目次

略号一覧表 3
2.4 非臨床試験の概括評価 4
2.4.1 非臨床試験計画の概要 4
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 5
2.4.2.1.1 血友病 A マウスモデルにおける TAK-672 の有効性 5
2.4.2.1.2 血友病 A イヌモデルにおける TAK-672 の有効性 6
2.4.2.2 副次的薬理作用 6
2.4.2.3 安全性薬理試験 6
2.4.2.4 薬理学的相互作用 6
2.4.3 薬物動態試験 7
2.4.3.1 分析方法 7
2.4.3.1.1 血漿中 FVIII 活性の測定 7
2.4.3.2 吸収 7
2.4.3.2.1 単回静脈内投与 7
2.4.3.2.2 反復静脈内投与 8
2.4.3.3 分布 10
2.4.3.4 代謝 10
2.4.3.5 排泄 10
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 11
2.4.3.7 その他の薬物動態試験 11
2.4.4 毒性試験 11
2.4.4.1 概要 11
2.4.4.2 単回投与毒性試験 12
2.4.4.3 反復投与毒性試験 12
2.4.4.4 遺伝毒性試験 14
2.4.4.5 がん原性試験 14
2.4.4.6 生殖発生毒性試験 14
2.4.4.7 局所刺激性試験 15
2.4.4.8 その他の毒性試験 15
2.4.4.8.1 免疫原性試験 15
2.4.5 総括及び結論 17
2.4.6 参考文献一覧 21

表

表 2.4.2-1 薬理試験の概要 5

表 2.4.3-1　薬物動態プログラムの概要 7
表 2.4.3.2-1　血友病 A イヌに TAK-672 又は Hyate:C を単回静脈内投与したときの FVIII の薬物動態パラメータ 8
表 2.4.3.2-2　カニクイザルに TAK-672 又は Hyate:C を単回静脈内投与したときの FVIII の薬物動態パラメータ 8
表 2.4.3.2-3　カニクイザルに TAK-672 又は Hyate:C を反復投与したときの ベースライン補正後の FVIII の薬物動態パラメータ 9
表 2.4.3.2-4　TAK-672 の単回又は反復静脈内投与後の各動物種の薬物動態パラメータの比較 10
表 2.4.4.1-1　毒性プログラムの概要 12
表 2.4.4.3-1　NOAEL 14
表 2.4.5-1　サルへの反復投与後の曝露量とヒトへの推奨される臨床治療用量投与後の曝露量の比較 19

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
AHA	acquired hemophilia A	後天性血友病 A
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
BU	bethesda unit(s)	ベセスダ単位
CBT	cuticle bleeding time	爪上皮出血時間
CHA	congenital hemophilia A	先天性血友病 A
CL	plasma clearance	血漿クリアランス
C_{max}	peak plasma level	最高血漿中濃度
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ED_{50}	median effective dose	50%有効量
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
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
hFVIII	human coagulation factor VIII	ヒト血液凝固第 VIII 因子
ICH	international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
OSCA	one-stage coagulation assay	凝固一段法
pFVIII	porcine coagulation factor VIII	ブタ血液凝固第 VIII 因子
rpFVIII	recombinant porcine coagulation factor VIII	遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子
TAK-672	Product code name for rpFVIII; formerly OBI-1, BAX801, BAX802, and SHP672	rpFVIII の製品コード名（旧称：OBI-1、BAX801、BAX802、SHP672）
U	unit(s)	単位
V_{dss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
VWF	von Willebrand factor	フォン・ヴィレブランド因子

2.4 非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画の概要

TAK-672〔遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子（rpFVIII）、OBI-1、BAX801、BAX802、SHP672〕は成人の後天性血友病 A（AHA）患者の出血事象の治療を目的として開発された。AHA はまれな出血性疾患であり、AHA 患者は正常なヒト血液凝固第 VIII 因子（hFVIII）遺伝子を有するが、hFVIII に対する自己抗体が発現している。これらの自己抗体が hFVIII を中和するため、血液凝固第 VIII 因子（FVIII）の凝血促進活性が阻害される。

In vitro 機能特性評価試験には、発色合成基質法及び凝固一段法（OSCA）により測定した生物学的活性に加え、トロンビンによる活性化の動態、ヒトフォン・ヴィレブランド因子（VWF）に対する TAK-672 の結合親和性が含まれる。

非臨床効力薬理試験において、血友病 A の標準的な動物モデル〔FVIII 遺伝子エクソン 16 を標的として欠損させ、C57BL/6 マウスと戻し交配して作製されたマウスモデル及び重症の先天性血友病 A（CHA）イヌモデル〕を用いて TAK-672 の止血効果を評価した。

安全性薬理は薬理試験及び毒性試験の一部として、それぞれ血友病 A イヌ及びカニクイザルで評価した。

動物種間の薬物動態パラメータの比較の結果、血友病 A イヌ、カニクイザル及びヒト血友病 A 患者間で顕著な違いはみられなかった。このことは毒性試験の非げっ歯類の動物種としてカニクイザルを選択したことを支持する結果であった。

毒性試験プログラムとして、血友病 A イヌ及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に則った、カニクイザルを用いた最長 90 日間の反復投与毒性試験を実施した。抗 pFVIII 中和抗体の発現は反復投与毒性試験で評価した。免疫原性は遺伝子組換え hFVIII で事前感作した血友病 A マウス及びカニクイザルで評価した。

局所刺激性は反復投与毒性試験の一部として評価した。

非臨床試験では、TAK-672 の評価のベンチマークとして、ブタ血漿由来 FVIII である Hyate:C を対照薬として使用した。Hyate:C は米国で販売されていたが、2004 年製造中止となった。非臨床試験における Hyate:C と TAK-672 の用量は同一ではなく、また、その生物学的同等性は評価しなかった。

TAK-672 は遺伝子組換え血液凝固因子タンパク質であり、これらタンパク質製剤に対する遺伝毒性試験は必要とされておらず、in vitro 及び in vivo の一連の標準的な遺伝毒性試験は実施していない。これは、生物学的製剤に対するガイダンス：医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイダンス S6（R1）バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価〔以下、ICH-S6（R1）〕の要件と一致している。がん原性試験は、遺伝子組換えタンパク質では通常実施されないことから、TAK-672 においても実施していない。また、マウス及びサルにおける FVIII に対する中和抗体の産生により、TAK-672 の曝露を維持したうえでの試験の実施が困難であったため、生殖発生毒性試験は実施していない。

非臨床の安全性及び有効性試験は、臨床試験用製剤及び市販予定製剤と同等の製剤を用いて実施された。

2.4.2 薬理試験

TAK-672 の薬理試験の概要を表 2.4.2-1 に示した。

表 2.4.2-1　薬理試験の概要

試験種類 試験期間	投与経路	動物種	動物の性別及び例数／投与群	用量（U/kg）	GLP	試験番号（添付資料番号）
効力薬理	静脈内投与	マウス（血友病 A）	7～8 例[a]	0、10、48、76、120、190	非適用	PCMU-101A（4.2.1.1-1）
効力薬理 安全性薬理	静脈内投与	イヌ（血友病 A）	雄 1 例／雌 2 例（3 U/kg）、雄 1 例／雌 1 例（25 U/kg）、雄 3 例／雌 1 例（100 U/kg）[b]	3、25、100	非適用	PCD-101（4.2.1.1-2）
安全性薬理 反復投与 （28 日間）	静脈内投与	カニクイザル	雄 1 例／雌 1 例	100、300、600、1000	適用	PCM-101（4.2.1.3-2）
安全性薬理 反復投与 （90 日間）	静脈内投与	カニクイザル	雄 6 例／雌 6 例（Days 8、29 及び 91 に雄 2 例／雌 2 例を安楽死させた）	0、82.5、247.5、825	適用	PCM-102（4.2.1.3-3）

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、U：単位

a. 雌雄の例数不明。

b. 総例数は雄 4 例／雌 3 例であり、イヌ 2 例は 2 回投与した。イヌに各被験物質をクロスオーバー法で投与したが、TAK-672 3 U/kg 投与の雌 1 例のみは反復静脈内投与用の静脈アクセスが確保できなかったため、本試験の Hyate:C パートの前に除外された。

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

TAK-672 の in vitro 機能特性評価試験には、発色合成基質法及び OSCA により測定した生物学的活性に加え、トロンビンによる活性化の動態、ヒト VWF に対する結合親和性が含まれる。原薬の in vitro 機能特性評価の概要は 3.2.S.3.1 に示した。

TAK-672 の止血効果を in vivo で検討するために、2 種類の血友病 A 動物モデル（血友病 A マウスモデル及び血友病 A イヌモデル）を用いた。

2.4.2.1.1 血友病 A マウスモデルにおける TAK-672 の有効性

血友病 A マウスでは、FVIII 遺伝子のエクソン 16 にネオマイシン発現カセットを挿入することにより、血友病の遺伝子型が発現する。本マウスの FVIII 活性は正常値の 1%未満である[1][2][3]。

尾切断による死亡率を評価する試験方法[3]を改変し、マウス 50%生存率を示す推定用量が得られる手順とした（PCMU-101A 試験）。

標準化された尾切断による出血性損傷後、生存率が 50%となる用量〔50%有効量（ED_{50}）〕は TAK-672 では 89 単位（U）/kg（95%信頼区間：65～120 U/kg）と推定され、Hyate:C の推定 ED_{50} である 64 U/kg（95%信頼区間：34～87 U/kg）との間に有意な有効性の違いは認められなかった。

以上のように、血友病 A モデルマウスに TAK-672 を静脈内投与した結果、用量依存的に失血量が減少し、TAK-672 群と Hyate:C 群の ED_{50} の間に統計学的有意差は認められなかった。

2.4.2.1.2 血友病 A イヌモデルにおける TAK-672 の有効性

重症の CHA イヌは FVIII 製剤の有効性評価に広く用いられている[4][5]。同系交配及び選択的異系交配を通じて、雌雄ともホモ接合遺伝子の欠陥を有し、臨床的に出血傾向を示す。これらのイヌには内因性の FVIII が実質的に存在しない。

血友病 A イヌの爪上皮出血時間（CBT）の測定は、製剤の有効性評価の方法として標準化されている[6]。損傷による爪上皮からの出血は、循環血中の FVIII が上昇するか、焼灼処置がなされるまで継続する。

血友病 A イヌモデル（各群 n=2～4）に 3、25 又は 100 U/kg の TAK-672 又は対照物質である Hyate:C のいずれかを、無作為化クロスオーバー法により単回ボーラス投与した（PCD-101 試験）。25 及び 100 U/kg の TAK-672 を投与したすべてのイヌで CBT が短縮し、TAK-672 の止血効果が示された。延長した CBT は、3～100 U/kg の TAK-672 又は Hyate:C の投与により短縮した〔TAK-672 投与により平均して 11.2 分（投与前）が 6.4 分（投与後）に短縮、Hyate:C 投与により平均して 8.0 分（投与前）が 6.8 分（投与後）に短縮）〕。

以上のように、血友病 A マウスモデル及び血友病 A イヌモデルを用いた試験により、TAK-672 の止血効果が確認された。

2.4.2.2 副次的薬理作用

独立した副次的薬理試験は実施していない。副次的薬理作用は薬理試験及び毒性試験において評価した。

2.4.2.3 安全性薬理試験

安全性薬理（中枢神経系、呼吸器系及び循環器系への影響）は、血友病 A イヌを用いた薬理試験及びカニクイザルを用いた毒性試験の一部として評価した。

3、25 及び 100 U/kg の TAK-672 を投与した血友病 A イヌにおいて、一般状態、体温、心拍数及び呼吸数への影響はみられなかった（PCD-101 試験）。

カニクイザルを用いた 28 日間の用量漸増反復投与毒性試験において、TAK-672 の用量を 7 日間ごとに漸増して（100、300、600 及び 1000 U/kg）、1 日 1 回投与したとき、有害な作用を示唆する一般状態並びに体温、呼吸数、心拍数及び血圧のベースラインからの変化はみられなかった（PCM-101 試験）。カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験において、82.5、247.5 又は 825 U/kg の TAK-672 を 1 日 1 回投与したとき、TAK-672 投与と直接関連があると考えられる一般状態の変化はなく、心電図（投与開始前並びに Day 1、7、28 及び 90 の投与前に測定）の変化もみられなかった（PCM-102 試験）。

以上の安全性薬理試験の結果から、TAK-672 の反復投与後に、中枢神経系、循環器系及び呼吸器のパラメータに有害な作用は認められなかった。

2.4.2.4 薬理学的相互作用

TAK-672 は単剤で使用されるため、薬理学的相互作用の試験は実施していない。

2.4.3 薬物動態試験

TAK-672 の有効性及び潜在的な毒性の検討に使用した動物種を用いて、薬物動態を評価した。

TAK-672 の薬物動態試験の概要を表 2.4.3-1 に示した。

表 2.4.3-1 薬物動態プログラムの概要

試験種類 試験期間	投与経路	動物種	動物の性別及び例数／投与群	用量 (U/kg)	試験番号 (添付資料番号)
薬物動態 単回投与	静脈内投与	イヌ（血友病 A）	雄 1 例／雌 2 例（3 U/kg）、雄 1 例／雌 1 例（25 U/kg）、雄 3 例／雌 1 例（100 U/kg）[a]	3、25、100	[redacted]/PKR/019 (4.2.2.2-1)
薬物動態 単回投与	静脈内投与	カニクイザル	雄 4 例	49.5、77	[redacted]/PKR/018 (4.2.2.2-2)
薬物動態 反復投与（4 日間）	静脈内投与	カニクイザル	雄 2 例／雌 3 例（40 U/kg）、雄 3 例／雌 2 例（100 U/kg）	40、100	[redacted]/PKR/017 (4.2.2.2-3)
トキシコキネティクス 反復投与（90 日間）	静脈内投与	カニクイザル	雄 6 例／雌 6 例（Days 8、29 及び 91 に雄 2 例／雌 2 例を安楽死させた）	0、82.5、247.5、825	PCM-102 (4.2.2.2-4)

U：単位

a. 総例数は雄 4 例／雌 3 例であり、イヌ 2 例は 2 回投与した。イヌに各被験物質をクロスオーバー法で投与したが、TAK-672 3 U/kg 投与の雌 1 例のみは反復静脈内投与用の静脈アクセスが確保できなかったため、本試験の Hyate:C 投与の前に除外された。

2.4.3.1 分析方法

2.4.3.1.1 血漿中 FVIII 活性の測定

血漿中 FVIII 活性の測定は、標準的な測定法を各実験動物種の血漿中ブタ血液凝固第 VIII 因子（pFVIII）活性の測定用に改良して実施した。

抗凝固活性は OSCA 及び／又は発色合成基質法を用いて検討した。血友病 A イヌを用いて両測定方法の再現性を評価した。

カニクイザルの血漿中 FVIII 活性を測定するために、PCM-104 試験及び PCM-105 試験で発色合成基質法を確立した。90 日間反復投与毒性試験（PCM-102 試験）では、バリデートされた OSCA 及び発色合成基質法を用いてカニクイザルの血漿中 FVIII 活性を評価した。

2.4.3.2 吸収

2.4.3.2.1 単回静脈内投与

TAK-672 の単回静脈内投与後の薬物動態を血友病 A イヌ及びカニクイザルで評価し、Hyate:C と比較した。

血友病 A イヌ（[redacted]/PKR/019 報告書）で、TAK-672 の全身曝露量〔最高血漿中濃度（C_{max}）、血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）〕は用量依存的（3、25 及び 100 U/kg）に増加したが、

増加幅は用量比を下回った（表 2.4.3.2-1）。TAK-672 の曝露量は一貫して Hyate:C より高かった。

表 2.4.3.2-1　血友病 A イヌに TAK-672 又は Hyate:C を単回静脈内投与したときの FVIII の薬物動態パラメータ

被験物質	TAK-672（U/kg）			Hyate:C（U/kg）		
用量（U/kg）	3	25	100	3	25	100
薬物動態パラメータ						
$AUC_{0-\infty}$ (U.h/dL)	157±49.97	762, 1950	3399±2569	22.1, 104	206, 425	1220±506
C_{max} (U/dL)	20.9±1.65	110, 141	466±162	8.20, 9.10	33.0, 42.7	143±5.65
T_{max} (h)	0.27 (0.25 - 0.50)	0.25, 1.0	0.25 (0.23 - 0.40)	0.25, 0.25	0.25, 0.50	0.38 (0.25 - 0.50)
CL (dL/kg)/h	0.023±0.01	0.014, 0.036	0.049±0.04	0.029, 0.136	0.059, 0.121	0.092±0.034
V_{dss} (dL/kg)	0.184±0.02	0.275, 0.284	0.429±0.19	0.359, 0.380	0.758, 0.872	1.048±0.31
$t_{1/2}$ (h)	5.874±1.97	5.785, 13.58	8.409±1.90	1.839, 8.677	5.077, 9.079	9.257±1.28

n≥3：平均値±標準偏差、T_{max}：中央値及び値域、n=2：個々の値
薬物動態パラメータは発色合成基質法で得られたデータに基づき算出した。
$AUC_{0-\infty}$：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、FVIII：血液凝固第 VIII 因子、CL：血漿クリアランス、C_{max}：最高血漿中濃度、$t_{1/2}$：消失半減期、T_{max}：最高血漿中濃度到達時間、U：単位、V_{dss}：定常状態における分布容積

カニクイザルを用いた試験（[redacted]/PKR/018 報告書）でもイヌを用いた試験と同様に、血漿 CL は Hyate:C より TAK-672 で低かったため、TAK-672（49.5 又は 77 U/kg）の血漿中曝露量は Hyate:C（100 U/kg）の血漿中曝露量より高かった（表 2.4.3.2-2）。

表 2.4.3.2-2　カニクイザルに TAK-672 又は Hyate:C を単回静脈内投与したときの FVIII の薬物動態パラメータ

被験物質	TAK-672（4 例／投与群）		Hyate:C（3 例）[a]
用量（U/kg）	49.5	77	100
薬物動態パラメータ（ベースライン値補正後の FVIII）			
AUC_{0-t} (U.h/dL)	826±298	1011±710	255±213
$AUC_{0-\infty}$ (U.h/dL)	944±276	1443±1390	91.8, 934
C_{max} (U/dL)	107±22.6	169±32.2	78.7±20.4
T_{max} (h)	0.975 (0.33 - 1.00)	0.33 (0.33 - 0.87)	0.7 (0.33 - 1.20)
CL (dL/kg)/h	0.056±0.02	0.085±0.05	0.107, 1.09
V_{dss} (dL/kg)	0.576±0.33	0.806±0.26	1.54, 3.21
$t_{1/2}$ (h)	6.71±3.61	8.33±5.09	1.32, 18.7

平均値±標準偏差で示した。T_{max} は中央値及び値域で示した。
$AUC_{0-\infty}$：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{0-t}：投与後 0 時間から最終測定時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、CL：血漿クリアランス、C_{max}：最高血漿中濃度、FVIII：血液凝固第 VIII 因子、$t_{1/2}$：消失半減期、T_{max}：最高血漿中濃度到達時間、U：単位、V_{dss}：定常状態における分布容積
a. 1 例のサルの濃度が不十分であったため、3 例中 2 例から薬物動態パラメータを算出した（AUC_{0-t} 及び C_{max} 以外は個々の値を示した）。

2.4.3.2.2 反復静脈内投与

カニクイザルを用いた 2 つの試験で、反復投与後の TAK-672 の薬物動態を評価し、Hyate:C と比較した。

カニクイザルでの薬物動態パラメータを 8 回投与後（12 時間ごとに 4 日間）に評価した（[redacted]/PKR/017 報告書）。

FVIII 製剤の全身曝露量は反復投与により増加した。TAK-672 又は Hyate:C を同用量で投与したとき、Day 1 及び 4 のいずれにおいても、TAK-672 の血漿中曝露量は Hyate:C の血漿中曝露量より高かった（表 2.4.3.2-3）。

表 2.4.3.2-3　カニクイザルに TAK-672 又は Hyate:C を反復投与したときのベースライン補正後の FVIII の薬物動態パラメータ

	Day 1（12 時間までの血漿中活性に基づく）			Day 4[a]		
被験物質	TAK-672		Hyate:C	TAK-672		Hyate:C
動物の性別（雄／雌）及び例数	雄 2 例／雌 3 例	雄 3 例／雌 2 例	雄 3 例／雌 3 例	雄 2 例／雌 3 例	雄 3 例／雌 2 例	雄 3 例／雌 3 例
用量（U/kg）	40	100	100	40	100	100
$AUC_{0\text{-}t}$ (U.h/dL) (AUC_{τ} at Day 4)	276±104	1585±865	574±321	835±342	2743±1241	1372±507
C_{max} (U/dL)	73±9.24	230±66.5	101±28	131±22.3	362±90.5	210±53.5
C_{min} (U/dL)	-	-	-	23±26.2	142±95.0	40±32.4
C_{avg} (U/dL)	-	-	-	70±28.5	229±103	114±42.3
T_{max} (h)	0.50 (0.50 - 1.00)	0.50 (0.50 - 1.00)	0.50 (0.50 - 1.00)	-	-	-
CL (dL/kg)/h	-	-	-	0.067±0.06	0.042±0.02	0.085±0.04
V_{dss} (dL/kg)	-	-	-	0.575±0.31	0.566±0.09	1.038±0.53
peak trough fluctuation (%)[b]	-	-	-	214±189	110±45.9	161±67.6

平均値±標準偏差で示した。T_{max} は中央値及び値域で示した。

$AUC_{0\text{-}t}$：投与後 0 時間から最終測定時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{τ}：1 投与間隔内の血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{avg}：定常状態における平均血漿中濃度、CL：定常状態における血漿クリアランス、C_{max}：最高血漿中濃度（Day 4 は定常状態における C_{max}）、C_{min}：定常状態における最低血漿中濃度、FVIII：血液凝固第 VIII 因子、T_{max}：最高血漿中濃度到達時間、U：単位、V_{dss}：定常状態における分布容積

a. 定常状態のデータ

b. ピーク時の値とトラフ時の値を比較したときの変動率

90 日間反復投与毒性試験（PCM-102 試験）において、TAK-672 を 82.5、247.5 又は 825 U/kg の用量で 1 日 1 回投与したときの血漿中 FVIII 活性を評価した。

Day 1 及び 7 の投与 1 時間後に、血漿中 FVIII 活性は最大で約 3000 U/kg まで上昇した。TAK-672 群及び Hyate:C 群のいずれにおいても、FVIII ベースライン値は Day 1 より Day 7 の方が高く、血中 FVIII の蓄積性が認められた。

すべてのサルにおいて、サルの内因性 FVIII に交差反応を示す抗 pFVIII 中和抗体が産生されため、Day 28 及び 90 までに血漿中 FVIII 活性は顕著に低下した（中和抗体は「後天性血友病」様の臨床所見を誘発する場合がある）。

総合すると、単回投与後の TAK-672 の曝露量（C_{max}、AUC）は、血友病 A イヌで用量比をやや下回って増加した。血友病 A イヌ及びカニクイザルで、FVIII の血漿中曝露量は TAK-672 投与後の方が Hyate:C 投与後より一貫して大きかった。

カニクイザルへの TAK-672 の反復投与後、1 日 2 回投与では Day 4 まで（8 回投与）、1 日 1 回投与では Day 7 まで（7 回投与）、血中 FVIII の蓄積性が認められた。また、TAK-672 の反復投与後に抗 FVIII 中和抗体が発現した。90 日間反復投与毒性試験では、抗 pFVIII 中和抗体の発現により、Day 28 及び 90 までに血漿中 FVIII 活性が顕著に低下したことから、内因性 FVIII と交差反応することが示唆された。

100 U/kg 投与時の曝露量はカニクイザルとヒトの間で同程度であった（表 2.4.3.2-4）。薬物動態データは、カニクイザルを毒性試験で用いる非げっ歯類の動物種として選択することを支持するものであった。

本用量の反復投与による安全性上の懸念は認められなかった。

表 2.4.3.2-4　TAK-672 の単回又は反復静脈内投与後の各動物種の薬物動態パラメータの比較

薬物動態パラメータ	動物種				
	血友病 A イヌ		カニクイザル		ヒト血友病 A 患者
	100 U/kg 単回投与 [a]	77 U/kg 単回投与 [b]	100 U/kg 単回投与 [c]	100 U/kg 反復投与 [c, d]	100 U/kg 単回投与 [e]
$AUC_{0\text{-}t}$ (U.h/dL)	-	1011±710	1585±865	-	1817±625
$AUC_{0\text{-}\infty}$ (U.h/dL)	3399±2569	1443±1390	-	-	1915±591
AUC_{τ} (U.h/dL)	-	-	-	2743±1241	-
C_{max} (U/dL)	466±162	169±32.2	230±66.5	362±90.5*	151.0±31.5
T_{max} (h)	0.25 (0.23 - 0.40)	0.33 (0.33 - 0.87)	0.50 (0.50 - 1.00)	-	0.53 ± 0.20
CL (dL/kg)/h	0.049±0.04	0.085±0.05	-	0.042±0.02*	0.06±0.024
V_{dss} (dL/kg)[f]	0.429±0.19	0.806±0.26	-	0.566±0.09	0.9±0.7
$t_{1/2}$ (h)	8.409±1.90	8.33±5.09	-	-	-

すべての薬物動態パラメータは、発色合成基質法で得られたデータを基に算出した。
平均値±標準偏差で示した。血友病 A イヌ及びカニクイサルの T_{max} は中央値及び値域で示した。
$AUC_{0\text{-}\infty}$：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0\text{-}t}$：投与後 0 時間から最終測定時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{τ}：1 投与間隔内の血漿中濃度－時間曲線下面積、CL：血漿クリアランス（*反復投与では定常状態における CL）、C_{max}：最高血漿中濃度（*反復投与では定常状態における C_{max}）、$t_{1/2}$：消失半減期、T_{max}：最高血漿中濃度到達時間、U：単位、V_{dss}：定常状態における分布容積、V_z：終末相における分布容積
a. [redacted]/PKR/019 報告書（4.2.2.2-1）
b. [redacted]/PKR/018 報告書（4.2.2.2-2）
c. [redacted]/PKR/017 報告書（4.2.2.2-3）
d. 8 回投与後（4 日間にわたり 12 時間ごとに 1 回投与）
e. OBI-1-101 試験総括報告書（5.3.5.4-2）
f. ヒト血友病 A 患者では、V_z (dL/kg)

2.4.3.3 分布

分布を検討する特定の試験は実施していない。上述のイヌ及びカニクイザルを用いた吸収性評価試験で得られた V_{dss} の値は同程度であり、1 kg あたりの血液量にほぼ等しい。投与した TAK-672 の大部分は循環血中に存在し、それ以外の組織や臓器には分布しないと考えられる。

2.4.3.4 代謝

TAK-672 の代謝及び排泄を検討する試験は実施していない。他の外因性タンパク質を投与した場合と同様に、TAK-672 は最終的に各構成アミノ酸に代謝され、通常のタンパク質の代謝プールに取り込まれると考えられる。したがって、その代謝経路は一般に解明されており、生体内変化を検証する従来の試験を実施する必要はないと考えられる。

2.4.3.5 排泄

排泄試験は実施していない（2.4.3.4）。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

TAK-672 は単剤で投与されるため、薬物動態学的相互作用試験は実施していない。

2.4.3.7 その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 概要

主要な毒性試験に用いる非げっ歯類動物種としてカニクイザルを選択した。TAK-672 はカニクイザルにおいて薬理学的活性を有することが示されている（PCM-102 試験）。また、カニクイザルとヒトの凝固系は類似していることから、カニクイザルは生物学的凝固因子の安全性評価において標準的に使用される動物種である[7]。さらに、サルとヒトの間で CL 及び V_{dss} に意味のある違いは観察されなかった（表 2.4.3.2-4）。

TAK-672 について実施した毒性試験の概要を表 2.4.4.1-1 に示した。

血友病 A イヌで実施した単回投与クロスオーバー試験で、投与ごとに一般状態、心拍数、呼吸数、体温及び体重をモニターした。カニクイザルで実施した単回投与毒性試験で、TAK-672 の静脈内投与後、一般状態、摂餌量及び体重を Day 2 まで 1 日 2 回観察した。

カニクイザルを用いた 28 日間の用量漸増試験で、TAK-672 を 7 日ごとに漸増して 1 日 1 回投与し、TAK-672 の漸増用量の忍容性及び免疫原性を評価した。カニクイザルの一般状態を観察し（投与部位の観察を含む）、体重及びバイタルサインの変化並びに中和抗体の発現を評価した。

カニクイザルを用いて、最大 825 U/kg を投与する 90 日間反復投与毒性試験を実施した。本試験において、TAK-672 の血漿中活性及び抗 FVIII 中和抗体の発現を確認した。

Hyate:C は血漿由来の pFVIII で、米国で販売されていたが製造中止となった薬剤であり、本試験の対照薬として使用した。

TAK-672 は遺伝子組換え血液凝固タンパク質である。遺伝毒性試験はこれらの薬剤には必要とされていないことから、in vitro 及び in vivo の標準的な遺伝毒性試験は実施しなかった。TAK-672 のような遺伝子組換えタンパク質は、変異原性及び染色体異常誘発性のいずれも有さず、また、その薬理学的作用機序からがん原性も有さないと考えられるため、がん原性試験は実施していない。中和抗体の産生により、TAK-672 の曝露を維持したうえでの試験の実施が困難であったため、生殖発生毒性試験は実施しなかった。90 日間投与したサルから採取した生殖器官（精巣、精巣上体、前立腺、精嚢及び卵巣）の病理組織学的検査において、TAK-672 投与に関連する変化はみられなかった。局所刺激性は反復投与毒性試験の一部として評価した。

表 2.4.4.1-1 毒性プログラムの概要

試験種類 投与期間	投与経路	動物種	動物の性別及び例数／投与群	用量（U/kg）	GLP	試験番号 （添付資料番号）
単回投与毒性	静脈内投与	イヌ （血友病 A）	雄 1 例／雌 2 例（3 U/kg）、雄 1 例／雌 1 例（25 U/kg）、雄 3 例／雌 1 例（100 U/kg）[a]	3、25、100	非適用	PCD-101 （4.2.3.1-1）
単回投与毒性	静脈内投与	カニクイザル	雄 4 例	49.5、77	適用[c]	PCM-104 （4.2.3.1-2）
28 日間用量漸増反復投与毒性	静脈内投与	カニクイザル	雄 1 例／雌 1 例	100、300、600、1000	適用	PCM-101 （4.2.3.2-1）
90 日間反復投与毒性（局所刺激性を含む）	静脈内投与	カニクイザル	雄 6 例／雌 6 例（Days 8、29 及び 91 に雄 2 例／雌 2 例を安楽死させた）	0、82.5、247.5、825	適用	PCM-102 （4.2.3.2-2）
免疫原性	静脈内投与	マウス （血友病 A）	16～17 例[b]	1、10、100	非適用	PCMU-102 （4.2.3.7.2-1）
免疫原性	静脈内投与	カニクイザル	雄 2 例／雌 3 例（40 U/kg）、雄 3 例／雌 2 例（100 U/kg）	40、100	適用[c]	PCM-105-ADA （4.2.3.7.2-2） PCM-105 （4.2.3.7.2-3）

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、U：単位

a. 総例数は雄 4 例／雌 3 例であり、イヌ 2 例は 2 回投与した。イヌに各被験物質をクロスオーバー法で投与したが、TAK-672 3 U/kg 投与の雌 1 例のみは反復静脈内投与用の静脈アクセスが確保できなかったため、本試験の Hyate:C 投与の前に除外された。

b. 雌雄の例数不明。

c. [redacted]の [redacted] Division で実施した試験は、品質保証部門（重要段階の査察又は試験データの監査）が関与しなかったことを除き、GLP に概ね準拠していた。

2.4.4.2 単回投与毒性試験

TAK-672 及び Hyate:C の忍容性及び薬物動態を比較するために、単回投与クロスオーバー試験（PCD-101 試験）で、両剤を CHA のイヌに投与した。投与ごとに一般状態、心拍数、呼吸数、体温及び体重をモニターした。本試験での最大用量は 100 U/kg であり、これはこの動物種での最小有効量（25 U/kg）の 4 倍量に相当した。

最大 100 U/kg の TAK-672 又は Hyate:C を投与したすべての動物で、いずれの測定パラメータにも有害な作用及び変化はみられなかった。

49.5 及び 77 U/kg の TAK-672 を、他の試験で使用歴のあるカニクイザルに単回静脈内投与した結果、有害な作用はみられなかった（PCM-104 試験）。TAK-672 投与に関連する一般状態又は摂餌量の変化はなかった。Hyate:C 投与の 1 例がアレルギー反応を呈した。アナフィラキシー反応に対する治療が施されたが、投与から約 4 時間後に心及び呼吸停止で死亡した。

2.4.4.3 反復投与毒性試験

用量漸増試験では、TAK-672 を 7 日間ごとに漸増して（100、300、600 及び 1000 U/kg）28 日間にわたり、雌雄各 1 例のカニクイザルに 1 日 1 回投与した（PCM-101 試験）。

一般状態（注射部位の観察を含む）、体重及びバイタルサイン（体温、呼吸数、心拍数及び血圧）を評価した。

一般状態や体重に有害な変化はみられなかった。加えて、体温、呼吸数、血圧、平均動脈圧及び心拍数に、TAK-672 投与に関連があると考えられる変化はなかった。投与部位に出血の徴候はみられなかった。血清学的検査の結果、Day 15 までに両方のサルに内因性 FVIII に交差反応を示す FVIII に対する中和抗体が確認され、試験終了まで持続した。

90 日間反復投与毒性試験では、60 例のカニクイザルを 5 群に割り付けた（雄 6 例及び雌 6 例／群）（PCM-102 試験）。各群のサルに、Hyate:C（100 U/kg）、TAK-672（82.5、247.5 又は 825 U/kg）又は 825 U/kg 投与群と同容量の溶媒のいずれかを 1 日 1 回投与した。

摂餌量測定及び一般状態観察を 1 日 2 回実施した。体重を週に 1 回測定した。心電図はベースライン並びに投与期間中の Day 1、7、28 及び 90 の投与前に記録した。眼科学的検査を投与開始前、Day 7、Week 4 及び Week 12 に実施した。血液生化学検査、血液学的検査及び凝固パラメータ検査用の血液試料は、すべてのサルから投与開始前（投与前 7 日以内）並びに Day 7、28、56 及び 90 の投与前に採取した。尿試料は剖検中に膀胱穿刺で採取した。

Day 8、29 及び 91 に、各群の雌雄各 2 例を安楽死させて剖検を実施した。肉眼的検査を実施し、すべての主要臓器を検査した。

トキシコキネティクス解析用の血液試料は、Day 1 及び 7 の投与前、並びに投与 1 及び 6 時間後の 3 時点で、また採血可能な個体からは Day 28 及び 90 にも同 3 時点で採取した。加えて、抗 FVIII 中和抗体の発現を評価するための血液試料は、Day 1、7、28 及び 90 の投与前に採取した。

サルの一般状態、摂餌量又は血液生化学検査パラメータに変化はみられなかった。一般状態の変化として、TAK-672 を投与したサル 4 例（82.5 U/kg 投与 2 例、247.5 U/kg 投与 1 例及び 825 U/kg 投与 1 例）で関節内出血及び軟部組織出血がみられた。血液学的検査（赤血球系パラメータの低下）及び／又は凝固パラメータ〔Day 28 の活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）の軽微な延長〕のわずかな変化は、一般状態で観察された出血と関連していた。TAK-672 のような FVIII 遺伝子組換え製剤の反復投与は、出血のリスクを増大する可能性がある抗 FVIII 中和抗体の発現を誘導することから、これらの用量に依存しない一般状態の変化は、予測される所見であった。

Hyate:C 及び TAK-672 を投与したすべてのサルで、心電図及び眼科学的所見に投与に関連するベースラインからの変化はみられなかった。

Hyate:C 及び TAK-672 を投与したサルで、Day 7 までに用量依存的な aPTT の短縮がみられた。予想されたとおり、交差反応性を示す抗 pFVIII 中和抗体の発現によって、Hyate:C 投与群を含むすべての投与群で、Day 28 までに aPTT が正常値を上回った。各投与群のすべてのサルで、循環血中の内因性 FVIII 活性が顕著に低下した。抗 pFVIII 中和抗体の発現により、FVIII の静脈内投与による in vivo での FVIII 量の増加は、Day 28 までに著しく鈍化した。中和抗体の発現は、Day 28 及び 90 までに全例において認められた。

剖検では、TAK-672 投与に関連する毒性を示唆する肉眼所見又は組織学的所見はみられなかった。TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群でみられた軽度～中程度の糸球体症の主たる原因は、免疫複合体の沈着であると考えられた。

TAK-672 を最大 825 U/kg まで投与したときの忍容性は良好であると結論付けた。

単回及び反復投与毒性試験の無毒性量（NOAEL）を表 2.4.4.3-1 に示した。

表 2.4.4.3-1　NOAEL

試験タイプ 投与期間	NOAEL	試験番号 （添付資料番号）
	単回投与毒性	
イヌ	100 U/kg	PCD-101 （4.2.3.1-1）
カニクイザル	77 U/kg	PCM-104 （4.2.3.1-2）
	反復投与毒性	
カニクイザル（28 日間）	1000 U/kg/日	PCM-101 （4.2.3.2-1）
カニクイザル（90 日間）	825 U/kg/日	PCM-102 （4.2.3.2-2）

NOAEL：無毒性量、U：単位

2.4.4.4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は実施していない。82.5、247.5 又は 825 U/kg の用量で TAK-672 を 90 日間投与したサルから採取した組織の病理組織学的検査において、増殖性病変は確認されなかった（PCM-102 試験）。TAK-672 はバイオテクノロジー応用タンパク質であり、その作用機序及び特性から、TAK-672 と DNA 又は他の染色体成分との直接相互作用は示唆されない。このため、この生物学的製剤は遺伝毒性を有さないと考えられる。

2.4.4.5 がん原性試験

TAK-672 の構造及び生物学的特徴から、この製剤は変異原性及び染色体異常誘発性を示さないこと、また、それによりがん原性も有さないことが示唆される。ICH-S6（R1）「第 2 部 6 項：がん原性」のとおり、がん原性を有する懸念がない場合は、がん原性試験の実施は推奨されていない。したがって、TAK-672 はがん原性を有する懸念がないことから、がん原性試験を実施しなかった。

2.4.4.6 生殖発生毒性試験

以下の理由から、生殖発生毒性試験は実施していない。

TAK-672 を 82.5、247.5 及び 825 U/kg の用量で 90 日間投与したサルの生殖器官（精巣、精巣上体、前立腺、精嚢及び卵巣）の病理組織学的検査において、TAK-672 投与に関連する変化はみられなかった（PCM-102 試験）。この試験では、抗 pFVIII 中和抗体が Day 28 及び 90 に検出された。

同様に、マウスに 100 U/kg 用量の TAK-672 を投与した結果、FVIII に対する抗体が発現した（PCMU-102 試験）。このため、長期投与において TAK-672 が十分に曝露された状態でげっ歯類及びヒト以外の霊長類の生殖発生毒性試験を実施することは困難であると判断した。

妊娠は血栓形成促進状態を誘起し、病理学的に顕著な凝固亢進状態は、流産及び胎盤介在性の合併症と関連している[8]。正常動物に存在する凝固因子に加えて高濃度の凝固因子を投与した場合、この凝固亢進状態が、生殖発生毒性の正確かつ予測性のあるリスク評価に影響

を及ぼす可能性がある。このため、臨床上の個々のリスクを評価することを目的として、TAK-672 を投与した動物で生殖発生毒性試験を実施することは､適切ではないと考えられる。

2.4.4.7 局所刺激性試験

TAK-672 の投与経路は静脈内投与である。局所刺激性は反復毒性試験の一部として評価した。カニクイザルに 100、300、600 及び 1000 U/kg/日の TAK-672（7 日ごとに漸増）を、28 日間にわたり反復静脈内投与したとき（PCM-101 試験）及び最大用量 825 U/kg/日の TAK-672 又は 100 U/kg/日の Hyate:C を、最大 90 日間にわたり反復静脈内投与したとき（PCM-102 試験）の局所忍容性は、良好であった。

2.4.4.8 その他の毒性試験

2.4.4.8.1 免疫原性試験

2.4.4.8.1.1 抗 FVIII 中和抗体の測定

TAK-672（又は Hyate:C）を反復投与したマウス及びカニクイザルにおいて、ベセスダ法のナイメゲン変法により、抗 FVIII 中和抗体の発現が確認された。

抗 FVIII 中和抗体の力価を測定する標準的な方法はベセスダ法であるが、血中の FVIII の存在下では、この方法では正確に測定できない。このため、カニクイザルの血漿中の抗 FVIII 中和抗体活性はミキシングテストで測定した（PCM-101 試験、PCM-102 試験、PCM-105-ADA 試験及び PCM-105 試験）。

サルを用いた試験では､ヒト血友病 A 患者血漿に被験物質である pFVIII を加えて作製した標準品を用いて、測定方法をバリデートした。測定は GLP 及び標準操作手順書に則り実施した。

2.4.4.8.1.2 反復投与後の抗 FVIII 中和抗体の発現

hFVIII（100 U/kg）を週 1 回 4 週間事前感作した血友病 A マウスに、TAK-672 又は Hyate:C を 1、10 又は 100 U/kg で週 1 回、計 5 回にわたって事前感作した（PCMU-102 試験）。

TAK-672 及び Hyate:C を 1 又は 10 U/kg で投与したほとんどのマウスで、pFVIII に対する中和抗体は検出されなかった(ベセスダ法で測定)。しかし､TAK-672 又は Hyate:C を 100 U/kg で投与したマウスでは、それぞれ 81%及び 94%で抗 pFVIII 中和抗体が検出された。TAK-672 10 U/kg を投与したマウスでベセスダ力価が低い傾向がみられたが（p=0.09）、いずれの用量においても、TAK-672 及び Hyate:C 間で中和抗体の発現に統計学的に有意な差異はみられなかった。

TAK-672 及び pFVIII（Hyate:C）に対する総 IgG 抗体量は酵素結合免疫吸着法（ELISA）で測定した。TAK-672 投与群では、TAK-672 をプラスティック製ウェルに固相化した ELISA で IgG 抗体を測定した。Hyate:C 投与群では、2 種の異なる ELISA で IgG 抗体を測定した。サンプル中のすべてのタンパク質に対する抗体は、Hyate:C をプラスティック製ウェルに固相化した ELISA で測定した。pFVIII に特異的な抗体は、精製した血漿由来の FVIII をプラスティック製ウェルに固相化した ELISA で測定した。10 又は 100 U/kg 投与群で、総 IgG 反応及び特異的な抗 FVIII 反応の ELISA 力価は、TAK-672 投与マウスより Hyate:C 投与マウスにおいて高かった。ELISA 又はベセスダ法での測定の結果、TAK-672 投与及び Hyate:C 投与の

両群で、事前感作期間の抗 hFVIII 抗体発現と、それ以降の期間における抗 pFVIII 抗体の発現に、有意な相関はみられなかった。この結果から血友病 A マウスは hFVIII 及び pFVIII の異なる T 細胞エピトープ及び／又は B 細胞エピトープを認識していることが示唆される。

カニクイザルでの抗 pFVIII 中和抗体の発現は、複数の試験で評価した。

抗 pFVIII 中和抗体の発現は、TAK-672（40 又は 100 U/kg）又は Hyate:C（100 U/kg）の 8 回の静脈内投与後にみられた。投与は 4 日間にわたり 12 時間ごとに 1 回実施し、Day 57 までフォローアップした（PCM-105-ADA 試験及び PCM-105 試験）。

他の試験で使用歴のある 16 例のカニクイザルを、臨床における治療エピソードを想定したスケジュール（すなわち、4 日間にわたり 12 時間ごとに計 8 回投与）で pFVIII を静脈内投与した。100 U/kg の Hyate:C を 6 例のサルに、40 又は 100 U/kg の TAK-672 をそれぞれ 5 例のサルに投与した。

すべてのサルで、FVIII 活性測定用の血液試料を、割り付けられた被験物質の初回投与直前及び初回投与から規定された期間の経過後に採取した。これらの FVIII 活性から、薬物動態パラメータを解析した。

14 日ごとにサルの抗 pFVIII 中和抗体を抗 pFVIII 中和抗体測定用に特化させたベセスダ法で測定した。本試験では、すべてのサルで中和抗体力価が 20 ベセスダ単位（BU）未満となり、かつ前回の時点と比較して同程度又は低下していることが示された時点で終了することとした。

40 U/kg の TAK-672 投与群では、試験のいずれの時点においても、抗 pFVIII 中和抗体を発現したサルはいなかった。このため、この投与群は Day 43 で試験中止とした。

100 U/kg の Hyate:C を投与したサルの 6 例中 2 例及び 100 U/kg の TAK-672 を投与したサルの 5 例中 2 例のみで、1 BU を上回る測定可能な中和抗体が発現した。いずれの投与群のサルでも、20 BU 以上の中和抗体の発現は、試験期間を通じてみられなかった。本試験は Day 57 で終了となったが、終了時点で、100 U/kg を投与した各群 2 例のサルのみが中和抗体を発現していた。中和抗体力価は 100 U/kg の Hyate:C 投与群では 8.5 及び 2.2 BU であり、100 U/kg の TAK-672 投与群では 8.6 及び 3.1 BU であった。100 U/kg の Hyate:C 又は TAK-672 を投与したサルの間で、中和抗体の発現頻度及び期間に差はみられなかった。

このモデルで、rpFVIII である TAK-672 が、ブタ血漿由来の FVIII である Hyate:C と比較してより免疫原性が高いことを示唆する結果は認められなかった。

カニクイザルを用いた用量漸増試験（PCM-101 試験）及び 90 日間の反復投与毒性試験（PCM-102 試験）においても、pFVIII に対する中和抗体の発現が確認された（2.4.4.3）。

血友病 A マウス及びカニクイザルを用いた非臨床免疫原性試験で得られた結果を、AHA 患者における TAK-672 の免疫原性のリスク評価でさらに解析した（Immunogenicity Risk Assessment Report 4.2.3.7.7-1）。pFVIII に対する中和抗体はサル及びマウスで TAK-672 及び Hyate:C の反復投与後に確認された。いずれの非臨床免疫原性試験でも、Hyate:C と TAK-672 の間で、中和抗体の誘導に差異はみられなかった。さらに、血友病マウスで評価したとき、TAK-672 及び Hyate:C のいずれの投与後にも pFVIII に対する総 IgG 抗体が確認され、両群間に明らかな差異はみられなかった。毒性試験中に得られた抗体測定データは、比較対象となる免疫原性試験で観察された結果と同様に、pFVIII に対する中和抗体の発現を示すものであ

った。非臨床免疫原性評価に基づき、TAK-672 は Hyate:C と類似した免疫原性を有することが示された。

2.4.5 総括及び結論

TAK-672 は、グリコシル化された B ドメイン欠損 rpFVIII であり、AHA 患者（元来は血友病ではなかったが、hFVIII に対する自己抗体が自然発現した患者）の出血事象の治療を目的として開発された。

TAK-672 の止血効果を標準的な血友病 A 動物モデルを用いて評価した。血友病 A マウスモデルに TAK-672 を静脈内投与した結果、尾切断による失血量が用量依存的に減少し、ED_{50} は 89 U/kg であった。血友病 A イヌにおいて TAK-672 の静脈内投与により、25 又は 100 U/kg の用量で CBT が短縮した。

安全性薬理は血友病 A イヌを用いた薬理試験及びカニクイザルを用いた反復投与毒性試験で評価した。血友病 A イヌにおいて、TAK-672 投与による一般状態、体温、心拍数及び呼吸数への影響はみられなかった。同様に、カニクイザルでも、TAK-672 の反復投与（825 又は 1000 U/kg まで）による一般状態、体温、心拍数、呼吸数、血圧及び心電図への影響はみられなかった。

TAK-672 の薬物動態パラメータは有効性及び安全性／毒性試験に使用した動物種を用いて、TAK-672 の単回及び反復投与後に評価した。単回投与後の TAK-672 の全身曝露量は、カニクイザルでは用量比例的に増加し、血友病 A イヌでは用量比をやや下回って増加した。

動物種間の薬物動態パラメータを比較した結果、カニクイザルとヒト血友病 A 患者間で顕著な違いはみられず、毒性試験の非げっ歯類の動物種としてカニクイザルを選択する妥当性が示された。

100 U/kg 投与時の曝露量はカニクイザルとヒトで同程度であった。本用量の反復投与による安全性上の懸念は認められなかった。

PCM-105 試験において、カニクイザルに 4 日間で 100 U/kg を計 8 回投与したときの C_{max} を発色合成基質法で測定した結果、平均値は 362 U/dL（362%）であり、最大値は 465 U/dL（465%）であった。AUC で示されたとおり、8 回投与後の曝露量の平均値は 2743 U.h/dL（最大値：4863 U.h/dL）であった（[redacted]/PKR/017 報告書）。この試験で報告された C_{max} はベースライン値で補正されているため、個々の動物ではさらに高い曝露量が得られた。これらの曝露量における TAK-672 の忍容性は良好であり、被験物質に関連した有害作用はみられなかった。

カニクイザルに 1 日当たり最大で 825 U/kg を 90 日間投与した主要な反復投与毒性試験（PCM-102 試験）で、薬物動態の公式な統計解析は実施しなかった。しかし、曝露量を評価するために、投与 1 及び 6 時間後の個々の FVIII 活性を測定した。Day 7 の投与 1 時間後の FVIII 活性の平均値（標準偏差）は 2200（611）U/dL（2200%）であり、最大値としては 2916 U/kg（2916%）が 1 例で確認された（PCM-102 試験、Appendix D、Table 5）。これらの FVIII 活性はベースライン値で補正していないため、実際の FVIII 活性である。本曝露量における TAK-672 の忍容性は良好であった。異種接種では、抗体の発現により Day 28 の曝露量は Day 7 と比べて小さいことが確認されている。しかし、7 回の反復投与後の曝露量は、ヒトの臨床的な曝露量と比較し、安全域を算出するために、適切であると考えられる。

ヒトの臨床治療用量、投与頻度及び投与期間は出血事象の程度、目標とする FVIII 活性及び患者の臨床状態により決定される。初回の推奨用量は 200 U/kg である。用量及び投与頻度は、中等度～重度の出血に対して推奨される目標レベルである 100%～200%（100～200 U/dL）を維持するために、FVIII 活性に応じて調整される。

OBI-1-301/301a 臨床試験において、29 例に対し初回用量 200 U/kg で TAK-672 を 1 回以上投与した。追加投与の要否は被験者の TAK-672 投与後の FVIII 活性、抗薬物力価（入手可能な場合）、臨床状態及び目標とする FVIII 活性に基づき、治験担当医師が判断した。本試験で投与した TAK-672 の総量の中央値は 1842.0 U/kg であった。

非出血状態の 5 例について、薬物動態解析を実施した。TAK-672 の最終投与後の最大活性の平均値は 108%（108 U/dL、範囲：60%～222%）であり、投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積の平均値は 691%（691 U.h/dL、範囲：213%～2675%）であった。本試験では出血状態の被験者の薬物動態パラメータは得られていない。しかし、TAK-672 の初回投与前及び投与期間中の FVIII 活性は、TAK-672 投与及び後続の治療の判断材料として、また、出血状態の薬物動態の挙動を評価する目的で各実施施設及び中央検査機関で測定された。これらの FVIII 活性は治療時に観察された FVIII 活性最大値として、反復投与後のサルでの FVIII 活性と比較するために利用可能と考えられる。観察された FVIII 活性は概して 400%（400 U/dL）未満であった。より高い FVIII 活性が数回みられ、最大 775%（775 U/dL）が 1 例で 1 回確認された。

表 2.4.5-1 サルへの反復投与後の曝露量とヒトへの推奨される臨床治療用量投与後の曝露量の比較

参照試験（添付資料番号）	用量（U/kg）	パラメータ [a]	
		最大 FVIII 活性濃度（U/dL）[f] 平均値（最大値）	AUC（U.h/dL）[g] 平均値（最大値）
	サル		
PCM-102 試験 [b]（4.2.2.2-4）	7×825	2200 (2916)	-
PCM-105 試験（[redacted]/PKR/017）[c]（4.2.2.2-3）	8×100	362 (465)	2743 (4863)[d]
	ヒト		
OBI-1-301/301a 試験（5.3.5.2-2） TAK-672 の最終投与後の非出血状態の薬物動態解析	初回投与：200	108 (222)	691 (2675)[e]
OBI-1-301/301a 試験 追加投与及びその後の治療の指針となる個別値	追加投与：FVIII 活性、抗薬物力価、臨床状態及び目標 FVIII 活性（中等度～重度の出血：100～200 U/dL）に基づく 総曝露量の中央値：1842	主に<400 最大：775	-

AUC：血漿中濃度－時間曲線下面積、$AUC_{0-\infty}$：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{τ}：1 投与間隔内の血漿中濃度－時間曲線下面積、FVIII：血液凝固第 VIII 因子、U：単位、-：該当なし
a. FVIII 活性は発色合成基質法で測定した。
b. Day 7（7 回反復投与後）
c. Day 4（8 回反復投与後）
d. AUC_{τ}（1 日 2 回投与のうち 1 回目投与時の AUC_{0-12hr}）を示した。
e. $AUC_{0-\infty}$を示した。
f. ヒトでは（%）
g. ヒトでは（%.h）

表 2.4.5-1 のデータに基づき、安全域について以下の結論が得られる。

- OBI-1-301/301a 臨床試験で得られた個々の FVIII データから、PCM-105 試験における FVIII 曝露量（362 U/dL）はヒトにおける曝露量（主に<400 U/dL）と近似していた。PCM-102 試験では、臨床治療用量で投与したときと比較してより高い FVIII 曝露量が認められ、1 回のみ検出された最大 FVIII 曝露量に対して、安全域は約 2.8（=2200 U/dL/775 U/dL）と算出される。
- 治療目標である FVIII 曝露量 200%（200 U/dL）に対して、安全域は、PCM-105 試験では 1.8（=362 U/dL/200 U/dL）、PCM-102 試験では 11（=2200 U/dL/200 U/dL）と算出される。
- 同様に、非出血時のヒト最大曝露量に対して、PCM-105 試験（100 U/kg）における C_{max} から安全域は 1.6（=362 U/dL/222 U/dL）と算出される。本試験で算出された AUC（2743 U/dL）はヒト薬物動態解析で算出された最大 AUC（2675 U/dL）を上回る。PCM-102 試験（825 U/kg）における安全域は 10（=2200 U/dL/222 U/dL）と概算される。

以上より、動物を用いた毒性試験における曝露量は、ヒトにおける曝露量に対して十分な安全域を有しており適切であったと考えられる。

TAK-672 の反復投与に伴い pFVIII に対する中和抗体が発現した。カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験で、内因性 FVIII 活性は、交差反応を示す抗 pFVIII 抗体の発現により（Day 28～90 までに）低下した。出血の症状と相関する血液学的検査（赤血球系パラメータの低下）及び／又は凝固パラメータ（Day 28 以降の aPTT の軽微な延長）の変化は、交差反応を示す抗 pFVIII 中和抗体の発現と関連し、また、免疫複合体の沈着が糸球体症を引き起こしたと考えられた。TAK-672 を Day 7 までカニクイザルに 1 日 1 回投与した後（計 7 回）、血漿中 FVIII 活性の上昇が確認された。これにより、単回及び反復投与後の TAK-672 の曝露量は、TAK-672 の安全性を評価するために十分であると考えられた。

825 U/kg の TAK-672 を 90 日間にわたり投与したとき（最大血漿中 FVIII 活性：2916 U/dL）の忍容性は概して良好であった。

TAK-672 は遺伝子組換えタンパク質であり、遺伝毒性は有しないと考えられる。また、DNA に直接作用する懸念がなく、細胞増殖又は免疫抑制を引き起こす可能性がないことから、がん原性試験は実施していない。さらに、3 ヵ月間投与したサル及び週 1 回計 4 回投与したマウスにおいて抗 FVIII 中和抗体が発現したことから、慢性毒性試験は実施できないと推察された。生殖発生毒性試験は実施しなかった。

非臨床試験では、米国で販売されていたが製造中止となった血漿由来の pFVIII である Hyate:C を対照薬として使用した。血友病 A マウスモデルにおいて、TAK-672 と Hyate:C は同様の有効性を示した。血友病 A イヌ及びカニクイザルにおいて、TAK-672 の全身曝露量は Hyate:C の全身曝露量より概して高い傾向があった。サルに TAK-672 又は Hyate:C を反復投与後、内因性 FVIII に交差反応を示す抗 pFVIII 中和抗体が発現した。

TAK-672 の非臨床試験において、1000 U/kg の用量まで安全性上の懸念は認められなかった。さらに、TAK-672 の忍容性は Hyate:C と同等に良好であり、免疫原性は同程度であった。しかしながら、カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験では、Day 28 及び Day 90 時点において 825 U/kg 群の血漿中 FVIII 活性は平均値でそれぞれ 16 及び 27 U/dL と投与前のベースライン値と同程度に低く、抗 pFVIII 中和抗体の産生により長期の安全性評価は限定的であったと考えられる。

TAK-672 は遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子であり、薬理作用に起因したオンターゲット毒性として凝固系亢進による血栓塞栓症が予想されるが、非臨床毒性試験では血栓塞栓症を示唆する毒性所見は認められなかった。一方、臨床試験及び海外製造販売後の自発報告において、TAK-672 との関連を強く示唆する症例は集積していないものの、血栓塞栓症に関する有害事象が報告されていることから、TAK-672 の医薬品リスク管理計画における重要な潜在的リスクとして設定し、情報収集に努める予定である。

オフターゲット毒性としては、アナフィラキシーを含む過敏症反応及び中和抗体の発現による出血又は免疫複合体の沈着による組織障害が予想される。非臨床毒性試験では、カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験において、TAK-672 に起因したアナフィラキシーは観察されなかったが、中和抗体の発現に関連すると考えられる凝固系パラメータ（aPTT）の延長を伴った関節内及び軟組織出血並びに糸球体症が認められている。非臨床毒性試験全体を通して毒性所見は認められなかったことから、TAK-672 に関連すると考えられるその他のオフターゲット毒性の懸念も低いと考えられる。国内外臨床試験では、一部の症例において pFVIII インヒビター力価及び／又は hFVIII インヒビター力価の上昇がみられたものの

（2.5.5.2.4）、TAK-672 との関連が考えられるアナフィラキシー等の重篤な過敏症反応は認められておらず、全体として TAK-672 の投与は安全で、忍容性は良好であった（2.5.5.5）。

以上より、非臨床有効性、薬物動態及び安全性プロファイルは、AHA 患者の治療を目的とした TAK-672 の国内新薬承認申請を支持すると考えられた。

2.4.6 参考文献一覧

[1] Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. Nat Genet. 1995;10:119-21.

[2] Bi L, Sarkar R, Naas T, Lawler AM, Pain J, Shumaker SL, et al. Further characterization of factor VIII-deficient mice created by gene targeting: RNA and protein studies. Blood. 1996;88:3446-50.

[3] Connelly S, Andrews JL, Gallo AM, Kayda DB, Qian J, Hoyer L, et al. Sustained phenotypic correction of murine hemophilia A by in vivo gene therapy. Blood. 1998;91:3273-81.

[4] Giles AR, Tinlin S, Hoogendoorn H, Fournel MA, Ng P, Pancham N. In vivo characterization of recombinant factor VIII in a canine model of hemophilia A (factor VIII deficiency). Blood. 1988;72:335-9.

[5] Pittman DD, Alderman EM, Tomkinson KN, Wang JH, Giles AR, Kaufman RJ. Biochemical, immunological, and in vivo functional characterization of B-domain-deleted factor VIII. Blood. 1993;81:2925-35.

[6] Giles AR, Tinlin S, Greenwood R. A canine model of hemophilic (factor VIII:C deficiency) bleeding. Blood. 1982;60:727-30.

[7] Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. Arzneimittelforschung. 1994;44:793-7.

[8] Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. Br J Haematol. 2012;157:529-42.