2.6.6　毒性試験の概要文の目次

2.6.6　毒性試験の概要文の目次 1

2.6.6.1　まとめ 2

2.6.6.2　単回投与毒性試験 4

2.6.6.2.1　雄性 Sprague-Dawley ラットにおける単回静脈内投与毒性試験 4

2.6.6.2.2　ニュージーランド白色ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験 5

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 7

2.6.6.3.1　Sprague-Dawley ラットにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験 7

2.6.6.3.2　ニュージーランド白色ウサギにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験 8

2.6.6.4　遺伝毒性試験 12

2.6.6.4.1　*In vitro* 12

2.6.6.4.1.1　マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた *in vitro* 哺乳類突然変異及び染色体異常試験 12

2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 12

2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 12

2.6.6.7　局所刺激性試験 13

2.6.6.8　その他の毒性試験 13

2.6.6.8.1　血友病 A マウスにおける BAY 81-8973 及びコージネイト FS の抗原性 13

2.6.6.8.2　プロセスバッファーの毒性試験 14

2.6.6.9　考察及び結論 15

2.6.6.10　図表 17

引用文献一覧 18

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

BAY 81-8973 の長期使用に関し、現行のガイドライン及び規制要件に基づき、BAY 81-8973 の毒性プロファイル及びトキシコキネティクスプロファイルを明らかにするため、非臨床試験を実施した。毒性試験プログラムの概要を表 2.6.6.1-1に示す。

臨床において、BAY 81-8973 は出血時に必要に応じて（出血時補充療法）又は予防的に（定期補充療法）投与される（2.6.1　参照）。本項では、臨床用量との比較に際し、定期補充療法の用量範囲上限である 50IU/kg を用い考察した。

BAY 81-8973 たん白質及びその濃度は、添加剤の組成も含めて、現承認品目の遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子（rFⅧ）製剤であるコージネイト FS と同じであるが、たん白質は、改良されたセルバンク（同じ細胞株）及び製造工程で製造されている。コージネイト FS 及び前承認品目であるコージネイトは、極めて良好な非臨床及び臨床安全性プロファイルを有する。マウス、ラット、ウサギ及びイヌにおける既存の rFⅧ製剤の安全性試験で得られた広範な非臨床経験に、BAY 81-8973 の毒性試験成績が追加された。

動物試験での投与経路は、臨床予定経路である静脈内投与を選択した。rFⅧは高分子量たん白質（分子量約 350k）であり、静脈内投与され、主に血液コンパートメントのみに分布するため、体重に基づいた投与量により種間比較を行う。

BAY 81-8973 の毒性試験では、げっ歯類として Sprague-Dawley ラットを、非げっ歯類としてニュージーランド白色ウサギを用いた。いずれも正常レベルの第Ⅷ因子（FⅧ）を有する。ラットは、毒性評価に最も多く用いられているげっ歯類であり、ウサギは、過去にいくつかの FⅧ製剤の毒性評価で用いた非げっ歯類である。ヒト FⅧはこれらの動物種の凝固カスケードで活性を示すため、いずれも BAY 81-8973 の評価に適した動物種である。対象集団は 99%超が男性であるため、雄性ラット及び雄性ウサギのみを使用した。重要な非臨床試験では、開発初期の臨床試験で用いた製剤を用いた。

BAY 81-8973 の毒性試験は、雄性ラット及び雄性ウサギにおける単回及び反復（5 日間）投与毒性試験を実施し、反復投与群では回復群を設け、また、トキシコキネティクスの評価も実施した。5 日間の投与期間は、過去の FⅧ製剤の試験結果から、動物が短期間でヒト FⅧに対する中和抗体を産生し、たん白質の活性を失活することなく、長期間投与することが不可能であることがわかっているために選択した。このため、長期投与毒性試験は実施しなかった。また、BAY 81-8973 の遺伝毒性を *in vitro* で評価した。[redacted]変異原性試験を実施した。

急性及び反復投与毒性試験の一環として局所刺激性を評価した。

BAY 81-8973 と現承認品目コージネイト FS の探索的抗原性比較試験を実施した。この試験では血友病 A マウスモデルを選択した。また、非げっ歯類を用いた重要な反復投与毒性試験において抗 FⅧ抗体の産生について調べた。

血友病 A マウスにおける探索的抗原性試験を除く主要な試験はすべて、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）の原則に準拠して実施した（表 2.6.6.1-1）。単回及び反復

投与毒性試験は、ドイツ Bayer HealthCare 社の毒性部門（所在地：Wuppertal）で実施した。遺伝毒性試験は、ドイツ Bayer HealthCare 社の毒性部門（所在地：Berlin）で実施し、抗原性試験は、米国 Bayer HealthCare 社〔所在地：Richmond（現在 San Francisco）〕で実施した。

表 2.6.6.1-1　毒性試験プログラム

Study Type and Duration	**Route of administration**	**Species**	**Compound(s) administered**
Single dose toxicity,GLP	iv	Rat and rabbit	BAY 81-8973, 2 lots
Repeat-dose toxicity, GLP			
5 days	iv	Rat and rabbit	BAY 81-8973
Genotoxicity, GLP	*In vitro*		BAY 81-8973
Antigenicity	iv	Mouse, hemophilia A model	BAY 81-8973 Kogenate FS

雄性ラット及び雄性ウサギにおいて、臨床用量 50IU/kg の約 80 倍（最高 4000IU/kg）を単回静脈内投与したとき、あるいは臨床用量の約 8 倍（最高 400IU/kg）を 5 日間連日反復静脈内投与したときの BAY 81-8973 の忍容性は良好であった。本剤投与と関連のある有害な影響は認められなかった。BAY 81-8973 の抗原性試験の結果とコージネイト FS の結果に統計学的有意差はなく、BAY 81-8973 の遺伝毒性評価では、変異原性のリスクは認められなかった。

BAY 81-8973 の臨床適用を制限するような非臨床毒性データは得られなかった。

2.6.6.2　単回投与毒性試験

2.6.6.2.1　雄性 Sprague-Dawley ラットにおける単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.1 PH-35700

Sprague-Dawley ラットにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、2 ロットの BAY 81-8973 を臨床用量の最高約 80 倍までの用量で雄性 Sprague-Dawley ラットに単回静脈内ボーラス注射したときの急性毒性の可能性及び 2 週間の回復期後の影響の可逆性、持続性又は遅発性を評価することであった。

9 週齢から 11 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットに、BAY 81-8973 又は添加剤(溶媒)対照を単回静脈内ボーラス注射（約 6mL/分）し、投与約 24 時間後（主群）又は 2 週間後（回復群）に屠殺した。試験には、臨床試験用の 2 ロットを使用した。試験のデザイン及び用量群を表 2.6.6.2-1に示す。

表 2.6.6.2-1　雄性ラットにおける BAY 81-8973 の単回投与毒性試験のデザイン

Group	Group Type	Test Article	Dose of BAY 81-8973 (IU/kg)	Admin. Volume (mL/kg)	Number of Animals
1	main	Excipient (Control)	0	10	6
2	main	BAY 81-8973 (Lot 1)	400	1	6
3	main	BAY 81-8973 (Lot 1)	4000	10	6
4	main	BAY 81-8973 (Lot 2)	400	1	6
5	main	BAY 81-8973 (Lot 2)	4000	10	6
6	recovery	Excipient (Control)	0	10	4
7	recovery	BAY 81-8973 (Lot 1)	4000	10	4
8	recovery	BAY 81-8973 (Lot 2)	4000	10	4

Lot 1: 27N1R50
Lot 2: 27N1TR0
Source: 4.2.3.1.1, PH-35700

一般症状及び体重を評価した。また、凝固パラメータ〔プロトロンビン時間（PT）、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）及びフィブリノーゲン〕を含む血液学的検査及び臨床生化学的検査のために、屠殺時に採血した。すべての動物について剖検を実施し、臓器重量を測定した。すべての用量群について、一部の臓器（心臓、注射部位、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、前立腺、胸腺及び脾臓）の病理組織学的検査を実施した。

投与液中の rFⅧ濃度の測定値は、目標濃度の範囲内であった。

試験期間中の死亡はなく、本剤投与と関連のある一般症状も認められなかった。主群の体重は対照群と同等であった。BAY 81-8973 投与（回復群）2 週間後の最終的な平均体重は、対照群よりも 5.3%（第 7 群）及び 6.4%（第 8 群）少なく、両群とも対照群と比べて統計学的有意差が認められた。対照群の平均体重は、試験開始時（初回投与前）、いずれの回復群よりも（約 2.4%）多かった。このため、この変化は BAY 81-8973 の投与と関連のある影響ではなく、個体間の生物学的ばらつきを表している可能性が高い。血液学的パラメータは投与による影響を受けなかった。凝固パラメータ（PT、aPTT 及びフィブリノーゲン）は、対照群の値と統計学的有意差はなかった（投与 24 時間後に測定）。一部の臨床生化学的検査値〔乳酸脱水素酵素（LDH）及

びグルタミン酸脱水素酵素（GLDH）の酵素活性低下、尿素及びカリウム濃度の減少など〕には対照群との間に差（GLDH、カリウム濃度には統計学的有意差なし）がみられたが、これらの変化は肝臓及び腎臓の病理学的変化を伴わなかったので、本剤投与とは関連がないと判断された。剖検で被験物質と関連のある変化は認められなかった。第 5 群（主群、4000IU/kg、ロット 2）の 6 匹中 3 匹に、胸腺の変色が認められたが、不完全な放血が原因と考えられた。第 3 群（主群、4000IU/kg、ロット 1）で胸腺重量の軽微な減少が認められたが、病理組織学的変化を伴わなかったため、本剤投与と関連のある影響とはみなされなかった。主群及び回復群の一部の臓器（心臓、注射部位、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、前立腺、胸腺及び脾臓）について実施した病理組織学的検査では、本剤投与と関連のある影響は認められなかった。

以上、臨床用量の約 80 倍までの 2 ロットの BAY 81-8973 をラットに単回ボーラス注射したとき、投与後 1 日目又は 2 週間目に本剤投与と関連のある影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 4000IU/kg であった。

2.6.6.2.2　ニュージーランド白色ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.2 PH-35701

ニュージーランド白色ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、2 ロットの BAY 81-8973 を臨床用量の約 80 倍までの用量で雄性ニュージーランド白色ウサギに単回静脈内ボーラス注射したときの急性毒性の可能性及び 2 週間の回復期後の影響の可逆性、持続性又は遅発性を評価することであった。

6～7 ヵ月齢の成熟雄性ニュージーランド白色ウサギに、BAY 81-8973（臨床試験用 2 ロット）又は添加剤(溶媒)対照を、約 12mL/分で単回静脈内ボーラス注射し、投与約 24 時間後（主群）又は 2 週間後（回復群）に屠殺した。試験デザイン及び用量群を表 2.6.6.2-2に示す。

表 2.6.6.2-2　雄性ウサギにおける BAY 81-8973 の単回投与毒性試験のデザイン

Group	Group Type	Test Article	Dose of BAY 81-8973 (IU/kg)	Admin. Volume (mL/kg)	Number of Animals
1	main	Excipient (Control)	0	10	3
2	main	BAY 81-8973 (Lot 1)	400	1	3
3	main	BAY 81-8973 (Lot 1)	4000	10	3
4	main	BAY 81-8973 (Lot 2)	4000	10	3
5	recovery	Excipient (Control)	0	10	3
6	recovery	BAY 81-8973 (Lot 1)	4000	10	3
7	recovery	BAY 81-8973 (Lot 2)	4000	10	3

Lot 1: 27N1R50
Lot 2: 27N1TR0
Source: 4.2.3.1.2, PH-35701

一般症状及び体重の変化を評価した。また、凝固パラメータ（PT、aPTT 及びフィブリノーゲン）を含む血液学的検査及び臨床生化学的検査のために、投与前及び屠殺時に採血した。剖検を実施し、臓器重量を測定した。すべての用量群について、一部の臓器（心臓、注射部位、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、精巣、精巣上体、胸腺及び脾臓）の病理組織学的検査を実施した。

投与液中の rFⅧ濃度の測定値は、目標濃度と一致していた。

死亡は認められず、本剤投与による生存率への影響はなかった。本剤投与と関連のある一般症状は認められなかった。主群又は回復群の平均体重は、それぞれの対照群と同等であった。第 3 群（4000IU/kg）では、対照群（第 1 群）と比べて、好中球数増加、単球数増加、aPTT 値減少及びフィブリノーゲン増加が認められた。群平均値の変化は、1 匹（動物番号 8）の値が他の動物と比べて異常であったことによる。動物番号 8 の腎臓の病理組織学的検査では、腎皮質に尿細管の変化が認められた。この動物の臓器を広範囲に調べてみると、尿道周囲の炎症及び骨髄造血増加が認められた。したがって、血液学的及び腎臓の変化は、炎症に続発する自然発生的なものであり、本剤の投与とは関連がないと考えられた。剖検で本剤投与と関連のある変化は認められなかった。病理組織学的評価の結果、ロット 1 を投与した 4000IU/kg 群の注射部位において、炎症性浸潤及び血栓形成の発生率がわずかに高かったものの、すべての群の病理組織学的所見は軽微と判断され、両ロットの rFⅧの局所忍容性は最大 4000IU/kg まで良好であると判断された。

回復群には、異常な病理組織学的所見は認められなかった。

以上、臨床用量の約 80 倍までの 2 ロットの BAY 81-8973 をウサギに単回ボーラス注射したとき、投与後 1 日目又は 14 日目に本剤投与と関連のある影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は、4000IU/kg であった。

2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2.6.6.3.1　Sprague-Dawley ラットにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.1 PH-35733

雄性 Sprague-Dawley ラットにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、BAY 81-8973 を反復投与したときの毒性の可能性及び 4 週間の回復期後の影響の可逆性、持続性又は遅発性を評価することであった。

9～11 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットに、BAY 81-8973 又は溶媒対照を 1 日 1 回 5 日間連日静脈内ボーラス注射（約 2.5mL/分）し、5 回目の投与約 24 時間後（主群）又は 4 週間後（回復群）に屠殺した。詳細を表 2.6.6.3-1に示す。

表 2.6.6.3-1　雄性ラットにおける BAY 81-8973 の反復投与毒性試験のデザイン

Group No.	Group type	Test article	BAY 81-8973 (IU/kg b.w.)	Dose solution (IU/mL)	Admin. Vol. (mL/kg)	No of Animals
1	main	Excipient (Control)	0	0	1	10
2	main	BAY 81-8973	40	40	1	10
3	main	BAY 81-8973	120	400	0.3	10
4	main	BAY 81-8973	400	400	1	10
5	recovery	Excipient (Control)	0	0	1	5
6	recovery	BAY 81-8973	400	400	1	5
7	Toxicokinetic	Excipient (Control)	0	0	1	9
8	Toxicokinetic	BAY 81-8973	40	40	1	9
9	Toxicokinetic	BAY 81-8973	120	400	0.3	9
10	Toxicokinetic	BAY 81-8973	400	400	1	9

Lot 27N1R50
Source: 4.2.3.2.1, PH-35733

一般症状、眼科的所見、摂餌量及び体重の変化を評価した。凝固パラメータを含む血液学的検査及び臨床生化学的検査用に、最終投与 24 時間後及び回復期終了時に採血した。トキシコキネティクス評価及び抗体測定のために、サテライト群から採血した（各時点 3 匹）。主群及び回復群を剖検に供した。すべての動物について臓器重量を測定した。高用量群及び対照群のすべての動物について病理組織学的検査を行い、胸腺については、すべての動物で病理組織学的検査を行った。

投与液の分析の結果、rFⅧの濃度は目標範囲内であった。

投与による生存率への影響はなかった。一般症状、摂餌量及び体重に対する本剤投与の影響は認められなかった。血液学的検査、臨床生化学的検査又は凝固パラメータに、本剤投与と関連のある影響は認められなかった。本剤投与と関連のある眼への影響もみられなかった。

回復群では、対照群と比べて、統計学的に有意な絶対的及び相対的胸腺重量の減少が認められたが、病理組織学的変化を伴わず、主群にこのような減少は認められなかったことから、胸腺重量の減少は、本剤投与とは関連はないと考えられた。

主群及び回復群の病理組織学的検査の結果、全身又は局所忍容性に対する有害作用も遅発性の影響も認められなかった。

なお、400IU/kg 投与サテライト群 1/9 匹が試験 22 日目に死亡したが、毒性評価群（主群及び回復群）に薬剤投与の影響は認められなかったことから、頻回採血による影響と考えられた。

投与 1 日目及び投与最終日の投与前、投与 15 分後、1、4、8 及び 24 時間後に、トキシコキネティクス評価用に採血した。その結果から、抗 FⅧ抗体は BAY 81-8973 のトキシコキネティクスに影響を及ぼさなかったと推測される。投与 1 日目及び 5 日目のトキシコキネティクスパラメータを表 2.6.6.3-2に要約する。

曝露量（AUC 及び C_{max}）は用量依存的に増加したが、用量比をわずかに下回った。24 時間後のトラフ濃度は、C_{max} の約 5%未満であった。投与 1 日目及び 5 日目のトキシコキネティクスパラメータを比較したところ、意味のある変化は認められなかった。抗 FⅧ抗体測定のための血清採取は行ったが、初回投与から最終投与までトキシコキネティクスに変化が認められず、本剤投与と関連のある毒性は認められなかったため、測定は行わなかった（試験実施計画書に規定）。

表 2.6.6.3-2 雄性ラットにおける BAY 81-8973 の 1 日 1 回静脈内投与 1 日目及び 5 日目のトキシコキネティクスパラメータ

		Day 1			Day 5		
Dose	[IU/kg]	40	120	400	40	120	400
$AUC_{(0-24)}$	[IU·h/L]	5839	16115	42886	7733	15626	37457
$AUC_{(0-24)norm}$	[kg·h/L]	146	134	110	193	130	93.6
C_{max}	[IU/L]	1104	2739	7724	1329	2099	7082
$C_{max, norm}$	[kg/L]	27.6	22.8	19.3	33.2	17.5	17.7
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	n.c.	3.11	2.54	n.c.	4.09	2.57
t_{max}	[h]	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250	0.250
Rel. d5/d1,	Cmax[%]				120	76.7	91.7
Rel. d5/d1,	AUC[%]				132	97.0	85.4

Abbreviations: $AUC_{(0-24)}$=area under the curve, 0 to 24 hours; C_{max}=maximal concentration; $C_{(24)}$=concentration at 24 hours; h=hour; IU=international units; L=liter; n.c.; not calculated; $_{norm}$=normalized by dose; Rel.=relative; t_{max}=time to maximal concentration
Source: 4.2.3.2.1, PH-35733

以上、臨床用量の約 8 倍までの BAY 81-8973 をラットに 5 日間連日静脈内投与したとき、最終投与約 24 時間後又は 4 週間後に本剤投与と関連のある影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 400IU/kg であった。

2.6.6.3.2 ニュージーランド白色ウサギにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.2 PH-35732

雄性ニュージーランド白色ウサギにおける 5 日間反復静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、BAY 81-8973 を雄性ニュージーランド白色ウサギに反復投与したときの毒性の可能性及び 1 カ月間回復期後の影響の可逆性、持続性又は遅発性を評価することであった。

6～7 ヵ月齢の雄性ニュージーランド白色ウサギ（主群各群 6 匹、回復群各群 3 匹）に、BAY 81-8973（臨床試験用ロット）又は溶媒を約 12mL/分で 1 日 1 回 5 日間連日静脈内ボーラス注射し、5 回目の投与約 24 時間後又は 48 時間後（主群）若しくは 4 週間後（回復群）に屠殺した。詳細を表 2.6.6.3-3に示す。

表 2.6.6.3-3 雄性ウサギにおける BAY 81-8973 の反復投与毒性試験のデザイン

Group No.	Group type	Test article	BAY 81-8973 (IU/kg b.w.)	Dose solution (IU/mL, nominal)	Admin. Vol. (mL/kg)	No of Animals
1	main	Excipient (Control)	0	0	1.0	6
2	main	BAY 81-8973	40	400	0.1	6
3	main	BAY 81-8973	120	400	0.3	6
4	main	BAY 81-8973	400	400	1.0	6
5	recovery	Excipient (Control)	0	0	1.0	3
6	recovery	BAY 81-8973	40	400	0.1	3
7	recovery	BAY 81-8973	120	400	0.3	3
8	recovery	BAY 81-8973	400	400	1.0	3

Lot 27N1R50
Source: 4.2.3.2.2, PH-35732

一般症状、眼科的所見、体重及び摂餌量の変化を評価した。凝固パラメータを含む血液学的検査及び臨床生化学的検査用に、投与前、最終投与約 24 時間後及び回復期終了時に採血した。一般的な尿検査用に、屠殺時に採尿した。トキシコキネティクス評価のために主群及び回復群から（各時点 3 匹）、抗 FⅧ抗体価測定のために回復群から採血した。主群及び回復群を剖検に供した。すべての動物について一部の臓器の重量を測定した。高用量群及び対照群のすべての動物について病理組織学的検査を行い、注射部位については、すべての動物で病理組織学的検査を行った。

投与前及び回復期間中のいくつかの時点（試験 6、12、19 及び 33 日目）に、抗 FⅧ抗体測定用に採血した。投与 1 日目及び投与最終日の投与前、投与 10 分後、1、4、8 及び 24 時間後に、トキシコキネティクス評価用に採血した。以前に実施したウサギにおけるコージネイト FS の試験において、一部の動物では試験 6 日目に既に抗薬物抗体が産生されたため、反復投与毒性試験は、5 日間連日投与後に回復期間を設けるデザインとした。

投与液の分析の結果、rFⅧの濃度は目標範囲内であった。

400IU/kg 群（第 8 群）の 1 匹が、本剤投与とは関連のない重度の自然発生腸炎により死亡した。その他の動物の死亡はなく、本剤投与による生存率への影響はなかった。

一般症状、体重及び摂餌量に対する本剤投与と関連のある影響は認められなかった。血液学的検査、臨床生化学的検査項目に、本剤投与と関連のある影響は認められなかった。平均フィブリノーゲン値は対照群と比べてわずかに低かったが、統計学的有意差は認められず、明らかな用量依存性もなかったため、毒性学的に重要ではないと考えられた。また、120IU/kg 群及び 400IU/kg 群（主群）で、用量依存的で、統計学的に有意な aPTT の短縮が認められた。主群の値は、正常な変動範囲内であり、投与前値（回復群）の値と同等であった。FⅧは凝固カスケードにおいて不活性な酵素前駆体であり、凝固カスケードが活性化されない限り、aPTT を短縮させることはないと推測されるため、aPTT 短縮はウサギの耳介の小静脈を介した反復投与又は採血によって生じた静脈損傷後の、生理学的範囲内の反応としての凝固カスケードの活性化によるものであると考えられた。これは、被験物質の意図している作用機序とも合致しており、有害作用を反映するものではない。また、これは血栓形成又は塞栓を示す組織学的所見が認められなかったことによっても裏付けられる。本剤投与と関連のある眼科的影響は認められなかった。尿検査では、本剤投与と関連のある変化は認められなかった。

剖検で、被験物質と関連のある所見は認められなかった。臓器重量については、400IU/kg 群で、副腎、腎臓及び精巣において統計学的に有意な増加が認められたが、剖検又は病理組織学的検査では、本剤投与と関連のある影響は認められなかった。その他の臓器の重量は、対照群と差はなかった。主群及び回復群の病理組織学的検査の結果、全身又は局所忍容性に対する有害作用も遅発性への影響も認められなかった。

投与 1 日目及び 5 日目のトキシコキネティクスパラメータを表 2.6.6.3-4に要約する。曝露量（AUC 及び C_{max}）は、用量比例的に増加した。24 時間後のトラフ濃度は、C_{max} の 10～20%であった。投与 1 日目及び 5 日目のトキシコキネティクスパラメータを比較したところ、意味のある差は認められなかった。

表 2.6.6.3-4　雄性ウサギにおける BAY 81-8973 の 1 日 1 回静脈内投与 1 日目及び 5 日目のトキシコキネティクスパラメータ

		Day 1			Day 5		
Dose	[IU/kg]	**40**	**120**	**400**	**40**	**120**	**400**
$AUC_{(0-24)}$	[IU·h/L]	12211	46642	111783	15381	39766	121298
$AUC_{(0-24),\ norm}$	[kg·h/L]	305	389	279	385	331	303
C_{max}	[IU/L]	1106	4233	11536	1453	4724	14962
$C_{max,\ norm}$	[kg/L]	27.7	35.3	28.8	36.3	39.4	37.4
$C_{(24)}/C_{max}$	[%]	17.6	16.4	9.63	18.1	11.7	13.1
t_{max}	[h]	1.0	0.167	0.167	0.167	0.167	0.167
R_{A1}	[%]				131	128	130
R_{A3}	[%]				126	117	109

Abbreviations: $AUC_{(0-24)}$=area under the curve, 0 to 24 hours; C_{max}=maximal concentration; $C_{(24)}$=concentration at 24 hours; h=hour; IU=international units; L=liter; $_{norm}$=normalized by dose; $R_{A1} = C_{max,\ Day\ 5} / C_{max,Day\ 1}$; $R_{A3} = AUC_{(0-24),\ Day\ 5} / AUC_{(0-24),\ Day\ 1}$; t_{max}=time to maximal concentration

Source: 4.2.3.2.2, PH-35732

ウサギにおける抗 FⅧ抗体産生は、結合及び中和抗体のいずれについても、時間及び用量依存的であった。抗 FⅧ（免疫グロブリン、IgG）抗体産生は、試験 6 日目には認められなかったが、12 日目以降は認められた。抗体は、19 日目にピークに達する傾向があり、33 日間の観察期間中持続した（表 2.6.6.3-5）。19 日目以降、回復群のすべての投与動物に反応がみられ、結合抗体、中和抗体ともに産生された。

表 2.6.6.3-5　雄性ウサギに 5 日間 1 日 1 回投与し、4 週間観察したときの抗 FⅧ結合抗体の出現頻度及び抗体価

Dose [IU/kg]		Predose	Day 6	Day 12	Day 19	Day 33
0	Frequency	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
	Mean	0	0	0	0	0
	median	0	0	0	0	0
40	Frequency	0/3	0/3	2/3	3/3	3/3
	Mean	0	0	120	373	240
	median	0	0	40	320	320
120	Frequency	0/3	0/3	1/3	3/3	3/3
	Mean	0	0	27	1387	2240
	median	0	0	0	1280	1280
400	Frequency	0/3	0/3	3/3	3/3	2/2
	Mean	0	0	5120	20480	15360
	median	0	0	2560	10240	15360

Source: 4.2.3.2.2, PH-35732

以上、臨床用量の約 8 倍の BAY 81-8973 をウサギに 5 日間連日静脈内投与したとき、最終投与約 24 時間後又は 48 時間後若しくは 4 週間後に本剤投与と関連のある影響は認められなかった。無毒性量（NOAEL）は 400IU/kg であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

「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」（ICH S6(R1)）に基づいて、FⅧ及び HSP70 はいずれも高分子たん白質であることから、本薬の遺伝毒性試験の実施は必要ないと判断したが、[redacted]、*in vitro* で BAY 81-8973 の変異原性を検討した。ヒスチジンが製剤に含まれているため Ames 試験では偽陽性の結果が得られる可能性が高い。また、高濃度での試験が実施できるように、マウスリンフォーマ TK 試験を選択した。

2.6.6.4.1 *In vitro*

2.6.6.4.1.1 マウスリンフォーマ L5178Y 細胞を用いた *in vitro* 哺乳類突然変異及び染色体異常試験

参照項目：4.2.3.3.1.1 PH-37378

マウスリンフォーマ TK 試験により、*in vitro* で、チミジンキナーゼ（*tk*）遺伝子座における BAY 81-8973 の変異原性及び染色体異常誘発性を検討した。代謝活性化（Aroclor 1254 誘導雄性ラット肝ホモジネート S9 を含む S9 ミックス）添加あるいは非添加での実験から成る 2 つの独立したアッセイを実施した。本試験は、Kirkland 及び Kim の提唱したたん白質の試験に関する特定の推奨事項[1)]及び日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン ICH S2(R1)を基に修正した経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン 476[2)]に従って実施した。溶解した BAY 81-8973 を細胞培養液中に最大 25%（v/v、パルス処理、3 時間）又は最大 4%（v/v、継続処理、24 時間）添加した。添加容量は、添加剤の細胞毒性によって制限された。対照群と比べて突然変異コロニーの有意な増加はなかった。

本アッセイの結果に基づき、BAY 81-8973 は、*in vitro* で、哺乳類細胞において変異原性又は染色体異常誘発性を示さないと考えられる。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

FⅧは内因性ヒト血液凝固たん白質で、血友病 A の補充療法として用いられるため、BAY 81-8973 のがん原性試験は実施しなかった。BAY 81-8973 に変異原性はなかったが、これは他の rFⅧ製剤に遺伝毒性がないという所見と一致している。このたん白質には DNA 損傷又は細胞増殖を引き起こす作用はなく、また、免疫調節作用も認められていない。rFⅧを用いた臨床経験により、このたん白質にはがん原性がないことが示されている。すなわち、「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」（ICH S6(R1)）及び「医薬品におけるがん原性試験の必要性に関するガイダンス」（ICH S1A）に基づき、BAY 81-8973 のがん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

生殖発生毒性試験は以下の理由により実施しなかった。（1）血友病 A 患者集団のほぼ大部分（99%超）は男性であり、BAY 81-8973 の臨床試験には男性のみを組み入れた。（2）既存の rFⅧ製剤の臨床経験により、発生、受胎能又は生殖に対する rFⅧの影響はないことが示されてい

る。また、（3）BAY 81-8973 の毒性試験において、生殖器官又は内分泌器官に毒性は認められなかった。（4）以前に実施した既存の rFⅧ製剤の毒性試験でも、rFⅧに関連のある雄性生殖器への影響は認められなかった。

BAY 81-8973 はコージネイト FS と類似しており、小児患者におけるコージネイト FS の臨床での安全性が知られているため、新生児又は幼若動物における試験は必要ではないと考えられる。

2.6.6.7　局所刺激性試験

BAY 81-8973 製剤は、臨床で長く良好な局所忍容性を示してきた現承認品目のコージネイト FS と同一の製剤組成を有する。

局所刺激性は、ラットにおける単回投与毒性試験（4.2.3.1.1、PH-35700　参照）、ウサギにおける単回投与毒性試験（4.2.3.1.2、PH-35701　参照）、ラットにおける反復投与毒性試験（4.2.3.2.1、PH-35733　参照）及びウサギにおける反復投与毒性試験（4.2.3.2.2、PH-35732 参照）の一環として検討した。これらの試験では、局所刺激性の評価として、試験中の注射部位の臨床観察後、注射部位の病理組織学的検査を実施した。局所忍容性は最高試験用量 4000IU/kg まで、良好であった。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　血友病 A マウスにおける BAY 81-8973 及びコージネイト FS の抗原性

参照項目：4.2.3.7.1.1 CB-[redacted]-06

BAY 81-8973 による抗 FⅧ抗体産生を、コージネイト FS（非臨床試験用ロット）と比較する試験のために、血友病 A マウスを選択した。抗原性の動物モデルは、たん白質のヒトにおける免疫原性を予測するものではないことが良く知られているため、これらの動物データは、臨床的に意義のある差を反映してはいない可能性がある。しかし、次の 2 つの理由から、抗薬物抗体産生を評価した。1 つ目は、[redacted]。2 つ目は欧州医薬品庁（EMA）ガイダンス（EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006）「バイオテクノロジー誘導の治療用タンパク質の免疫原性評価に関するガイドライン」[3)]に記載されているように、製造工程の変更を比較する場合、動物モデルにおいて対象製剤の抗体反応を比較することは、ある程度有用であるとされているからである。ただし、最終的には、ヒトにおけるインヒビター出現率は、臨床試験においてしか検討できない。

血友病 A マウスモデルを以下の理由に基づき選択した。

（1）血友病 A マウスは、血友病 A 患者と同様の出血表現型を有する。

（2）このモデルは、FⅧの探索的抗原性試験で広範に使用されている[4,5,6,7,8,9,10,11)]。

（3）このモデルでは、試験の統計学的検出力を得るために各群の動物数を比較的多くすることができる。

探索的抗原性試験は非 GLP 試験として実施したが、試験実施計画書は作成されており、また、信頼性保証（QA）の監督下で実施した。本試験では、雄性血友病 A マウス（各群 10 匹）に、

BAY 81-8973（ロット 27N1R50）又はコージネイト FS（ロット 27N1190）を、尾静脈を介して週 1 回 5 回静脈内注射した。用量は 40IU/kg 又は 200IU/kg とした。投与前、22 日目（3 週目の投与前）及び 36 日目（5 回目の最終投与から 1 週間後）に採血した。抗 FVⅢ結合抗体及び中和抗体の血清抗体価は、GLP バリデーション済みアッセイを用いて定量した。

コージネイト FS 及び BAY 81-8973 投与液の濃度は目標範囲内であった。

本試験の結果を表 2.6.6.8-1に要約する。BAY 81-8973 による抗 FVⅢ結合抗体の産生頻度はコージネイト FS と同等で、その結果、試験終了時（36 日目）における抗体価の平均値及び中央値も同等であった。結合抗体が認められたすべての動物について、中和活性を評価した。抗体価の平均値及び中央値の差は統計学的に有意ではなかったが、これは主に、BAY 81-8973 群に反応しない動物が多く、その結果、ばらつきが大きくなったためであった。

表 2.6.6.8-1　雄性血友病 A マウスに週 1 回 5 週間静脈内投与したときの抗 FVⅢ結合抗体の出現頻度及び抗体価

	Dose [IU/kg]		Predose	Day 22	Day 36
BAY 81-8973	40	Frequency	0/10	1/10	3/8
		Mean	0	32	2650
		Median	0	0	0
Kogenate FS	40	Frequency	0/10	1/10	7/10
		Mean	0	32	2172
		Median	0	0	80
BAY 81-8973	200	Frequency	0/10	2/10	6/10
		Mean	0	96	2848
		Median	0	0	160
Kogenate FS	200	Frequency	0/10	3/10	9/10
		Mean	0	1280	7610
		Median	0	0	800

Binding antibodies had neutralizing potential (ie, inhibitory of activity, nABs) in all animals except the one animal in the BAY 81-8973, 40 IU/kg group (day 22). However, this was probably below the limit of detection since nABs were measured in this animal on day 36.
Source: 4.2.3.7.1.1, CB-[redacted]-06

2.6.6.8.2　プロセスバッファーの毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.1 RCB-[redacted]-03

不純物の評価を裏付けるため、ネズミチフス菌試験株 TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び大腸菌試験株 WP2uvrA を用いて、細胞培養工程用培地のバッファー成分である[redacted]（[redacted]）（2.3.S.3.2.1.2　参照）の変異原性試験（Ames 試験）を実施した。試験手順は、OECD 及び ICH ガイドラインに従い、各菌株について、代謝活性化の存在下及び非存在下で検討した。

[redacted] は本アッセイにおいて変異原性を示さなかった。

2.6.6.9　考察及び結論

BAY 81-8973 は、血友病 A の治療薬として開発中の完全長 rFⅧである。

BAY 81-8973 の毒性プロファイル及びトキシコキネティクスプロファイルを明らかにするため、単回投与及び反復投与毒性、局所刺激性及び遺伝毒性を評価する包括的な非臨床安全性試験を実施した。マウスにおける探索的抗原性試験を除く重要な試験はすべて、GLP の原則及び現行の試験ガイドライン基準を遵守して実施した。試験の解釈又は質に影響を及ぼす試験実施計画書からの逸脱はなかった。

BAY 81-8973 の非臨床試験では、被験物質と関連のある有害作用は認められなかった。BAY 81-8973 の良好な毒性プロファイルは、既存の rFⅧ製剤で認められた低い毒性と一致している。雄性ラット及び雄性ウサギにおいて、臨床用量の約 80 倍までの用量を単回静脈内投与したとき、及び臨床用量の約 8 倍までの用量を 5 日間連日反復投与したときの BAY 81-8973 の毒性試験における忍容性は良好であった。動物では BAY 81-8973 やその他の FⅧ製剤に対する中和抗体産生により 6～12 日以内には曝露が減少すると考えられるため投与期間は 5 日間とし、BAY 81-8973 のより長期の試験は実施しなかった。動物におけるトキシコキネティクスデータから得られた全身曝露量を、推定ヒト曝露量と比較すると、曝露の安全域は十分であることが裏付けられる（2.4.4.1　参照）。

血友病 A マウスにおける探索的抗原性試験において、BAY 81-8973 による抗 FⅧ抗体の産生頻度はコージネイト FS と同等で、抗体価の平均値も同等であった。ウサギにおける反復投与試験の回復群についても抗 FⅧ抗体を評価した結果、6 日目には抗 FⅧ抗体は検出されなかったが、12 日目には結合抗体及び中和抗体が検出された。

他の rFⅧ製剤で知られているように、rFⅧは、遺伝毒性を示さない。BAY 81-8973 は、マウスリンフォーマ TK 試験において、*in vitro* で遺伝毒性を示さなかった。

長い間の臨床使用経験により、発生、受胎能又は生殖に対する rFⅧの影響はないことが示されているため、生殖発生毒性試験は実施しなかった。BAY 81-8973 の単回投与及び反復投与毒性試験において、ラット及びウサギの生殖器の病理組織学的検査で、有害な所見は認められなかった。

BAY 81-8973 とコージネイト FS が類似しており、また、小児におけるコージネイト FS の臨床的安全性が知られていることから、幼若動物における試験は実施しなかった。更に、幼若動物における試験の必要性を示すような有害作用も毒性試験で認められなかった。

BAY 81-8973 の急性及び反復投与毒性試験における静脈内注射部位の忍容性は、最高試験用量である 4000IU/kg まで良好であった。これは BAY 81-8973 製剤が臨床で長く良好な局所忍容性を示してきた現承認品目のコージネイト FS と同一の製剤組成を有することから予測された。

FⅧは内因性のたん白質であり、BAY 81-8973 及び他の rFⅧ製剤には変異原性はなく、rFⅧの細胞増殖作用又は免疫調節作用も知られていないため、BAY 81-8973 のがん原性試験は実施しなかった。

規格に設定したすべての不純物（2.3.S.3.2、2.3.S.4.1、2.3.S.4.5 参照）については、患者に対する安全性の問題がないことを確認するため、リスク評価において十分に検討した。遺伝毒

性の可能性がある又は遺伝毒性が知られている不純物は検出されなかった。このため、すべての不純物が規格範囲内では安全性は確保されているとみなされる。

要約すると、BAY 81-8973 の単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験及び抗原性試験を実施し、最高試験用量まで有害作用は認められなかった。以上より、BAY 81-8973 の非臨床安全性データは、確立されている rFⅧ製剤の臨床使用経験に加えて、BAY 81-8973 がヒトにおいて安全に使用できることを支持している。

2.6.6.10　図表

図表は本文中に記載した。

引用文献一覧

1) Kirkland DJ et al., Mutagenesis. 1995:10:393-398 (4.3.4 に添付)

2) OECD. 476: OECD Guideline for the Testing of Chemicals In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test. (4.3.5 に添付)

3) EMA. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology derived therapeutic proteins EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006. (4.3.6 に添付)

4) Bril WS et al., Thromb Haemost. 2006:95:341-347 (4.3.7 に添付)

5) Delignat S et al., Haematologica. 2007:92:1423-1426 (4.3.8 に添付)

6) Hausl C et al., Thromb Haemost. 2002:87:840-845 (4.3.9 に添付)

7) Hausl C et al., Blood. 2004:104:115-122 (4.3.10 に添付)

8) Hausl C et al., Blood. 2005:106:3415-3422 (4.3.11 に添付)

9) Healey JF et al., J Thromb Haemost. 2007:5:512-519 (4.3.12 に添付)

10) Reipert BM et al., Thromb Haemost. 2001:86:1345-1352 (4.3.13 に添付)

11) Gaitonde P et al., J Biol Chem. 2013:288:17051-17056 (4.3.14 に添付)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

2.6.7.1.1 BAY 81-897の毒性試験

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Test Compound(s)	Doses [IU/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD, Study Number
Single Dose Toxicity	Rat / SD	iv bolus	1 day	BAY 81-8973	400, 4000	Yes	BHC AG(W)	4.2.3.1.1, PH-35700
Single Dose Toxicity	Rabbits / NZW	iv bolus	1 day	BAY 81-8973	400, 4000	Yes	BHC AG(W)	4.2.3.1.2, PH-35701
Repeat Dose Toxicity	Rat / SD	iv bolus	5 days	BAY 81-8973	40, 120, 400	Yes	BHC AG(W)	4.2.3.2.1, PH-35733
Repeat Dose Toxicity	Rabbits / NZW	iv bolus	5 days	BAY 81-8973	40, 120, 400	Yes	BHC AG(W)	4.2.3.2.2, PH-35732
Genotoxicity	MLA / L5178Y cells	*in vitro*	N/A	N/A	N/A	Yes	BHC AG(B)	4.2.3.3.1.1, PH-37378
Carcinogenicity	N	N	N	N	N	N	N	N
Reproductive and Develop. Toxicity	N	N	N	N	N	N	N	N
Local Tolerance (included in toxicity studies)	Rat / SD and Rabbit / NZW	iv bolus	Up to 5 days	BAY 81-8973	40, 120, 400, 4000	Yes	BHC AG(W)	4.2.3.1.1, PH-35700 4.2.3.1.2, PH-35701 4.2.3.2.1, PH-35733 4.2.3.2.2, PH-35732
Other Toxicity Studies: antigenicity	Hemophilia A mice	iv bolus	5 weeks (once weekly)	BAY 81-8973 / Kogenate FS	40, 200	No	BHC LLC	4.2.3.7.1.1, CB-[redacted]-06

Abbreviations: BHC AG(W)=Bayer HealthCare AG (Wuppertal, Germany); BHC AG(B)=Bayer HealthCare AG (Berlin, Germany); BHC LLC=Bayer HealthCare LLC (Richmond, US); iv = intravenous; N = study type not done; N/A = not applicable, SD = Sprague Dawley; NZW=New Zealand White

2.6.7.1.2　バッファー成分の毒性試験

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Duration of Dosing	Test Compound(s)	Doses [IU/kg]	GLP Compliance	Testing Facility	Location in CTD, Study Number
Genotoxicity	*Salmonella* strains, *E.coli* strain	*In vitro*	N/A	[redacted]	N/A	Yes	[redacted]	4.2.3.7.7.1, RCB-[redacted]-03

[redacted]: [redacted]

2.6.7.2　トキシコキネティクス：　トキシコキネティクス試験の一覧表

Type of Study	Species / Strain	Method of Admin.	Test Compound	Doses [IU/kg]	GLP Compliance	Location, report number .
Repeat Dose Toxicity	Rat / Sprague Dawley	iv bolus	BAY 81-8973	40, 120, 400	Yes	4.2.3.2.1, PH-35733
Repeat Dose Toxicity	Rabbit / New Zealand White	iv bolus	BAY 81-8973	40, 120, 400	Yes	4.2.3.2.2, PH-35732

Abbreviations: Admin. = administration; GLP = good laboratory practice (regulations); iv = intravenous

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Toxicokinetics were measured as part of the repeat-dose toxicity studies in male rats and male rabbits.

Report Title: BAY 81-8973 5-Day Repeat Dose Intravenous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats

Test article: **BAY 81-8973**

Table 3-1: Toxicokinetics (Day 1 and Day 5) in Rats

Species / strain:	Rat / Sprague Dawley	Matrix:	Plasma	Location in CTD: 4.2.3.2.1, PH-35733	
Gender:	Male	Assay:	ELISA		
No. of animals:	3 / time point				
Dose	[IU/kg]		40	120	400
Route			iv bolus	iv bolus	iv bolus
Parameter	**Unit**				
$AUC_{(0-24)}$	[IU·h/L]	Day 1	5839	16115	43886
		Day 5	7733	15626	37457
$AUC_{(0-24)norm}$	[h·kg/L]	Day 1	146	134	110
		Day 5	193	130	93.6
C_{max}	[IU/mL]	Day 1	1104	2739	7724
		Day 5	1329	2099	7082
$C_{max,norm}$	[kg/L]	Day 1	27.6	22.8	19.3
		Day 5	33.2	17.5	17.7

Abbreviations: $AUC_{(0-24)}$ = area under the time-concentration curve, 0 to 24 hours; CTD = common technical document; C_{max} = maximal concentration; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; h = hours; IU = international units; iv = intravenous; kg = kilogram; L = liter; norm = normalized by dose

Additional information: No treatment-related toxicity was observed.

Report Title: BAY 81-8973 5-Day Repeat Dose Intravenous Toxicity Study in Male New Zealand White Rabbits

Test article: **BAY 81-8973**

Table 3-2: Toxicokinetics (Day 1 and Day 5) in Rabbits

Species / strain:	Rabbit / New Zealand White	Matrix:	Plasma	Location in CTD: 4.2.3.2.2, PH-35732	
Gender:	Male	Assay:	ELISA		
No. of animals:	3 / time point				
Dose	[IU/kg]		40	120	400
Route			iv bolus	iv bolus	iv bolus
Parameter	**Unit**				
$AUC_{(0-24)}$	[IU·h/L]	Day 1	12211	46642	111783
		Day 5	15381	39766	121298
$AUC_{(0-24)norm}$	[h·kg/L]	Day 1	305	389	279
		Day 5	385	331	303
C_{max}	[IU/L]	Day 1	1106	4233	11536
		Day 5	1453	4724	14962
$C_{max,norm}$	[kg/L]	Day 1	27.7	35.3	28.8
		Day 5	36.3	39.4	37.4

Abbreviations: $AUC_{(0-24)}$ = area under the time-concentration curve, 0 to 24 hours; CTD = common technical document; C_{max} = maximal concentration; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; h = hours; IU = international units; iv = intravenous; kg = kilogram; L = liter; norm = normalized by dose

Additional information: No treatment-related toxicity was observed.

2.6.7.4　毒性試験：　被験物質（バッチ毎）一覧

Three lots of BAY 81-8973 were used in the toxicology studies, namely lot 27N1R50, lot 27N1TR0, and lot 27N2KJ0. These are clinical lots that were used in the clinical program of BAY 81-8973. In a special toxicity study (antigenicity study), Kogenate FS (nonclinical lot 27N1190 was used as a comparator).

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: **BAY 81-8973**

Table 5-1: Single Dose Toxicity, with 2 Week Recovery Groups

Species / Strain	Method of Administration (Formulation)	Doses [IU/kg]	Gender and No. Per Group	NOAEL [IU/kg]	Noteworthy Findings	Location, Report Number
Rat/SD	iv bolus (clinical formulation)	400, 4000 (2 lots)	6M/dose: main groups 4M/dose: recovery groups	4000	None	4.2.3.1.1, PH-35700
Rabbit/ NZW	iv bolus (clinical formulation)	400, 4000 (2 lots)	3M/dose: main groups 3M/dose: recovery groups	4000	None	4.2.3.1.2, PH-35701

Abbreviations: IU= international units; iv = intravenous; kg = kilogram; M = males; NOAEL = no-observable-adverse-effects level; NZW = New Zealand White; SD = Sprague-Dawley

2.6.7.6　反復投与毒性試験：　重要な試験以外の試験

No data available.

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

Report Title: BAY 81-8973 5-Day Repeat Dose Intravenous Toxicity Study in Male Sprague Dawley Rats

Test Article: **BAY 81-8973**

Repeat Dose Toxicity in Rats

Species/Strain:	Rat/Sprague Dawley	Duration of Dosing:	5 days (daily dosing)		
Initial age:	9-11 weeks	Duration of Postdose:	4 weeks	Location in CTD, Report Number	4.2.3.2.1 PH-35733
Date of 1st dose:	[redacted]	Method of Administration:	iv bolus	GLP compliance:	Yes
Special features:		Vehicle/Formulation:	Excipient/Clinical formulation		
No Observed Adverse-Effect Level:		400 IU/kg			

Daily Dose [IU/kg]	0 (Control)	40	120	400
Gender	M	M	M	M
Number of Animals – Main Groups	10	10	10	10
Number of Animals – Recovery Groups	5	0	0	5
Number of Animals – Toxicokinetic Groups	9	9	9	9
Toxicokinetics: AUC (IU-h/L)				
Day 1	0[a]	5839	16115	43886
Day 5	0[a]	7733	15626	37457
Noteworthy Findings				

No treatment-related changes observed

Abbreviations: AUC = area under the (time-concentration) curve; CTD = common technical document; GLP = good laboratory practice; IU= international units; iv = intravenous; kg = kilogram; L = liter; M = males

[a] all control values were below the limit of detection, 45.8 IU/L

Report Title: BAY 81-8973 5-Day Repeat Dose Intravenous Toxicity Study in Male New Zealand White Rabbits

Test Article: **BAY 81-8973**

Repeat Dose Toxicity in Rabbits

Species/Strain:	Rabbit/NZW	Duration of Dosing:	5 days (daily dosing)		
Initial age:	6-7 months	Duration of Postdose:	4 weeks	Location in CTD, Report Number	4.2.3.2.2 PH-35732
Date of 1st dose:	[redacted]	Method of Administration:	iv bolus	GLP compliance:	Yes
Special features:		Vehicle/Formulation:	Excipient/Clinical formulation		
No Observed Adverse-Effect Level:		400 IU/kg			

Daily Dose [IU/kg]	0 (Control)	40	120	400
Gender	**M**	**M**	**M**	**M**
Number of Animals – Main Groups	6	6	6	6
Number of Animals – Recovery Groups	3	3	3	3
Toxicokinetics: AUC (IU-h/L)				
Day 1	0[a]	12111	46642	111783
Day 5	0[a]	15831	39766	121298

Noteworthy Findings

No treatment-related changes observed

Abbreviations: AUC = area under the (time-concentration) curve; CTD = common technical document; GLP = good laboratory practice; IU= international units; iv = intravenous; kg = kilogram; L = liter; M = males; NZW = New Zealand White

[a] all control values were below the limit of detection, 49.2 IU/L

2.6.7.8 *In Vitro*遺伝毒性試験

Report Title: BAY 81-8973: Forward mutation assay in vitro on L5178Y cells for detection of induced mutagenic effects at the thymidine kinase (*tk*) locus (mouse lymphoma assay)

Test Article: **BAY 81-8973**

Genotoxicity *in vitro* - Mouse Lymphoma Assay

Test for induction of:	Mutant colony formation	Number of independent assays:	2	Location in CTD, Report Number	4.2.3.3.1.1 PH-37378
Strains:	Mouse lymphoma cells, L5178Y	Number of replicate cultures:	2		
Metabolizing system:	Aroclor 1254-induced male rat liver homogenate, S9	No. of cells analyzed/dose:	$1x10^7$(pulse) $5x10^6$ (continuous)	GLP compliance:	Yes
Solvent control:	Excipient	Negative control:	Medium	Positive controls:	Mitomycin C; Cyclophosphamide

Abbreviations: CTD = common technical document; GLP = good laboratory practice; IU= international units; *tk* = thymidine kinase

Cytotoxic effect: not different from controls

Genotoxic effect: none

Metabolic activation	Test Article	Conc. per mL	Survival relative %	Suspension growth %	Rel. total growth %	Viability absolute %	Mutants per 10^6 cells	Mutation index[a]
Pulse treatment (3 hours)								
Without activation	Excipient	25%	100	100	100	101	103	1.0
	Medium	--	100	100	100	125	70	1.0
	BAY 81-8973	3.125%	93	101	115	114	85	0.8
		6.25%	104	101	113	112	84	0.8
		12.5%	87	106	107	102	88	0.9
		25%	92	101	110	110	74	0.7
	Mitomycin C	0.05 µg	72	102	57	70	468	6.7
Pulse treatment (3 hours)								
With activation	Excipient	25%	100	100	100	112	71	1.0
	Medium	--	100	100	100	95	83	1.0
	BAY 81-8973	3.125%	100	98	90	103	77	1.1
		6.25%	106	93	96	115	77	1.1
		12.5%	101	100	100	111	67	0.9
		25%	91	97	89	103	68	1.0
	Cyclophos-phamide	3 µg	64	100	72	68	647	7.8
Continuous treatment (24 hours)								
Without activation	Excipient	4%	100	100	100	85	87	1.0
	Medium	--	100	100	100	96	92	1.0
	BAY 81-8973	0.5%	95	106	102	82	94	1.1
		1%	97	97	92	81	98	1.1
		2%	80	95	97	87	102	1.2
		4%	88	96	93	83	93	1.1
	Mitomycin C	0.025 µg	58	91	48	50	758	8.2

[a] value treatment / value of corresponding control

2.6.7.9　*In Vivo* 遺伝毒性試験

No data available.

2.6.7.10　がん原性試験

Not applicable.

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験

Not applicable.

2.6.7.12　　生殖発生毒性試験：　受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験

Not applicable.

2.6.7.13　生殖発生毒性試験：　胚・胎児発生に関する試験

Not applicable.

2.6.7.14　　生殖発生毒性試験：　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

Not applicable.

2.6.7.15　新生児を用いた試験

Not applicable.

2.6.7.16　局所刺激性試験

Local tolerance was assessed as part of the single dose and repeat-dose toxicity studies in rats and rabbits through visual and histological examination of the injection sites (4.2.3.1.1, PH-35700;4.2.3.1.2, PH-35701; 4.2.3.2.1, PH-35733; 4.2.3.2.2, PH-35732). BAY 81-8973 has the same formulation as the current marketed product, Kogenate FS. No effects on local tolerance were observed including the highest dose tested, 4000 IU/kg.

2.6.7.17 その他の毒性試験

2.6.7.17.1 探索的抗原性試験

Report Title: Exploratory Assessment of the Antigenicity of BAY 81-8973 and Kogenate FS in Hemophilia A Mice

Test Article: **BAY 81-8973** ／ *Kogenate FS*

Other Toxicity Studies

Study Type	Species / (Strain)	Method of Admin.	Doses [IU/kg] (Dosing Duration)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Location in CTD, Report Number
Antigenicity	Hemophilia A mice / (derived from C57)	iv bolus	40, 200: BAY 81-8973 40, 200: Kogenate FS (5 once weekly doses)	10M/group	BAY 81-8973 has reduced frequency and median titer of bAB and nAB than Kogenate FS by end of study (not statistically significant)	4.2.3.7.1.1 CB-[redacted]-06

Abbreviations: bAB = binding antibodies; CTD = common technical document; IU = international units; iv = intravenous; kg = kilogram; M = males; nAB = neutralizing antibodies

2.6.7.17.2　バッファー成分の毒性試験

Report Title:	Salmonella-Escherichia coli/Mammalian-Microsome Reverse Mutation Assay with a Confirmatory Assay
Report No.:	RCB-[redacted]-03
Location in CTD:	4.2.3.7.7.1
Test Article:	[redacted] and [redacted] in 1:1 aqueous solution ([redacted] = [redacted])

Test for Induction of:	Point mutations	Study No.:	No. 6238-183, BP[redacted]-005
Strains:	*S. typhimurium*: TA 1535, TA 1537, TA 98, TA100 *E.coli*: WP2*uvr*A	GLP Compliance:	Yes
No. of Independent Assays:	2	Date of Treatment:	[redacted]
No. of Replicate Cultures:	3		
No. of Cells Analyzed/Culture:	> 0.5 x 10^9		
Metabolizing System:	S9, 10%, rat liver, Aroclor 1254		
Vehicle for test compound:	Deionized water		
Positive control	Benzo[a]pyrene, 2-AA, 2-nitrofluorene, Na azide etc.		
Treatment:	Plate incorporation		
Cytotoxic Effects:	No bacteriotoxicity up to 5000µg/plate		
Genotoxic Effects	No		

Genotoxicity *in vitro* - Reverse Mutation Assay　　Test Article: [redacted]　　Report No.: RCB-[redacted]-03

1st Trial	Test Article	Concentration [μg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2*uvr*A
With activation	Vehicle	0	17	101	12	8	19
	[redacted]	100	19	104	11	6	16
	[redacted]	333	21	99	8	7	13
	[redacted]	1000	19	92	9	9	15
	[redacted]	3330	22	88	6	8	14
	[redacted]	5000	23	88	15	10	18
	Benzo[a]pyrene	2.5	425				
	2-AA	2.5		1282	181	191	
	2-AA	25					370
Without activation	Vehicle	0	15	86	14	5	11
	[redacted]	100	11	75	10	6	18
	[redacted]	333	13	78	11	5	21
	[redacted]	1000	18	79	12	4	19
	[redacted]	3330	13	81	9	8	17
	[redacted]	5000	14	87	12	5	20
	2-nitrofluorene	1	301				
	Na azide	2		1246	814		
	ICR-191	2				269	
	4-nitroquinoline-N-oxide	1					269

2-AA: 2-aminoanthracene

Genotoxicity *in vitro* - Reverse Mutation Assay　　Test Article: [redacted]　　Report No.: RCB-[redacted]-03

2nd Trial	Test Article	Concentration [μg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 98	TA 100	TA 1535	TA 1537	WP2*uvr*A
With activation	Vehicle	0	21	102	11	4	20
	[redacted]	100	19	96	11	8	25
	[redacted]	333	23	111	9	7	18
	[redacted]	1000	23	115	9	10	18
	[redacted]	3330	21	101	9	8	13
	[redacted]	5000	20	99	10	8	16
	Benzo[a]pyrene	2.5	296				
	2-AA	2.5		597	85	88	
	2-AA	25					306
Without activation	Vehicle	0	12	87	12	6	18
	[redacted]	100	15	84	8	5	15
	[redacted]	333	7	65	7	5	21
	[redacted]	1000	11	87	8	6	14
	[redacted]	3330	17	80	11	5	18
	[redacted]	5000	9	82	8	6	17
	2-nitrofluorene	1	247				
	Na azide	2		939	672		
	ICR-191	2				430	
	4-nitroquinoline-N-oxide	1					176

2-AA: 2-aminoanthracene