価
Effects on the Cardiovascular and Respiratory Systems							
Clinical observations including blood pressure, electrocardiography, and respiratory rate	Cynomolgus monkey	IV (bolus)	Yes	[redacted]	8243420 [d]	4.2.3.2-7	評価

2.6.3.1 薬理試験：一覧表（続き）

Test Article: TAK-755

Type of Study	Test System	Method of Administration	GLP	Testing Facility	Report	添付資料番号	区分
Drug Interactions							
None.							

Additional Information:

ADAMTS13: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13; CNS: central nervous system; GLP: Good Laboratory Practice; IV: intravenous(ly); KO: knock-out; rADAMTS13: recombinant a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13; VWF: von Willebrand factor.

[a] Adili, R. and Holinstat, M. 2019. Formation and Resolution of Pial Microvascular Thrombosis in a Mouse Model of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(9), 1817-30.

[b] Rossato, P., Glantschnig, H., Leidenmühler, P., Kopic, A., Ruthsatz, T., Majer, B., et al. 2022. Absence of exaggerated pharmacology by recombinant ADAMTS13 in the rat and monkey. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 33(1):56-60.

[c] As TAK-755 is a biotechnology-derived human rADAMTS13 with well-known and specific mechanism of action, no dedicated safety pharmacology studies were conducted. For the CNS, no specific safety pharmacology studies were performed. The observation of general conditions (ie, behavior, appearance, body weight) in single- or repeat-dose toxicity studies and histopathology in the repeat-dose toxicity studies in rats and monkeys was considered.

[d] As TAK-755 is a biotechnology-derived human rADAMTS13 with well-known and specific mechanism of action, no dedicated safety pharmacology studies were conducted. Cardiovascular and respiratory system safety pharmacology endpoints were included in 4.2.3.2-7.

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

2.6.3.2.1 効力を裏付ける試験：In vitro 試験

System	Test System	Compound	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
In vitro functional activity/ physiological efficacy in different animal species	ADAMTS13 KO mouse, Sprague Dawley rat, Dunkin Hartley guinea pig, minipig, cynomolgus monkey	TAK-755	VWF from ADAMTS13 KO mice, Sprague Dawley rats, Dunkin Hartley guinea pigs, cynomolgus monkeys, and minipigs was susceptible to TAK-755 cleavage in vitro under denaturing assay conditions. ADAMTS13-mediated VWF multimer degradation was inhibited by an anti-ADAMTS13 antibody or by EDTA, confirming that the observed cleavage of VWF in the animal plasma was specifically achieved by the action of TAK-755. All species tested were considered suitable for nonclinical evaluation of TAK-755 in vivo.	No	ATS0007T01	4.2.1.1-1

Additional Information:

ADAMTS13: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; GLP: Good Laboratory Practice; KO: knock-out; VWF: von Willebrand factor.

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験：In vivo 試験

System	Species/ Strain	Method of Administration	Dose/ Duration	No. and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Prophylactic efficacy in rVWF-induced TTP model	Mouse/ ADAMTS13 KO	IV (bolus)	1, 5, 40, 80, 200 U/kg; single dose	5/sex/group	TAK-755 had dose-dependent efficacy as a prophylactic (prevention of decrease in platelet count and prevention of increased serum LDH [hallmarks of TTP]) in an rVWF-induced TTP, ADAMTS13 KO mouse model. TAK-755 efficacy was similar or slightly improved compared to fresh frozen plasma at equivalent dose levels. Prophylactic single-dose administration of TAK-755 (at 1 U/kg to 200 U/kg) immediately followed by rVWF (at 2000 U rVWF:RCo/kg) led to a dose-dependent alleviation of the triggered disease compared to buffer-treated control (improved platelet count as compared to control [$p \leq 0.0003$] and prevented elevation of serum LDH levels [$p < 0.0001$] at all doses of TAK-755; clinically relevant protection from thrombocytopenia at doses ≥40 U/kg TAK-755; decreased severity of schistocytosis at ≥1 U/kg TAK-755 with further decreased severity as well as incidence at higher doses; dose-dependent reduced mean severity grade of TTP-related histopathologic findings and reduced incidence of myocardial necrosis and neutrophilic inflammation at ≥80 U/kg TAK-755).	No	WH0610	4.2.1.1-2

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験：In vivo 試験（続き）

System	Species/ Strain	Method of Administration	Dose/ Duration	No. and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Prophylactic efficacy over time in rVWF-induced TTP model	Mouse/ ADAMTS13 KO	IV (bolus)	200 U/kg; single dose	5/sex/group	TAK-755 had a treatment interval-dependent prophylactic efficacy (prevention of decrease in platelet count and prevention of increase in serum LDH) in an rVWF-induced TTP, ADAMTS13 KO mouse model. Prophylactic administration of TAK-755 at 5 mins to 120 hours before administration of rVWF (at 2000 U rVWF:RCo/kg) prevented decrease in platelet count; prevented changes in hematocrit or hemoglobin levels or developing schistocytosis, and prevented serum LDH increase ([144-227 U/L] compared to buffer-treated controls [1922 U/L] [p≤0.0001]). Prophylactic administration of TAK-755 at ≤3 hours prior to TTP induction entirely prevented TTP-related lesions including myocardial lesions. Prolongation of interval from TAK-755 to rVWF caused an increase in the severity grade of myocardial necrosis, acute myocardial inflammation, and hemorrhage. However, the severity grade of acute myocardial necrosis and hemorrhage was still lower than in buffer treated controls.	No	WH0211	4.2.1.1-3

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験：In vivo 試験（続き）

System	Species/ Strain	Method of Administration	Dose/ Duration	No. and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Therapeutic efficacy in rVWF-induced TTP model	Mouse/ ADAMTS13 KO	IV (bolus)	200 U/kg; single dose	5/sex/group	TAK-755 treatment interval-dependent therapeutic efficacy (prevention of decrease in platelet count and prevention of increase in serum LDH) was shown in rVWF-induced TTP model in ADAMTS13 KO mice. Administration of TAK-755 at 15, 30, and 180 minutes after administration of rVWF (at 2000 U rVWF:RCo/kg) led to a treatment interval-dependent alleviation of the triggered disease (improved platelet count as compared to control [$p \leq 0.0001$] and serum LDH levels [$p \leq 0.0001$] at 15 to 180 minutes after challenge; prevention of further development of thrombocytopenia at 15 to 180 minutes after challenge; decreased incidence and severity of schistocytosis after 15 and 30 minutes and to lesser extent after 180 minutes; reduced mean severity grade of TTP-related histopathologic findings in the heart after 15 and 30 minutes and minor therapeutic effect of treatment at 180 minutes after challenge). In the kidney, TTP-related lesions were limited to buffer-treated animals.	No	WH0710	4.2.1.1-4

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験：In vivo 試験（続き）

System	Species/ Strain	Method of Administration	Dose/ Duration	No. and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Therapeutic efficacy in rVWF-induced TTP model	Mouse/ ADAMTS13 KO	IV	1, 5, 40, 80, 200 U/kg; single dose	5/sex/group	TAK-755 dose-dependent therapeutic efficacy was shown in rVWF-induced TTP model in ADAMTS13 KO mice. Therapeutic single-dose administration of TAK-755 at 16 min post rVWF administration (at 2000 U rVWF:RCo/kg) led to dose-dependent therapeutic effect compared to buffer-treated controls (improved schistocyte counts, LDH levels, and platelet counts; decreased incidence and severity of TTP findings at 5 U/kg to 200 U/kg TAK-755). TAK-755 efficacy was similar or slightly improved compared to Octaplas (fresh frozen plasma).	No	248.220.5098	4.2.1.1-5
Prophylactic and therapeutic efficacy in rVWF-induced TTP model	Mice/ ADAMTS13 KO	IV (bolus)	320 U/kg; single dose	3M/2F/group	Prophylactic administration of TAK-755 prevented the onset of VWF-mediated microvascular thrombosis. Therapeutic administration of TAK-755 acutely resolved preexisting or growing thrombin in the brain after rVWF challenge.	No	Adili and Holinstat, 2019 [a]	4.3-1

2.6.3.2.2 効力を裏付ける試験：In vivo 試験（続き）

System	Species/ Strain	Method of Administration	Dose/ Duration	No. and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
VWF multimer analysis	Rats/ Sprague Dawley	IV	80, 400, 800 U/kg; single dose on Day 28 of repeat dose admin	10/sex/group	An in vivo degrading effect of TAK-755 on endogenous VWF was shown in Sprague Dawley rats through VWF multimer analysis, on 28-day repeat-dose toxicity study. The loss in high molecular weight multimers was more pronounced in plasma samples taken at 3 h after the first dose compared to 1 day after 28-day repeat dose.	Yes	PV2511001 [b]	4.2.3.2-2
VWF multimer analysis	Monkeys/ Cynomolgus	IV (bolus)	80, 200, 400 U/kg; QW for 4 weeks (5 doses)	5/sex/group	An in vivo degrading effect of TAK-755 on endogenous VWF was shown in cynomolgus monkeys through VWF multimer analysis.	Yes	8243420 [b]	4.2.3.2-7

Additional Information:

ADAMTS13: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13; admin: administration; F: female(s); GLP: Good Laboratory Practice; IV: intravenous(ly); KO: knock-out; LDH: lactate dehydrogenase; M: male(s); No.: number; QW: once weekly; RCo: ristocetin cofactor activity; rVWF: recombinant von Willebrand factor; TTP: thrombotic thrombocytopenic purpura; VWF: von Willebrand factor.

[a] Adili, R. and Holinstat, M. 2019. Formation and Resolution of Pial Microvascular Thrombosis in a Mouse Model of Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(9), 1817-30.

[b] Analysis of VWF multimers was conducted in rats and cynomolgus monkeys during the repeat-dose toxicity studies (also described in Tabulated Summaries 2.6.7.7.2 and 2.6.7.7.5).

2.6.3.3 副次的薬理試験

2.6.3.3.1 副次的薬理試験：In vitro

Test Article: TAK-755

System	Test System	Compound	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Receptor Binding and Enzymatic Activity						
None.						
Other Secondary Pharmacodynamic Studies						
None.						

Additional Information:

GLP: Good Laboratory Practice.

2.6.3.3.2 副次的薬理試験：In vivo

Test Article: TAK-755

System	Species/ Strain	Method of Admin.	Dose	No. and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Receptor Binding and Enzymatic Activity								
None.								
Other Secondary Pharmacodynamic Studies								
Bleeding risks – tail tip bleeding model supraphysiologic challenge alone or in combination with antithrombotic drugs	Rats/ Sprague Dawley	IV	3111 U/kg TAK-755 alone or in combination with 30 mg/kg enoxaparin or 30 mg/kg ASA	6M/group	In a rat tail-tip bleeding model, a supraphysiologic dose of TAK-755 did not increase bleeding tendency, either alone or in combination with antithrombotic drugs enoxaparin or ASA.	No	Rossato et al., 2022 [a]	4.3-6

Additional Information:

Admin: administration; ASA: acetylsalicylic acid; GLP: Good Laboratory Practice; IV: intravenous(ly); M: male(s); No.: number.

[a] Rossato, P., Glantschnig, H., Leidenmühler, P., Kopic, A., Ruthsatz, T., Majer, B., et al. 2022. Absence of exaggerated pharmacology by recombinant ADAMTS13 in the rat and monkey. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 33(1):56-60

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: TAK-755

Organ System	System or Species/Strain	Method of Administration	Dose [a] (U/kg)	Number and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Effects on the Central Nervous System								
General conditions; single escalating and repeat dose toxicity	Cynomolgus monkey	IV (bolus)	200 or 1790 (escalating-dose phase); 800 QW for 4 weeks (5 doses)	4M/4F for escalating dose; 2M/2F for repeat dose and 1M/1F for control group	No observations of general conditions including behavior, appearance, and body weight.	Yes	8234215 [b]	4.2.3.1-1
General conditions, repeat-dose toxicity	Sprague Dawley rat	IV	800 or 1820 IU/kg QD for 30 days [c]	10/sex/group for main study; 5/sex/group for recovery	No observations of general conditions or histopathology	Yes	504247 [b]	4.2.3.2-4
General conditions, repeat-dose toxicity	Cynomolgus monkey	IV (bolus)	80, 200, or 400 QW for 4 weeks (5 doses)	5/sex/group	No observations of general conditions or histopathology	Yes	8243420 [b, d]	4.2.3.2-7

Test Article: TAK-755

Organ System	System or Species/Strain	Method of Administration	Dose [a] (U/kg)	Number and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
Effects on the Cardiovascular and Respiratory Systems								
Cardiovascular (Telemetry) and Respiratory System	Monkeys/ Cynomolgus	IV (bolus)	80, 200, or 400 QW for 4 weeks (5 doses)	5/sex/group	No adverse cardiovascular or respiratory effects	Yes	8243420 [d, e]	4.2.3.2-7

Additional Information:

ADAMTS13: a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13; CNS: central nervous system; FRETS: fluorescence resonance energy transfer substrate; GLP: Good Laboratory Practice; F: female(s); IV: intravenous(ly); M: male(s); QD: once daily; NIBSC: National Institute for Biological Standards and Controls; QW: once weekly; rADAMTS13: recombinant a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13; VWF: von Willebrand factor; VWF73: von Willebrand factor peptide substrate composed of 73 amino acid residues.

[a] Single dose unless specified otherwise.

[b] As TAK-755 is a biotechnology-derived human rADAMTS13 with well-known and specific mechanism of action, no dedicated safety pharmacology studies were conducted. For the CNS, no specific safety pharmacology studies were performed. The observation of general conditions (ie, behavior, appearance, body weight) in single- or repeat-dose toxicity studies and histopathology in the repeat-dose toxicity studies in rats and monkeys was considered.

[c] Dosing was based on International Units (IU) in this study. In 2014, the World Health Organization (WHO) 1st International Standard for ADAMTS13 (NIBSC code: [redacted]) was established. As a consequence, a recombinant secondary reference standard ([redacted]) was produced internally, calibrated versus the new WHO Standard for ADAMTS13 and introduced for testing and release of material. The change from normal pooled plasma (expressed in U) to the recombinant reference standard (expressed in IU), calibrated versus the WHO Standard, resulted in a [redacted] of [redacted]% for the activity assay FRETS VWF73.

[d] Analysis of VWF multimers was conducted in cynomolgus monkeys (described in Tabulated Summary 2.6.3.2.2).

[e] As TAK-755 is a biotechnology-derived human rADAMTS13 with well-known and specific mechanism of action, no dedicated safety pharmacology studies were conducted. Cardiovascular and respiratory system safety pharmacology endpoints were included in 4.2.3.2-7.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

System	Species/ Strain	Method of Administration	Dose	Number and Sex per Group	Noteworthy Findings	GLP	Report	添付資料番号
None.								