エイフスチラ静注用

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.6　毒性試験の概要文

CSL ベーリング株式会社

目次

略語・略号一覧 4
2.6.6.　毒性試験の概要文 6
2.6.6.1.　まとめ 6
2.6.6.2.　単回投与毒性試験 11
2.6.6.2.1.　CSL627:CD ラットの単回静脈内(ボーラス)投与毒性試験(試験番号 APQ0010) 11
2.6.6.2.2.　CSL627：カニクイザルの単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0011） 12
2.6.6.3.　反復投与毒性試験 14
2.6.6.3.1.　CSL627 : CD ラットの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（試験番号 APQ0013） 14
2.6.6.3.2.　CSL627：カニクイザルの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0014） 15
2.6.6.4.　遺伝毒性及びがん原性試験 21
2.6.6.5.　生殖発生毒性試験 21
2.6.6.6.　局所刺激性試験 21
2.6.6.6.1.　CSL627 : ウサギの静脈内、動脈内又は静脈周囲投与による局所刺激性試験（試験番号 APQ0012） 22
2.6.6.7.　その他の毒性試験 22
2.6.6.7.1.　CSL627（rFVIII）：ウサギの In Vivo 血栓形成性試験（Giles, A.R. 1980 が報告した Wessler 変法）（試験番号 S30668） 23
2.6.6.7.2.　免疫毒性 24
2.6.6.7.3.　不純物 24
2.6.6.8.　考察及び結論 24
2.6.6.9.　参考文献 26

表の目次

表 2.6.6-1：　毒性試験一覧 7
表 2.6.6-2：　ラットの検査パラメーター（試験番号 APQ0010 及び APQ0013） 7
表 2.6.6-3：　サルの検査パラメーター（試験番号 APQ0011 及び APQ0014） 9
表 2.6.6-4：　単回投与毒性試験 11
表 2.6.6-5：　CSL627 をラットに単回静脈内投与した場合の TK パラメーター 12
表 2.6.6-6：　CSL627 をカニクイザルに単回静脈内投与した場合の TK パラメーター 13
表 2.6.6-7：　反復投与毒性試験 14
表 2.6.6-8：　CSL627 をカニクイザルに反復静脈内投与した場合の TK パラメーター 16
表 2.6.6-9：　CSL627 をカニクイザルに反復静脈内投与した場合の TK パラメーター、ADA 及び aPTT 20
表 2.6.6-10：　局所刺激性試験 22
表 2.6.6-11：　その他の毒性試験 23

図の目次

図 2.6.6-1：　カニクイザルにおける 28 日目投与前の血漿中 FVIII 濃度と ADA 濃度 18
図 2.6.6-2：　カニクイザルにおける 28 日目投与後 0.25 時間の血漿中 FVIII 濃度と ADA 濃度 18
図 2.6.6-3：　カニクイザルにおける 28 日目投与後 0.25 時間の aPTT と ADA 濃度 19

略語・略号一覧

略語・略号	定義（英語）	定義（日本語）
ADA	Anti-drug-antibodies	抗薬物抗体
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the plasma activity-time curve to infinity	血漿中濃度–時間曲線下面積
AUC_{24h}	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to 24 h	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}tlast}$	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to the last concentration	0 時間から最終濃度までの血漿中濃度–時間曲線下面積
blq	Below limit of quantification	定量下限未満
CD ラット	[redacted](SD) rat	[redacted](SD)ラット
C_{max}	Maximum concentration	最高血漿中濃度
dAS	Diluted Antiserum	抗血清希釈液
DNA	Deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
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
h	Hour(s)	時間
i.a.	Intraarterial	動脈内
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IU	International units	国際単位
i.v.	Intravenous	静脈内
kg	Kilogram	キログラム
KO	Knockout	ノックアウト
mL	Milliliter	ミリリットル
n.a.	Not applicable	該当せず
nc	Not calculated	算出せず
nL	Nanoliter	ナノリットル
No.	Number	番号
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PR	Interval between P wave and onset of QRS	PR 間隔：P 波から QRS 開始までの間隔
PTF	Potentiation of thrombus formation	血栓形成作用の増強
p.v.	Perivenous	静脈周囲
QRS	QRS interval	QRS 間隔

略語・略号	定義（英語）	定義（日本語）
QT, QTc	(corrected) QT-interval: time from start of QRS complex to end of T-wave	QT（QTc）間隔：QRS 開始から T 波終了までの時間
rFVIII	Recombinant human coagulation factor VIII	遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子
s	Second(s)	秒
S.D.	Standard Deviation	標準偏差
ST	ST interval	ST 間隔
$t_{1/2\beta}$	Terminal half-life	終末相半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
t_{max}	Time of maximum plasma level	最大濃度までの時間
vWF	von Willebrand Factor	フォン・ヴィレブランド因子

本剤の表記について

本文書を通じて、以下の表記を使用する。

- 本剤（エイフスチラ静注用）について、「CSL627」と表記する。

2.6.6. 毒性試験の概要文

2.6.6.1.　まとめ

CSL627 の毒性試験として、げっ歯類及び非げっ歯類を用いた単回及び反復投与試験を実施した。ラット及びサルで CSL627 の薬理活性が確認されており（試験番号 IVR [redacted]-03 及び IVX [redacted]-10）、Advate®や ReFacto AF®等の競合品の毒性試験にも使用されていることから、これらの動物種を選択した。なお、ラットやサルには膨大な背景データがあり、医薬品の承認申請を目的として実施される毒性試験で標準的に使用される動物種である。臨床で血友病 A 患者に反復投与されることを反映して、28 日間反復投与試験を実施した。動物にとって異種のヒト蛋白質に対する免疫応答が発現する前に毒性を評価するため、6 日目に途中剖検を行った。ラット及びサルに CSL627 を 28 日間投与すると、CSL627 に対する抗体が産生された結果、血漿中の CSL627 濃度が検出限界未満又は無視できる値となったことから、28 日間投与後のトキシコキネティクス（TK）測定は不可能又は困難であった。投与期間が 28 日間を超える反復投与毒性試験を実施する意義は乏しく、長期の反復投与毒性試験を実施しても毒性評価に有益なデータは得られないと考えられる。また、ICH S6(R1)ガイドラインでは、大量の蛋白質を投与した場合、解釈不可能な結果が起こる可能性もあるとされている。このような理由から、CSL627 の（28 日間を超える）長期の反復投与毒性試験は実施しなかった。

血友病 A マウス（FVIII KO マウス）を用いて、市販の FVIII 製剤と比較した非臨床の薬力学的データに基づき、CSL627 を出血傾向の抑制に適用する場合の 1 日最大用量は 50 IU/kg を予定している。また、生命の危険がある場合の最大用量は、患者当たり 1 日 200 IU/kg を予定している。これらの臨床用量に基づき、毒性試験の投与量は FVIII のヒト 1 日平均投与量、並びに臨床投与量を上回り 30 倍までの安全域を担保した 2 用量を設定した。本剤の臨床適用経路が静脈内投与であることから、静脈内投与により毒性試験を実施した。

局所刺激性の評価は、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験に組み込んで実施した。また、臨床適用経路並びに想定外の経路で CSL627 を投与した場合の影響を、ウサギを用いた局所刺激性試験で検討した。

CSL627 の血栓形成作用について、ウサギうっ血性血栓症モデル（Wessler 変法）により検討した。このモデルは凝固促進活性について確立された標準的なモデルである（Giles et al., 1980）。

表 2.6.6-1：　毒性試験一覧

試験の種類	動物種	試験番号	バッチ No.	GLP 適合
単回投与毒性試験、静脈内投与	ラット	APQ0010	[redacted]	適
単回投与毒性試験、静脈内投与	サル	APQ0011		適
28 日間反復投与毒性試験、静脈内投与	ラット	APQ0013		適
28 日間反復投与毒性試験、静脈内投与	サル	APQ0014		適
局所刺激性試験、静脈内・動脈内・静脈周囲投与	ウサギ	APQ0012		適
血栓形成性試験、静脈内投与	ウサギ	S30668		適

単回及び反復投与毒性試験における検査パラメーター

ラット及びサルを用いて単回及び反復投与毒性試験を実施した。ラット及びサルの検査パラメーターを、それぞれ表 2.6.6-2 及び表 2.6.6-3 に示す。

表 2.6.6-2：　ラットの検査パラメーター（試験番号 APQ0010 及び APQ0013）

検査項目	測定時期		検査パラメーター
	試験番号 APQ0010 単回投与毒性試験	試験番号 APQ0013 反復投与毒性試験	
抗薬物抗体（ADA）	実施せず	投与 2 日前（主試験及び途中剖検の動物）、 6 日目（途中剖検の動物）、 16 日目及び試験終了時（主試験の動物）	CSL627 に対する抗 FVIII 抗体
血液生化学的検査	6 日目（試験終了時）	6 日目（途中剖検の動物）及び 5 週目（主試験の動物）	アルカリフォスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、ブドウ糖、総コレステロール、トリグリセリド、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン、総蛋白、アルブミン、α1 グロブリン、α2 グロブリン、β グロブリン、γ グロブリン
体重	投与 7 日前、投与日（1 日目）、剖検まで観察期間中連日（主試験の動物）	投与開始の前週（−1 週目）、投与開始日（0 週目）、5 日目（途中剖検の動物）、剖検まで投与期間及び回復期間中週 1 回	体重
摂餌量	投与の前週（−1 週目）、及び試験期間中 1 日 1 回	投与開始の前週（−1 週目）、並びに投与期間及び回復期間中週 1 回	動物当たりの 1 日摂餌量

表 2.6.6-2：　ラットの検査パラメーター（試験番号 APQ0010 及び APQ0013）（続き）

検査項目	測定時期		検査パラメーター
	試験番号 APQ0010 単回投与毒性試験	試験番号 APQ0013 反復投与毒性試験	
血液学的検査（骨髄塗沫）	試験終了時（主試験の動物）	試験終了時（全例）	検査が必要となった場合に備えて試料保存
血液学的検査（末梢血）	6 日目（試験終了時）	6 日目（途中剖検の動物）、5 週目（主試験の動物）、投与期間終了後 14 日目（aPTT のみ）	ヘマトクリット、血色素量、赤血球数、網状赤血球数、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、平均赤血球容積（MCV）、白血球数、白血球型別百分率、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間
Irwin の神経行動学的検査	実施せず	投与開始前 1 回、1 日目の投与後 10 分及び 3 時間（主試験の最初の 6 例/性/群）	体温（直腸温）、生死、自発運動、不穏、無関心、もだえ反応、闘争、常同行動、振戦、攣縮、痙攣、眼球突出、呼吸、警戒性、驚愕反応、正向反射の消失、異常な体移動、異常歩行、挙尾、立毛、瞳孔径、触反応、恐怖、耳介反射、カタレプシー、受動性、攻撃性、体幹緊張度、握力、皮膚血流量、チアノーゼ、眼瞼下垂、流涙、流涎、麻痺、身づくろい、下痢、発声、排尿の増加
剖検*及び病理組織学的検査	6 日目（試験終了時）	6 日目（途中剖検の動物）、4 週間投与後（主試験の動物）、投与期間終了後 15 日目（回復性試験の動物、病理組織学的検査が必要となった場合に備えて組織を固定液で保存）	副腎、大動脈（胸部）、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体、眼球、関節を含む大腿骨、ハーダー腺、頭部、心臓、回腸、空腸、腎臓、涙腺、咽頭、肝臓、肺+気管支、リンパ節（左腋窩、下顎、腸間膜）、食道、視神経、卵巣、膵臓、投与部位（注射部位）、パイエル板、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（顎下腺、耳下腺、舌下腺）、坐骨神経、精嚢、骨格筋、皮膚及び乳腺、脊髄、脾臓、胸骨+骨髄、胃、精巣、胸腺、甲状腺及び上皮小体、舌、気管、尿管、膀胱、子宮頸、子宮、膣

* 動物を詳細な剖検に供した。

表 2.6.6-2：　ラットの検査パラメーター（試験番号 APQ0010 及び APQ0013）（続き）

検査項目	測定時期		検査パラメーター
	試験番号 APQ0010 単回投与毒性試験	試験番号 APQ0013 反復投与毒性試験	
眼科的検査	実施せず	投与開始前（主試験、途中剖検、回復性試験及び予備の動物）、5 日目（途中剖検の動物）及び 4 週目（主試験の第 1 及び 4 群の動物）	眼付属器、結膜、角膜、強膜、前眼房、虹彩（瞳孔散大）、水晶体、硝子体及び眼底
器官重量	6 日目（試験終了時）	6 日目（途中剖検の動物）、4 週間投与後（主試験の動物）、投与期間終了後 15 日目（回復性試験の動物）	副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺及び主気管支、卵巣、下垂体、前立腺、唾液腺、精嚢、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺及び上皮小体、子宮及び子宮頸
尿検査	6 日目、終夜	6 日目（途中剖検の動物）及び 4 週目（主試験の動物）、終夜	外観、尿量、pH、比重、蛋白、ナトリウム、カリウム、塩素、ブドウ糖、ケトン体、胆汁色素、血色素、尿沈渣の検鏡

表 2.6.6-3：　サルの検査パラメーター（試験番号 APQ0011 及び APQ0014）

検査項目	測定時期		検査パラメーター
	試験番号 APQ0011 単回投与毒性試験	試験番号 APQ0014 反復投与毒性試験	
抗薬物抗体（ADA）	実施せず	1 日目及び 6 日目（主試験及び途中剖検の動物）、14 日目及び 29 日目（主試験の動物）	CSL627 に対する抗 FVIII 抗体
血液生化学的検査	投与前及び 6 日目	投与開始前（全例）、6 日目（途中剖検の動物）及び 29 日目（主試験の動物）	アルカリフォスファターゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、総ビリルビン、尿素窒素、クレアチニン、ブドウ糖、総コレステロール、トリグリセリド、ナトリウム、カリウム、塩素、カルシウム、無機リン、総蛋白、アルブミン、α1 グロブリン、α2 グロブリン、β グロブリン、γ グロブリン

表 2.6.6-3：　サルの検査パラメーター（試験番号 APQ0011 及び APQ0014）（続き）

検査項目	測定時期		検査パラメーター
	試験番号 APQ0011 単回投与毒性試験	試験番号 APQ0014 反復投与毒性試験	
血圧	実施せず	投与開始前及び 5 日目（投与後 2 時間及び 24 時間、全例）、投与 4 週目（投与後約 2 時間及び 24 時間、主試験の動物）	血圧、心拍数
体重	馴化期間中少なくとも週 1 回、投与日（1 日目）、6 日目、11 日目及び剖検前	馴化期間中少なくとも週 1 回、投与開始日（0 週目）、剖検まで試験期間中週 1 回	体重
心電図	実施せず	投与開始前及び 5 日目（投与後 2 時間及び 24 時間、全例）、投与 4 週目（投与後約 2 時間及び 24 時間、主試験の動物）	標準四肢誘導（I、II 及び III）及び増高単極肢誘導（aVR、aVL 及び aVF）、心拍数、心電図波形（P、PR、QRS、ST、QT 及び QTc 間隔）
血液学的検査（骨髄塗沫）	実施せず	試験終了時（全例）	検査が必要となった場合に備えて試料保存
血液学的検査（末梢血）	投与前及び 6 日目	投与開始前（全例）及び 6 日目（途中剖検の動物）、1、2 及び 3 週目（主試験の動物、aPTT のみ）、29 日目（主試験の動物）	ヘマトクリット、血色素量、赤血球数、網状赤血球数、平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）、平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）、平均赤血球容積（MCV）、白血球数、白血球型別百分率、血小板数、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間
剖検*及び病理組織学的検査	6 日目（雌 2+雄 2）及び 11 日目（雌 1+雄 1）	6 日目（途中剖検の動物）及び 4 週間投与後（主試験の動物）	副腎、大動脈（胸部）、脳、盲腸、結腸、十二指腸、精巣上体、眼球、大腿骨、胆嚢、心臓、回腸、空腸、投与部位、腎臓、咽頭、肝臓、肺+気管支、リンパ節（下顎、腸間膜、左腋窩）、食道、視神経、卵巣、膵臓、パイエル板、下垂体、前立腺、直腸、唾液腺（顎下腺、耳下腺、舌下腺）、坐骨神経、精嚢、骨格筋、皮膚及び乳腺、脊髄、脾臓、胸骨+骨髄、胃、精巣、胸腺、甲状腺及び上皮小体、舌、気管、尿管、膀胱、子宮及び子宮頸、膣

* 動物を詳細な剖検に供した。

表 2.6.6-3：　サルの検査パラメーター（試験番号 APQ0011 及び APQ0014）（続き）

検査項目	測定時期		検査パラメーター
	試験番号 APQ0011 単回投与毒性試験	試験番号 APQ0014 反復投与毒性試験	
眼科的検査	実施せず	投与開始前及び 6 日目（主試験及び途中剖検の動物）、4 週目（主試験の動物）	眼付属器、結膜、角膜、強膜、前眼房、虹彩（瞳孔散大）、水晶体、硝子体及び眼底
器官重量	6 日目（雌 2+雄 2）及び 11 日目（雌 1+雄 1）	6 日目（途中剖検の動物）、29 又は 30 日目（主試験の動物）	副腎、脳、精巣上体、心臓、腎臓、肝臓、肺及び主気管支、卵巣、下垂体、前立腺、唾液腺（顎下腺）、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺及び上皮小体、子宮及び子宮頸
尿検査	投与前及び 6 日目、終夜	投与開始前及び 5 日目（全例）、4 週目（主試験の動物）、終夜	外観、尿量、pH、比重、蛋白、ナトリウム、カリウム、塩素、ブドウ糖、ケトン体、胆汁色素、血色素、尿沈渣の検鏡

2.6.6.2.　単回投与毒性試験

ラット及びサルを用いて、CSL627 の単回静脈内投与毒性試験を最高 1500 IU/kg までの投与量で実施した（表 2.6.6-4）。

表 2.6.6-4：　単回投与毒性試験

試験の種類	試験番号	バッチ No.	使用製剤	GLP 適合
単回投与毒性試験、ラット	APQ0010	[redacted]	CSL627	適
単回投与毒性試験、サル	APQ0011	[redacted]	CSL627	適

2.6.6.2.1.　CSL627：CD ラットの単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0010）

[redacted](SD)ラットに CSL627 を単回静脈内（ボーラス）投与し、5 日間観察して全身毒性及びトキシコキネティクス（TK）を評価した。CSL627 を投与量 50、250 及び 1500 IU/kg で、1 群当たり雌雄各 5 例のラットに投与した。対照群の雌雄各 5 例には、CSL627 の最高投与量群と同一液量（3.61 mL/kg）の生理食塩液（0.9%）を投与した。さらに、対照群に雌雄各 3 例、各投薬群に雌雄各 9 例を割り付け、これらの動物で TK を評価した。試験期間中、一般状態・死亡の有無の観察、体重・摂餌量測定、血液学的検査、血液生化学的検査、TK 測定、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した（表 2.6.6-2）。TK 測定のため投与前、投与後 15 分及び 30 分、並びに投与後 1、4、6、12 及び 24 時間に採血した。

試験期間中、死亡や投与に起因する症状あるいは注射部位の反応は認められなかった。投与に起因する変化が認められなかったことから、観察期間は 5 日間とした。

TK 試験（表 2.6.6-5）では、CSL627 の投与量を 50～1500 IU/kg の範囲で増加すると、最高血漿中濃度（C_{max}）並びに全身曝露量（AUC 及び AUC_{24h}）の増加が確認され、線形性が

みられたが、用量比例性は認められなかった。試験に用いた投与量の範囲で終末相半減期（$t_{1/2\beta}$）は 2.33～5.11 時間であり、半減期に関して用量依存性はみられなかった。AUC パラメーターは、試験に用いたすべての投与量で雌より雄で高値であった。最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）も 50 及び 250 IU/kg で雄が高値であったが、1500 IU/kg では雌雄で同等であった。C_{max} に性差はみられなかった。

表 2.6.6-5：　CSL627 をラットに単回静脈内投与した場合の TK パラメーター

CSL627 を静脈内投与した場合の TK パラメーター（n = 3）								
群	投与量（IU/kg）	性別	C_{max}（IU/mL）	t_{max}（h）	$AUC_{0\text{-}tlast}$（IU•h/mL）	AUC（IU•h/mL）	AUC_{24h}（IU•h/mL）	$t_{1/2\beta}$（h）
2	50	雄	0.88	1.00	3.05 [1]	3.74	8.82 [2]	2.33
		雌	0.89	0.25	0.91	nc	1.27	nc
3	250	雄	2.05	0.50	13.62	16.15	15.92	4.34
		雌	2.98	0.25	8.90	nc	9.90	nc
4	1500	雄	8.04	0.25	26.74	31.44	30.44	5.11
		雌	8.26	0.25	21.56	24.37	24.34	4.21

[1] $AUC_{0\text{-}tlast}$：12 時間後の濃度は外れ値とみなし、曲線のあてはめ及び $AUC_{0\text{-}tlast}$ の算出には使用しなかった。
[2] AUC_{24h}：AUC_{24h} の算出には、外れ値を含むすべての測定濃度を考慮に入れたことに留意すべきである。

1500 IU/kg 群の雌で活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）が対照群と比べてわずかに延長したが、測定値がこのパラメーターの正常範囲内にあることから、本所見は毒性学的に意義ある変化とは考えられなかった。

FVIII 活性を阻害するような抗体の産生を示す有意な aPTT の延長は認められなかったことから、抗 CSL627 抗体に関連した免疫応答のエビデンスは認められなかった。この結果は、単回投与では予測されたことである。

雄の血漿中尿素濃度は投薬群間で用量依存的な傾向はみられなかったものの、対照群と比べて統計学的に有意に低下した。しかし、本変化に関連する病理学的所見が認められなかったことから、対照群との差は有害作用を反映した所見ではなく、投薬と関連があるとは考えられなかった。

中枢神経系への影響を示す一般状態、肉眼的変化あるいは病理組織学的変化は認められなかった（検査パラメーターは表 2.6.6-2 を参照）。

以上より、ラットに CSL627 を最高投与量 1500 IU/kg まで単回静脈内（ボーラス）投与すると、有害作用を示唆する所見及び注射部位の刺激性は認められず、忍容性が良好であった。したがって、本試験条件下で無毒性量（NOAEL）は 1500 IU/kg、概略の致死量は 1500 IU/kg を超えると考えられた。

2.6.6.2.2.　CSL627：カニクイザルの単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0011）

カニクイザルに CSL627 を単回静脈内（ボーラス）投与し、全身毒性及び TK について検討した。CSL627 を投与量 50、250 及び 1500 IU/kg で、1 群当たり雌雄各 3 例のサルに単回投与した（1 日目）。対照群の雌雄各 3 例には、CSL627 の最高投与量群と同一液量（3.75 mL/kg）

の生理食塩液（0.9%）を投与した。1 群当たり雌雄各 2 例を 6 日目に途中剖検し、残りの 1 群当たり雌雄各 1 例は 11 日目に剖検した。

試験期間中、一般状態・死亡の有無の観察、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査、TK 測定、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した（表 2.6.6-3）。TK 測定のため投与前、投与後 15 及び 30 分、並びに投与後 1、3、6、12 及び 24 時間に採血した。

表 2.6.6-6 に示すように、投薬群では血漿中 CSL627 濃度が投与量に応じて増加したが、対照群の血漿中 FVIII 濃度は生理的範囲内にあり、対照群の動物で薬物の混入は認められなかった。50 IU/kg 群では、内因性のサル FVIII に由来するバックグラウンドの FVIII 活性が高いため、血漿中濃度時間曲線が極めて平坦でこの投与量に見合う適切な曲線にならなかったことから、50 IU/kg 群の薬物動態（PK）パラメーター解析はそれほど信頼性が高くないと考えられた。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}tlast}$ は雌雄とも投与量に応じて増加し、CSL627 を最高 1500 IU/kg まで単回投与した場合の曝露量の増加は投与量に比例していた。本試験ではすべての投与量で雌と比べて雄で高い曝露量が観察されたことは興味深い。この結果は、サルを用いた CSL627 の PK 試験（試験番号 APQ0015）の結果、及びラットの単回投与毒性試験（試験番号 APQ0010）の AUC 値と一致している。試験に用いた用量範囲で、各動物の $t_{1/2\beta}$ は 7.00～21.5 時間（算術平均値：9.11～21.5 時間）であった。

表 2.6.6-6：　CSL627 をカニクイザルに単回静脈内投与した場合の TK パラメーター

CSL627 を静脈内投与した場合の TK パラメーター（n = 3）						
群	性別	投与量（IU/kg）	算術平均			
			C_{max}（IU/mL）	t_{max}（h）	$AUC_{0\text{-}tlast}$（IU•h/mL）	$t_{1/2\beta}$（h）
2	雄	50	2.04	0.25	18.8	21.5 [1]
	雌		1.51	0.25	13.1	9.96 [2]
3	雄	250	7.38	0.25	81.4	12.2
	雌		6.19	0.25	57.6	9.11
4	雄	1500	35.4	0.25	410	10.2
	雌		38.8	0.25	293	9.58

[1] n = 1（一部の動物については適切な曲線のあてはめができなかったため、$t_{1/2\beta}$ の算術平均値から除外した。）
[2] n = 2（1 例については適切な曲線のあてはめができなかったため、$t_{1/2\beta}$ の算術平均値から除外した。）

生存率、一般状態、体重増加量、血液学的検査、血液生化学的検査及び尿検査パラメーター並びに器官重量に CSL627 投与の影響はみられず、投与に起因する肉眼的変化及び病理組織学的所見も認められなかった。なお、動物の一般状態に変化がみられなかったことから、観察期間は 11 日間とした。

注射部位では投与手技に関連した紫斑及び腫脹が認められたが、これらの変化は生理食塩液を投与した対照群を含むすべての群に発現し、各群の発現頻度及び分布が類似していたことから、CSL627 投与との関連はないと考えられた。

以上より、カニクイザルに CLS627 を最高用量 1500 IU/kg で単回静脈内（ボーラス）投与すると、投薬の影響は認められず、忍容性が良好であった。本試験条件下で NOAEL は 1500 IU/kg、概略の致死量は 1500 IU/kg を超えると考えられた。

2.6.6.3.　反復投与毒性試験

ラット及びサルを用いて、CSL627 の反復投与毒性試験を実施した。表 2.6.6-7 に反復投与毒性試験の一覧を示す。ラットでは、CSL627 を投与量 50、250 及び 1250 IU/kg で 28 日間連日静脈内投与し、14 日間の回復期間を設けた。サルでは、CSL627 を投与量 50、150 及び 500 IU/kg で 28 日間連日静脈内投与した。

表 2.6.6-7：　反復投与毒性試験

試験の種類	試験番号	バッチ No.	使用製剤	GLP 適合
4 週間反復投与毒性試験、ラット	APQ0013	[redacted]	CSL627	適
4 週間反復投与毒性試験、サル	APQ0014	[redacted]	CSL627	適

2.6.6.3.1.　CSL627：CD ラットの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（試験番号 APQ0013）

[redacted](SD)ラットに CSL627 を最長 4 週間静脈内（ボーラス）投与し、全身毒性及び TK を評価した。一部の動物について投与後 2 週間の休薬期間を設け、投与に起因する影響の回復性を検討した。異種のヒト蛋白質に対する免疫応答が発現する前の初期毒性を検討するため、1 群当たり雌雄各 5 例（途中剖検群）を 6 日目に剖検した。

1 群当たり雌雄各 10 例（及び途中剖検群として雌雄各 5 例）のラット 3 群に、CSL627 を投与量 50、250 又は 1250 IU/kg/日で投与した。対照群の雌雄各 10 例（及び途中剖検群の雌雄各 5 例）には、最高投与量群と同一液量（3.01 / 3.48 mL/kg）の生理食塩液（0.9%）を投与した。

また、サテライト動物として対照群に雌雄各 3 例、各投薬群に雌雄各 9 例を割り付け、TK 評価を行った。TK 測定のため 28 日目の CSL627 投与前、投与後 15 及び 30 分、並びに投与後 1、4、6、12 及び 24 時間に採血した。

さらに、投与に起因する影響の回復性を検討するため、対照群と最高投与量群（1250 IU/kg/日群）に雌雄各 5 例を割り付けた（回復性試験）。回復性試験の動物には、4 週間投与後 2 週間の休薬期間を設けた。

試験期間中、一般状態・死亡の有無の観察、体重・摂餌量測定、Irwin 法による神経行動学的検査、眼科的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、血漿中 CSL627 濃度測定、抗薬物抗体（ADA）分析、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した（表 2.6.6-2）。

投与液の濃度分析データから、9、14 及び 28 日目に第 2 群（50 IU/kg/日群）の動物に投与した投与液の濃度が低いことが判明した。実際の投与量は目標とした 50 IU/kg/日には達せず、

約 30 IU/kg/日の投与量であることが示唆された。しかし、投与液調製の記録には、実際の濃度が目標濃度より低下するような技術的問題のあったことを示す矛盾点は認められなかった。

本試験では抗 CSL627 抗体が産生された結果、28 日目に採取した血漿中の CSL627 濃度が検出限界未満又は無視できる値であったことから、28 日間投与後の TK 測定はできなかった。

6 日目には CSL627 に対する免疫応答は認められず（CSL627 に反応する抗 FVIII 抗体を有する動物は 0%）、忍容性は良好であった。しかし、16 日目には 50 IU/kg/日群の雄 30%及び雌 80%、250 及び 1250 IU/kg/日群の雌雄 100%で CSL627 に反応する抗 FVIII 抗体が認められた。28 日目には 50 IU/kg/日群の雌雄 90%、250 及び 1250 IU/kg/日群の雌雄 100%で抗体反応が認められた。

4 週間投与後に 1250 IU/kg/日群の雌雄で aPTT の軽度延長がみられたが、これは予測された変化であり、毒性を示す変化ではなくヒト抗原に対する強い免疫応答の結果と考えられた。異種のヒト FVIII 蛋白質である CSL627 を連日投与した結果、中和活性のある抗 FVIII 抗体が産生された。抗 FVIII 抗体は内因性の FVIII と交差反応し、aPTT の軽度延長にみられるように、凝固反応を阻害することが明らかとなった。

中枢神経系への影響を示唆する一般状態の変化、剖検所見又は病理組織学的変化は認められなかった（表 2.6.6-2 に検査パラメーターの一覧を示す）。

以上より、ラットに CSL627 を最高用量 1250 IU/kg/日で 6 又は 28 日間反復静脈内（ボーラス）投与すると、有害作用を示唆する所見は認められず、忍容性が良好であった。16 及び 28 日間投与後には、投薬群で CSL627 に対する抗体産生を示す免疫応答が認められたが、この免疫応答により CSL627 の毒性評価が妨げられることはなかった。本試験条件下で、NOAEL は 1250 IU/kg/日と考えられた。

2.6.6.3.2.　CSL627：カニクイザルの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（試験番号 APQ0014）

カニクイザルに CSL627 を 4 週間静脈内（ボーラス）投与し、試験途中の 6 日目に途中剖検し、全身毒性及び TK を評価した。1 群当たり雌雄各 3 例のカニクイザル 3 群に、CSL627 を投与量 50、150 又は 500 IU/kg/日で 4 週間連日投与した。対照群の雌雄各 3 例には、最高投与量群と同一液量（1.25 mL/kg）の生理食塩液（0.9%）を投薬群と同様の頻度で投与した。

また、異種のヒト蛋白質に対する免疫応答が発現する前の初期毒性を検討するため、1 群当たり雌雄各 1 例を各投薬群に割り付け、5 日間投与後の 6 日目に途中剖検した。試験期間中、一般状態・死亡の有無の観察、体重測定、眼科的検査、心電図検査、血圧測定、血液学的検査、血液生化学的検査、TK 測定、ADA 分析、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施した（表 2.6.6-3）。

TK 測定のため 1 及び 28 日目の投与前、投与後 15 及び 30 分、並びに投与後 1、3、6、12 及び 24 時間に採血した。TK 解析結果を表 2.6.6-8 に示す。

1 日目の TK 測定では、すべての投与量で用量依存的な薬物曝露が認められ、対照群の動物では生理的な FVIII 濃度であった。すなわち、対照群の血漿には被験物質の混入は認めら

れなかった。血漿中濃度及び TK パラメーターに性差は認められなかった。試験に用いた投与量の範囲で、各動物の $t_{1/2\beta}$ は 2.28～18.27 時間（算術平均値：5.82～11.9 時間）の範囲にあった。

これらの TK 試験結果により、以前に実施した試験（試験番号 APQ0015）でカニクイザルに CSL627 を 250 IU/kg の用量で単回静脈内投与して得られた PK データ、AUC_{24h} 平均値 102 IU•h/mL 及び $t_{1/2\beta}$ 平均値 10 時間が確認された。カニクイザルの単回投与毒性試験（試験番号 APQ0011）では、CSL627 の投与量 250 及び 1500 IU/kg における $t_{1/2\beta}$ 平均値は、9～12 時間であった。

表 2.6.6-8：　CSL627 をカニクイザルに反復静脈内投与した場合の TK パラメーター

CSL627 を静脈内投与した場合の TK パラメーター　1 日目（n = 4）							
群	性別	投与量（IU/kg/日）	算術平均				
			C_{max}（IU/mL）	t_{max}（h）	$AUC_{0\text{-tlast}}$（IU•h/mL）	AUC_{24h}（IU•h/mL）	$t_{1/2\beta}$（h）
2	雄	50	1.72	0.81	13.9	14.6	5.82
	雌		1.58	0.25	15.0	15.2	9.25
3	雄	150	3.66	0.81	40.4	41.1	10.3
	雌		4.05	0.31	45.6	42.6	10.2
4	雄	500	15.3	0.25	144	156	11.9
	雌		13.9	0.25	155	155	10.4
28 日目（n = 3）							
群	性別	投与量（IU/kg/日）	算術平均				
			C_{max}（IU/mL）	t_{max}（h）	$AUC_{0\text{-tlast}}$（IU•h/mL）	AUC_{24h}（IU•h/mL）	$t_{1/2\beta}$（h）
2	雄	50	1.67 [1]	0.25 [1]	9.38	9.43	6.40 [2]
	雌		2.48 [1]	0.25 [1]	16.5	16.5	4.35 [2]
3	雄	150	nc	nc	0.00	0.00	nc
	雌		1.97 [2]	0.50 [2]	1.58	1.58	nc
4	雄	500	6.59 [1]	0.25 [1]	19.0	22.3	4.44 [2]
	雌		3.46 [2]	0.25 [2]	1.59	1.96	1.44 [2]

[1] n = 2
[2] n = 1

6 日目に第 4 群（500 IU/kg/日）の一部の動物で、わずかに抗 CSL627 抗体の産生を示す傾向が認められたが、各抗体価はいずれも設定した定量下限未満であった。

14 日目には第 3 及び 4 群（150 及び 500 IU/kg/日）の血漿の大部分（83.3%）で検出可能なレベルの抗体価が認められ、33.3%の動物では定量下限を上回っていた。同様に CSL627 の 28 日間投与後には、被験物質を投与したすべての動物の血漿で検出可能なレベルの抗体価が認められたが、見かけ上は抗体価のばらつきが大きかった。一部の動物の血漿（第 2 群の全例、第 3 群の 16%及び第 4 群の 50%）では抗体価が定量下限未満であったが、これ以外の血漿（第 3 群の 83.3%及び第 4 群の 50%）では抗 CSL627 抗体価が定量下限を超え、これらの動物では CSL627 の全身曝露量が低下した（図 2.6.6-1 及び図 2.6.6-2）。このように、異種の

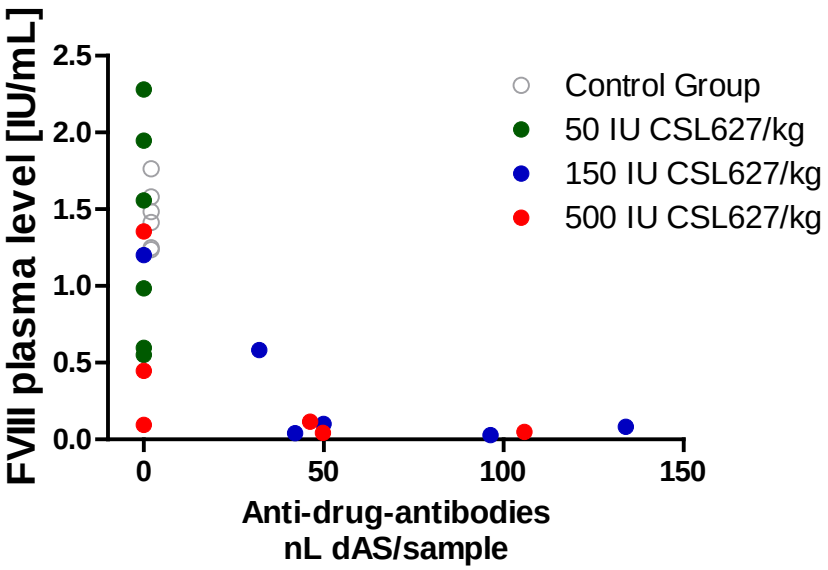
ヒト蛋白質に対する中和 ADA 及び非中和 ADA が産生されたため、血漿中の CSL627（及びその FVIII 活性）が検出限界未満又は無視できる量となり、28 日目の TK 測定は困難であった。これは抗原抗体複合体が急速に形成された後に迅速に除去された可能性が考えられ、投与量が増加すると抗体産生の程度が増加していることから、CSL627 投与との関連が考えられた。28/29 日目の TK 解析及び ADA 測定の結果を表 2.6.6-9 に要約する。

28 日目には、すべての投与量で FVIII 濃度の大幅な低下が認められた。数例の動物では FVIII 濃度がすでに投与前から有意に低値であり、CSL627 最終投与後のいずれの採血時点でも有意に低値であった。このような観察結果は、図 2.6.6-1 及び図 2.6.6-2 に示されるように、産生された抗 CSL627 抗体のうち、外部から投与された rFVIII とサル由来の内因性 FVIII の両者を認識する中和抗体に起因する可能性が高い。150 及び 500 IU/kg/日群の雌で 2 週目、150 及び 500 IU/kg/日群の雌雄で 3 週目及び 29 日目に、aPTT で測定した凝固時間の延長が認められたことから、この結論が裏付けられる。29 日目には、ADA 濃度が測定可能なレベルであった多くの動物で aPTT が延長し（約 50 秒でカットオフ）、各動物の aPTT 値と ADA 濃度との間にある程度の相関関係がみられた（図 2.6.6-3）。したがって、aPTT の延長は毒性変化というよりは、むしろヒト由来の抗原に対する免疫反応と考えられる。サルにとって異種蛋白質である CSL627 を連日投与すると、交差反応性が高い中和 ADA が産生され、内因性 FVIII の活性が阻害される。このため、28 日目の投与前 FVIII 濃度が低下し、凝固反応が抑制されたと考えられる。

図 2.6.6-1 及び図 2.6.6-2 は、ADA 濃度が定量下限を超えるサルで全体的に血漿中 FVIII 濃度が低下していることを明瞭に示している。発色合成基質法による FVIII 活性測定での抗体に起因する検出阻害、及び／又は急速に免疫複合体が形成された結果、FVIII の血漿クリアランスが増加したことによる FVIII 濃度の低下で説明される。形成された抗原–抗体複合体は、貪食性マクロファージが関わるオプソニン作用により急速に除去される可能性が非常に高い。最終投与の 0.25 時間後には、大多数の動物（約 75%）で CSL627 投与による血漿中 FVIII 濃度の著しい上昇がみられなかった（図 2.6.6-2）ことから、ADA が CSL627 のクリアランスに直接的に影響することが明白であった。興味深いことに、高用量 2 群の ADA 陽性動物では血漿中 FVIII 濃度が対照群の動物よりも低値であり（図 2.6.6-1）、サルの内因性 FVIII 活性を阻害する交差反応性の ADA が存在することを示している。

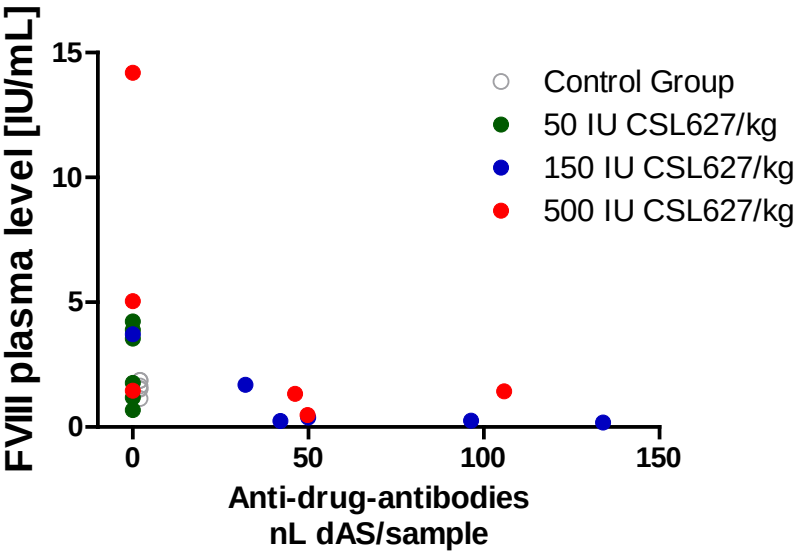
CSL627 に対する ADA の産生は、投与量の増加に応じて顕著になった。このため、投与後の時間経過とともに血漿中 FVIII 濃度は個体間のばらつきが大きくなり、$t_{1/2\beta}$ を算出できたのは数例のみであった。28 日目については、投薬群で信頼性の高い TK パラメーター及び線形性に関する結論が得られなかった。一方、対照群の動物の内因性 FVIII 濃度は 1～28 日目まで一定であった。

図 2.6.6-1：　カニクイザルにおける 28 日目投与前の血漿中 FVIII 濃度と ADA 濃度



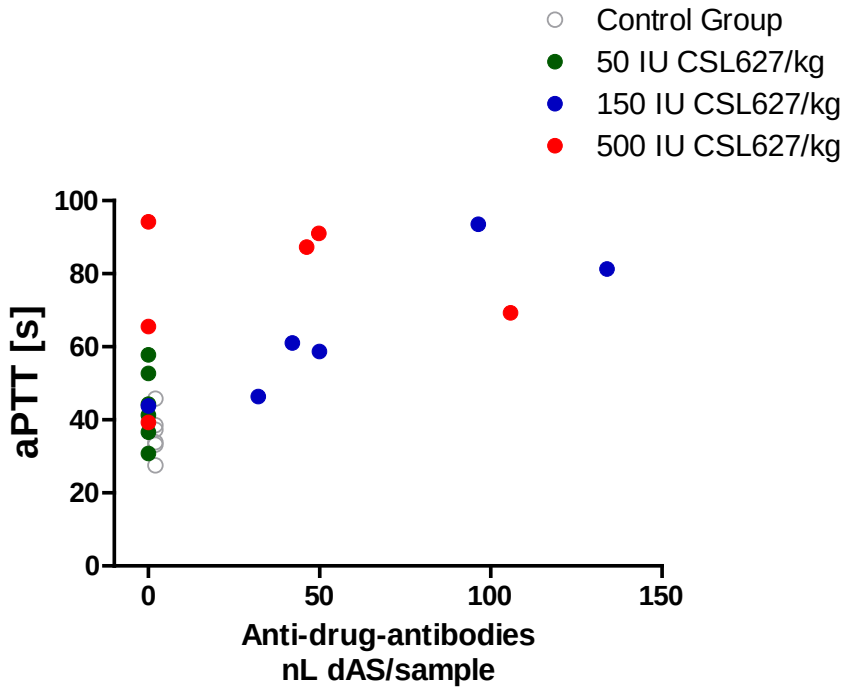
dAS：抗血清希釈液（diluted antiserum）

図 2.6.6-2：　カニクイザルにおける 28 日目投与後 0.25 時間の血漿中 FVIII 濃度と ADA 濃度



dAS：抗血清希釈液（diluted antiserum）

図 2.6.6-3：　カニクイザルにおける 28 日目投与後 0.25 時間の aPTT と ADA 濃度



dAS：抗血清希釈液（diluted antiserum）

全体的に、カニクイザルに CSL627 を最高投与量 500 IU/kg/日まで反復静脈内（ボーラス）投与すると、概ね忍容性が良好であった。

投与に関連した一般状態の変化として、6 日目以降に 150 IU/kg/日群の雌雄全例、並びに 500 IU/kg/日群の雄 4 例中 3 例及び雌の全例で、一過性の振戦がみられた。振戦の発現は、6 日目以降にみられた CSL627 に対する抗 FVIII 抗体産生の挙動とかなり一致した。したがって、この所見は急性の抗体反応の結果として免疫系の活性化に起因している可能性がある。

被験物質の投与手法に関連した注射部位の紫斑及び腫脹がみられ、病理組織学的検査で血管周囲及び皮下の出血が認められた。しかし、これらの変化は生理食塩液を投与した対照群を含むすべての群に発現し、その発現頻度及び分布がすべての群で類似していたことから、CSL627 投与との関連はないと考えられた。

以上より、カニクイザルに CSL627 を最高用量 500 IU/kg/日で静脈内（ボーラス）投与すると、忍容性が良好であった。13 及び 28 日間投与後には、CSL627 投与群で CSL627 に対する抗体産生を示す免疫応答が認められた。本試験条件下で、NOAEL は試験に用いた最高投与量 500 IU/kg/日と考えられた。

表 2.6.6-9 :　CSL627 をカニクイザルに反復静脈内投与した場合の TK パラメーター、ADA 及び aPTT

群/投与量	性別	28/29 日目					
		動物番号	抗薬物抗体[2]（nL dAS/サンプル）	C_{max}[1]（IU/mL）	0.25 時間後の観察濃度[3]（IU/mL）	$AUC_{0\text{-}tlast}$[1]（IU•h/mL）	aPTT[2]（秒）
第 1 群/対照	雄	553	blq	nc	1.65	nc	27.5
		555	blq	nc	1.15	nc	45.8
		557	blq	nc	1.87	nc	33.9
	雌	554	blq	nc	1.52	nc	37.3
		556	blq	nc	1.55	nc	33.2
		558	blq	nc	1.87	nc	38.5
		平均値	**nc**	**nc**	**1.60**	**nc**	**36.0**
		S.D.	**nc**	**nc**	**0.27**	**nc**	**6.1**
第 2 群/50 IU/kg	雄	559	blq*	0.53	1.77	0.86	44.3
		561	blq*	nc	0.68	0.00	52.7
		565	blq*	2.80	4.23	27.30	36.6
	雌	562	blq*	nc	1.18	0.00	57.8
		564	blq*	2.45	3.54	23.55	41.3
		566	blq*	2.51	3.89	25.91	30.8
		平均値	**nc**	**2.07**	**2.55**	**12.94**	**43.9**
		S.D.	**nc**	**1.04**	**1.52**	**13.91**	**10.0**
第 3 群/150 IU/kg	雄	569	32.05	nc	1.69	0.00	46.4
		571	42.00	nc	0.24	0.00	61.0
		573	96.37	nc	0.25	0.00	93.5
	雌	570	133.98	nc	0.18	0.00	81.3
		572	blq*	1.97	3.72	4.75	43.8
		574	49.93	nc	0.38	0.00	58.7
		平均値	**nc**	**1.97**	**1.08**	**0.79**	**64.1**
		S.D.	**nc**	**n.a.**	**1.42**	**1.94**	**19.6**
第 4 群/500 IU/kg	雄	577	46.21	nc	1.33	0.00	87.3
		579	105.81	0.13	1.43	0.02	69.3
		581	blq*	13.05	14.19	56.97	39.3
	雌	578	blq*	nc	1.46	0.00	94.2
		580	49.74	nc	0.48	0.00	91.0
		582	blq*	3.46	5.04	4.78	65.5
		平均値	**nc**	**5.55**	**3.99**	**10.30**	**74.4**
		S.D.	**nc**	**6.71**	**5.24**	**22.95**	**20.8**

抗体確認の閾値：31.25 nL dAS/サンプル
blq：定量下限未満（< 31.25 nL dAS/サンプル）
blq*：測定可能な抗体濃度を超えるが、定量下限未満
[1] 28 日目の標準化した血漿中濃度から算出した TK パラメーター
[2] 29 日目に測定した aPTT 及び ADA
[3] 28 日目投与後 0.25 時間の血漿中 FVIII 濃度（トキシコキネティクス）

2.6.6.4.　遺伝毒性及びがん原性試験

CSL627 の有効成分は、天然のヒト血漿蛋白質の遺伝子組換え蛋白質である。CSL627 は DNA との直接的な相互作用がないことから DNA 損傷は予側されず､DNA 結合蛋白質との相互作用もないことから、FVIII は変異原性を有さないと考えられる。ICH S6(R1)ガイドラインは、大量の蛋白質を投与した場合、解釈不可能な結果が起こる可能性もあると述べており、CSL627 の遺伝毒性試験を実施しなかったことは妥当と考えられる。

以下の理由により、がん原性試験の実施は不要と判断した。a) ICH S6(R1)ガイドラインでは、バイオ医薬品において標準的ながん原性試験は一般的に不適当であるとされている、b) CSL627 の有効成分は、天然に存在するヒトの血漿蛋白質と同等の遺伝子組換え蛋白質である。したがって、CSL627 のような動物にとって異種のヒト蛋白質は免疫原性を示し、反復投与すると中和活性のある抗薬物抗体が産生される。次いで、免疫複合体が形成され、薬物曝露量が低下する。そのため、長期のがん原性試験を実施しても、リスク評価に有益な情報は得られないと考えられる。このような理由から、がん原性試験は実施しなかった。

2.6.6.5.　生殖発生毒性試験

CSL627 の蛋白質（ヒト FVIII）は、体内に本来存在する構造及び機能がよく知られた蛋白質であることから、生殖発生毒性試験の実施は不要とした。また、単回及び反復投与毒性試験において生殖機能への影響を示唆する変化はみられず、生殖毒性、発生毒性、胚・胎児毒性あるいは幼若動物に対する毒性を評価する、特殊毒性試験が必要となる所見も認められなかった。なお、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験において、雌雄生殖器の肉眼的及び病理組織学的検査を実施しており、これらの組織への影響を示唆する所見は認められなかった。本剤は生体内に存在する蛋白質の補充療法として使用されることから、患者の年齢にかかわらず全般的な安全性に関する懸念はないと考えられる。

さらに、血液凝固亢進状態は子宮胎盤循環における血栓形成の原因となり、反復流産のリスク要因となることが知られている。具体的には、抗リン脂質抗体症候群の死産・流産発症原因の一つとして、血栓形成が推定されており（Meroni et al., 2011）、また、血液凝固第 VII 因子等の低下による血栓形成が不育症のリスク要因の一つとして知られている（Sotiriadis et al., 2007）。したがって、正常動物で FVIII の過剰投与は生殖発生毒性の評価に影響する可能性があり、正常動物を用いた生殖発生毒性試験により、血友病の妊婦で血栓形成と関連した生殖発生毒性が発現するリスクを正確に予測することはできないと考える。

2.6.6.6.　局所刺激性試験

ウサギに CSL627 を静脈内、動脈内及び静脈周囲投与して、局所刺激性試験を実施した（表 2.6.6-10）。

さらに、ラット及びサルの単回及び反復投与毒性試験において、局所刺激性について評価した結果、CSL627 の静脈内投与では忍容性が良好であった。以下にウサギを用いた試験結果についてのみ詳細を示し、ラット及びサルの観察結果は詳述しないが、忍容性は概ね良好であった。

表 2.6.6-10：　局所刺激性試験

試験の種類	試験番号	バッチ No.	使用製剤	GLP 適合
局所刺激性試験、ウサギ	APQ0012	[redacted]	CSL627	適

2.6.6.6.1.　CSL627：ウサギの静脈内、動脈内又は静脈周囲投与による局所刺激性試験（試験番号 APQ0012）

本試験では、ウサギに注射用水で溶解した CSL627 を静脈内、動脈内及び静脈周囲投与し、局所刺激性について検討した。プラセボ対照として生理食塩液を使用した。ウサギは局所刺激性に対して感受性が高く、局所刺激性の評価に広く使用される試験系であることから、本試験では動物種としてウサギを選択した。CSL627 の臨床投与経路を想定して、静脈内投与を行った。また、動脈内又は静脈周囲に誤投与した場合を想定して、動脈内及び静脈周囲投与も実施した。静脈内及び動脈内投与では、CLS627 の臨床用量 50 IU/kg を超える用量で投与し、静脈周囲投与では予定臨床用量の約 40%を投与した。1 群当たり雄 3 例の NZW ウサギ 3 群に、3 経路で CSL627 を投与した。

第 1 群のウサギは、右外耳静脈に CSL627 を 1 mL の液量で単回静脈内投与した（1 日目）。同一動物の左外耳静脈に生理食塩液（0.9%）1 mL を投与し、対照とした。CSL627 投与群及びプラセボ対照群で、投与局所の所見（紅斑及び紫斑）がみられ、投与手技に起因する変化と考えられた。CSL627 投与に関連した肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

第 2 群のウサギは、右耳介中央動脈に CSL627 を 1 mL の液量で、血流と反対方向に単回動脈内投与した（1 日目）。同一動物の左耳介中央動脈に生理食塩液（0.9%）1 mL を投与し、対照とした。CSL627 投与群及びプラセボ対照群で、投与局所の所見（紅斑、紫斑及び痂皮形成[1 例]）がみられ、投与手技に起因する変化と考えられた。動脈内投与においても、CSL627 投与に関連した肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

第 3 群のウサギは、右外耳静脈と並行して CSL627 を 0.2 mL の液量で、単回静脈周囲投与した（1 日目）。同一動物の左外耳静脈周囲に生理食塩液（0.9%）0.2 mL を投与し、対照とした。CSL627 投与群及びプラセボ対照群で、投与局所の所見（紅斑及び紫斑）がみられ、投与手技に起因する変化と考えられた。CSL627 投与に関連した肉眼的及び病理組織学的所見は認められなかった。

観察期間中、いずれの動物においても毒性徴候や一般状態の不良はみられず、体重増加に CSL627 投与の影響はないと考えられた。

総合的に判断して、CSL627 を静脈内、動脈内及び静脈周囲に投与すると、投薬に起因する局所的又は全身的な所見は認められず、忍容性が良好であった。生存中に観察された肉眼的及び病理組織学的所見は、投与手技に起因する変化と考えられた。

2.6.6.7.　その他の毒性試験

CSL627 の血栓形成作用について検討するため、血栓形成性試験を実施した。血栓形成作用の評価は、Wessler の方法（Wessler et al., 1955）を基に Giles が改変した方法（Giles et al., 1980）

に準じて、ウサギの *in vivo* 血栓形成性試験により行った。表 2.6.6-11 に、その他の毒性試験を示す。

表 2.6.6-11：　その他の毒性試験

試験の種類	試験番号	バッチ No.	使用製剤	GLP 適合
血栓形成性試験、ウサギ	S30668	[redacted]	CSL627	適

2.6.6.7.1.　CSL627（rFVIII）：ウサギの In Vivo 血栓形成性試験（Giles, A.R. 1980 が報告した Wessler 変法）（試験番号 S30668）

静脈血栓について研究するために、多くの動物種が使用されてきた。血栓形成の方法も多様で、血管壁損傷、血液うっ滞及び凝血の局所的活性化など様々な誘発方法がある。これらの方法は多様ではあるものの、大部分は Wessler モデル（Wessler et al., 1955）の変法と考えられる。Wessler は主として、血栓の発生機序及び凝固促進物質が血栓の成長に及ぼす影響について検討するために本モデルを開発したが、それ以降の多くの研究者は抗血栓処置の効果について調べるために本モデルを用いてきた。

CSL627 の血栓形成リスクを検討するため、適切な静脈を結紮することにより一過性の静脈うっ血を誘発した血栓モデルを使用した。血栓形成リスクを評価し比較するためのパラメーターとして、血栓の発現頻度及び乾燥重量を用いた。今回の血栓形成性試験では、1 群当たり 6 例（雌雄各 3 例）のウサギに、CSL627 を投与量 150、300、500 及び 1000 IU/kg で静脈内投与し、CSL627 の血栓形成作用を評価した。12 例（雌雄各 6 例）のウサギには、生理食塩液を投与してプラセボ群（陰性対照）とした。FEIBA NF 500E はプロトロンビン複合体の活性化因子及び非活性化因子を含有しており、複数の部位で血液凝固カスケードを活性化する（FVIII をバイパスする活性）ことから、FEIBA NF 500E を陽性対照として用いた。FEIBA NF 500E は FVIII を含有しないので、非活性化 rFVIII 分子からなる別の対照薬として ReFacto AF®を用いた。

静脈うっ血による、左右頸静脈での血栓の発現頻度を主要評価項目とした。

今回の試験では、左頸静脈の血栓形成リスクは右頸静脈より高く、雌の血栓形成リスクは雄より低かった。左頸静脈と右頸静脈の血栓形成リスクの差は処置とは無関係であり、左頸静脈ではうっ血時間が右頸静脈より長く、より厳しい条件であったことに起因する差と考えられた。

血栓の発現頻度を評価した結果、試験に用いた CSL627 の 4 投与量で用量依存的な影響がみられた。CSL627 の投与量に応じて平均の血栓発現頻度が上昇したが、陰性対照群との間で統計学的有意差が認められたのは 1000 IU/kg 群のみであった。1000 IU/kg 群の有意差はうっ血時間が長かった左頸静脈でのみ認められ、右頸静脈では認められなかったことから、より厳しい条件でのみ有意差がみられたと考えられる。CSL627 の比較的低用量（150、300 及び 500 IU/kg）では、血栓形成の発現頻度には左右いずれの頸静脈でも、陰性対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

陽性対照として使用した FEIBA NF 500 E は血栓形成作用が最も強く、投与量 200 IU/kg では左右頸静脈の血栓スコアが有意であった。

ReFacto AF®を 500 IU/kg で投与すると、CSL627 を 500～1000 IU/kg で投与した場合の中間的な作用が認められた。しかし、CSL627 を 300 及び 500 IU/kg 投与した場合と同様に、この作用には陰性対照との間で統計学的有意差は認められなかった。

血栓の重量測定でも、ほぼ同様の結論が得られた。FEIBA NF 500E は、試験に用いた投与量 200 IU/kg で最大に近い作用を示したのに対し、CSL627 は投与量 150、300 及び 500 IU/kg では血栓形成作用の増強（PTF）はみられず、1000 IU/kg で軽度の PTF（右及び左頸静脈で、それぞれ 1 及び 6%）が認められた。ReFacto AF®投与群では、左頸静脈で 1%の PTF がみられたが、陰性対照群との間で有意差は認められなかった。

以上より、CSL627 は最高投与量 1000 IU/kg で軽微な血栓形成性を示したが、比較的低用量の 150、300 及び 500 IU/kg では、統計学的に有意な影響が認められなかったことから、NOAEL は 500 IU/kg と考えられた。

2.6.6.7.2. 免疫毒性

ラット及びサルの反復投与毒性試験において、CSL627 の免疫毒性について検討した結果、これらの試験でリンパ系器官に肉眼的及び病理組織学的所見は認められず、CSL627 は免疫系器官に影響を及ぼさないと考えられた。そのため、独立した免疫毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.7.3. 不純物

CSL627 の原薬及び製剤の特性は明らかになっている（モジュール 3：3.2.S.3.2 項及び 3.2.P.5.5 項）。リスク・アセスメントにおいて、特定された不純物のリスクを評価した。

毒性試験に使用した製剤は臨床で使用予定の製剤と同等であり、開発過程で使用した被験物質の同等性が明らかとなっている（3.2.P.2.3 項）。したがって、不純物のリスクはこれまでに実施した反復投与毒性試験で評価されており、不純物に特化した毒性試験は実施しなかった。特に宿主細胞の蛋白質に起因するリスクについて、ICH S6(R1)ガイドラインでは、宿主細胞成分の混入によりアレルギー反応やその他の免疫病理学的反応が惹起される可能性があるとされている。CSL627 の反復投与毒性試験では、抗薬物抗体の産生以外には、アレルギー反応やその他の免疫病理学的反応を示唆する所見は認められなかった。

2.6.6.8. 考察及び結論

単回投与毒性試験の一環として実施した TK 試験の結果、線形性が認められ、$t_{1/2\beta}$ はラット及びカニクイザルで、それぞれ 2.33～5.11 時間及び 7.00～21.5 時間の範囲であった。サルに CSL627 を 50～1500 IU/kg の広い用量範囲で投与すると、用量に比例した曝露量の増加が観察された。ラット及びサルのいずれも、試験に用いたすべての投与量（50～1500 IU/kg）で AUC 値は雌より雄が高値であったが、C_{max} は雌雄とも同程度であった。反復投与毒性試験では、ラット及びサルでそれぞれ 16 日目及び 14 日目に、ヒト蛋白質の投与で予測された抗 FVIII

抗体の産生がみられた。抗 FVIII 抗体は内因性 FVIII と交差活性を示すことから、動物福祉の観点からも、4 週間を超える長期投与試験は実施しなかった。

ラット及びカニクイザルに CSL627 を最高用量 1500 IU/kg まで単回静脈内投与すると、毒性学的意義のある変化は認められず、忍容性が良好であった。NOAEL は両動物種とも 1500 IU/kg と考えられ、生命に危険がある場合の臨床最高用量 200 IU/kg/日の 7.5 倍、出血傾向の抑制に適用する場合の臨床用量 50 IU/kg/日の 30 倍に相当する。

ラットに CSL627 を最高用量 1250 IU/kg/日で 28 日間連日反復投与した場合にも、有害作用を示唆する所見は認められず、忍容性が良好であった。CSL627 投与群で、28 日間投与後に抗 CSL627 抗体の産生を示す免疫応答がみられ、60 例中 51 例では 16 日目に最初の免疫応答が認められた。

カニクイザルに CSL627 を最高用量 500 IU/kg/日で 28 日間連日投与すると、有害所見はみられず、忍容性が良好であった。ラットと同様、多くの動物で抗 CSL627 抗体が産生し、血漿中 FVIII 濃度の低下と関連が認められた。広範かつ急性の ADA 反応下で CSL627 の曝露量が減少し、血漿中 FVIII 濃度が低下したと考えられた。また、ADA 反応は凝固因子活性として測定した凝固時間（aPTT）の延長とも相関し、ADA が（サルの）内因性 FVIII と交差反応することが示された。

これらの試験条件下での NOAEL は、ラット及びカニクイザルで試験に用いたそれぞれの最高投与量 1250 及び 500 IU/kg/日と考えられ、生命に危険がある場合の臨床最高用量 200 IU/kg/日の少なくとも 6.3 倍及び 2.5 倍、出血傾向の抑制に適用する場合の臨床用量 50 IU/kg の 25 倍及び 10 倍に相当する。

CSL627 の局所刺激性について検討した結果、ウサギの静脈内、動脈内及び静脈周囲投与、並びにラット及びサルの静脈内投与での忍容性は良好であった。

ウサギの Wessler うっ血モデル変法を用い、CSL627 の血栓形成性について検討した。その結果、CSL627 は投与量 1000 IU/kg で軽微な血栓形成性を示し、NOAEL は 500 IU/kg と考えられた。げっ歯類における高濃度の血漿中 FVIII に伴う血栓形成リスクは、すでに報告されており（Kawasaki et al., 1999）、予測された所見である。血漿中 FVIII 濃度の長期にわたる上昇（ヒトでもリスク因子として認識される）は、vWF 上で FVIII 結合サイトを増加させると考えられ、最終的には、凝固カスケードの関与した成長中の血栓に送達される FVIII が増加すると考えられている（Kamphuisen et al., 2001）。

CSL627 の毒性試験プログラムでは、単回及び反復投与試験で全身毒性を示す有害所見はみられず、安全性薬理に関する懸念や血栓形成性及び局所不耐容も認められなかった。総合的に判断して、CSL627 は良好な忍容性を示した。

以上のように、CSL627 で実施した非臨床安全性試験により、CSL627 の優れた忍容性及び高い安全性プロファイルが示され、安全性に関する懸念は認められなかった。したがって、CSL627 は血友病 A 患者の治療に有効かつ安全な薬剤であることが示唆された。

2.6.6.9.　参考文献

Giles AR, Johnston M, Hoogendoorn H, Blajchman M and Hirsh J: The thrombogenicity of prothrombin complex concentrates: I. The relationship between in vitro characteristics and in vivo thrombogenicity in rabbits. Thromb. Res., 17(3-4), 353-366, 1980.

Huntingdon Life Sciences. CSL627: PK Study and Tool Antibody Production in Cynomolgus Monkeys, Study APQ0015, 2011.

ICH harmonised tripartite guideline: Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals, S6(R1), Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011.

Kamphuisen PW, Eikenboom JCJ and Bertina RM: Elevated Factor VIII Levels and the Risk of Thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 21, 731-738, 2001.

Kawasaki T, Kaida T, Arnout J, Vermylen J and Hoylaerts MF: A new animal model of thrombophilia confirms that high plasma Factor VIII levels are thrombogenic. Thromb. Haemost., 81, 306-311, 1999.

Meroni PL, Borghi MO, Raschi E and Tedesco F: Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. Nat. Rev. Rheumatol., 7, 330-339, 2011.

Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E and Kalantaridou SN: Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet. Gynecol., 109(5), 1146-1155, May 2007.

Wessler S, Ward K and Ho C: Studies in intravascular coagulation. III. The pathogenesis of serum-induced venous thrombosis. J. Clin. Invest., 34, 647-651, 1955.

エイフスチラ静注用

2.6　非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.7　毒性試験概要表

CSL ベーリング株式会社

目　次

略語・略号一覧 4
2.6.7.　毒性試験概要表 5
2.6.7.1.　毒性試験：一覧表 5
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 6
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 7
2.6.7.4.　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧 9
2.6.7.5.　単回投与毒性試験 11
2.6.7.6.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7.　反復投与毒性試験：重要な試験 13
2.6.7.8.　In Vitro 遺伝毒性試験 19
2.6.7.9.　In Vivo 遺伝毒性試験 19
2.6.7.10.　がん原性試験 19
2.6.7.11.　生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 19
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 19
2.6.7.13.　生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 19
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 19
2.6.7.15.　新生児を用いた試験 20
2.6.7.16.　局所刺激性試験 21
2.6.7.17.　その他の毒性試験 22

表の目次

表 2.6.7-1：　毒性試験一覧表 5
表 2.6.7-2：　トキシコキネティクス試験の一覧表 6
表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
表 2.6.7-4：　毒性試験に使用した CSL627 製剤一覧 9
表 2.6.7-5：　毒性試験に使用した CSL627 の製剤規格 10
表 2.6.7-6：　単回投与毒性試験 11
表 2.6.7-7：　CD ラットの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験 13
表 2.6.7-8：　カニクイザルの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験 16
表 2.6.7-9：　局所刺激性試験 21
表 2.6.7-10：　血栓形成性試験 22

略語・略号一覧

略語・略号	定義（英語）	定義（日本語）
aPTT	Activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC_{24h}	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to 24 h	0 時間から 24 時間までの血漿中濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}tlast}$	Area under the plasma concentration-time curve from zero up to the last concentration	0 時間から最終濃度までの血漿中濃度–時間曲線下面積
C_{max}	Maximum concentration	最高血漿中濃度
F	Female	雌
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
i.a.	Intraarterial	動脈内
IU	International units	国際単位
i.v.	Intravenous	静脈内
kg	Kilogram	キログラム
M	Male	雄
mg	Milligram	ミリグラム
mL	Milliliter	ミリリットル
NA	Not applicable	該当せず
NC	Not calculated	算出せず
No.	Number	番号
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
NZW	New Zealand White	ニュージーランド白色種
p.v.	Perivenous	静脈周囲
S.D.	Standard Deviation	標準偏差
$t_{1/2\beta}$	Terminal half-life	終末相半減期
t_{max}	Time of maximum plasma level	最大濃度までの時間

2.6.7. 毒性試験概要表

2.6.7.1.　毒性試験：一覧表

表 2.6.7-1：　毒性試験一覧表

被験物質：CSL627

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	GLP Compliance	Testing Facility	Study Number	Location
Single-dose toxicity	Rat/[redacted](SD)	Bolus i.v.	Single dose	0, 50, 250 and 1500	Yes	[redacted]	APQ0010	4.2.3.1.1
	Monkey/*Macaca fascicularis*	Bolus i.v.	Single dose	0, 50, 250 and 1500	Yes	[redacted]	APQ0011	4.2.3.1.2
Repeat-dose toxicity	Rat/[redacted](SD)	Bolus i.v.	4 weeks	0, 50, 250 and 1250	Yes	[redacted]	APQ0013	4.2.1.3.1
	Monkey/*Macaca fascicularis*	Bolus i.v.	4 weeks	0, 50, 150 and 500	Yes	[redacted]	APQ0014	4.2.1.3.2
Genotoxicity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Carcinogenicity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Reproductive and developmental toxicity	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Local Tolerance	Rabbit/NZW	i.v. i.a. p.v.	Single dose	359 IU/mL i.v. and i.a.: 1 mL/animal p.v.: 0.2 mL/animal	Yes	[redacted]	APQ0012	4.2.3.6.1
Other toxicity: Thrombogenicity	Rabbit/NZW	i.v.	Single dose	0, 150, 300, 500 and 1000	Yes	[redacted] Spain	S30668	4.2.3.7.3.1

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

表 2.6.7-2：　トキシコキネティクス試験の一覧表

被験物質：CSL627

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Doses (IU/kg)	GLP Compliance	Study Number	Location
Single-dose toxicity	Rat/[redacted](SD)	Bolus i.v.	0, 50, 250 and 1500	Yes	APQ0010	4.2.3.1.1
Single-dose toxicity	Monkey/*Macaca fascicularis*	Bolus i.v.	0, 50, 250 and 1500	Yes	APQ0011	4.2.3.1.2
4 weeks repeat-dose toxicity[a]	Rat/[redacted](SD)	Bolus i.v.	0, 50, 250 and 1250/day	Yes	APQ0013	4.2.1.3.1
4 weeks repeat-dose toxicity	Monkey/*Macaca fascicularis*	Bolus i.v.	0, 50, 150 and 500/day	Yes	APQ0014	4.2.1.3.2

a) Toxicokinetic assessment could not be performed due to the formation of anti-product antibodies against CSL627.

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

表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧

C_{max} (IU/mL)　　被験物質：CSL627

Daily dose (IU/kg)	Type of Study	Analyzed day	Study No.	Batch No.	Rat		Monkey		Human
					Male	Female	Male	Female	
50	Phase I/III Open-label study	Day 1	CSL627_1001		NA	NA	NA	NA	1.13
50	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0010	[redacted]	0.88	0.89	NA	NA	NA
50	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0011	[redacted]	NA	NA	2.04	1.51	NA
50	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 28	APQ0013	[redacted],	a)	a)	NA	NA	NA
50	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 1	APQ0014	[redacted]	NA	NA	1.72	1.58	NA
		Day 28			NA	NA	1.67	2.48	NA
150	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 1	APQ0014	[redacted]	NA	NA	3.66	4.05	NA
		Day 28			NA	NA	NC	1.97	NA
250	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0010	[redacted]	2.05	2.98	NA	NA	NA
250	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0011	[redacted]	NA	NA	7.38	6.19	NA
250	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 28	APQ0013	[redacted],	a)	a)	NA	NA	NA
500	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 1	APQ0014	[redacted]	NA	NA	15.3	13.9	NA
		Day 28			NA	NA	6.59	3.46	NA
1250	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 28	APQ0013	[redacted],	a)	a)	NA	NA	NA
1500	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0010	[redacted]	8.04	8.26	NA	NA	NA
1500	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0011	[redacted]	NA	NA	35.4	38.8	NA

a) Toxicokinetic assessment could not be performed due to the formation of anti-product antibodies against CSL627.

表 2.6.7-3：　トキシコキネティクス試験成績の一覧（続き）

AUC (IU•h/mL)　　被験物質：CSL627

Daily dose (IU/kg)	Type of Study	Analyzed day	Study No.	Batch No.	Rat		Monkey		Human
					Male	Female	Male	Female	
50	Phase I/III Open-label study	Day 1	CSL627_1001		NA	NA	NA	NA	20.00
50	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0010	[redacted]	3.05	0.91	NA	NA	NA
50	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0011	[redacted]	NA	NA	18.8	13.1	NA
50	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 28	APQ0013	[redacted],	a)	a)	NA	NA	NA
50	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 1	APQ0014	[redacted]	NA	NA	13.9	15.0	NA
		Day 28			NA	NA	9.38	16.5	NA
150	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 1	APQ0014	[redacted]	NA	NA	40.4	45.6	NA
		Day 28			NA	NA	0	1.58	NA
250	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0010	[redacted]	13.62	8.90	NA	NA	NA
250	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0011	[redacted]	NA	NA	81.4	57.6	NA
250	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 28	APQ0013	[redacted],	a)	a)	NA	NA	NA
500	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 1	APQ0014	[redacted]	NA	NA	144	155	NA
		Day 28			NA	NA	19.0	1.59	NA
1250	4 weeks repeat-dose toxicity	Day 28	APQ0013	[redacted],	a)	a)	NA	NA	NA
1500	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0010	[redacted]	26.74	21.56	NA	NA	NA
1500	Single-dose toxicity	Day 1	APQ0011	[redacted]	NA	NA	410	293	NA

a) Toxicokinetic assessment could not be performed due to the formation of anti-product antibodies against CSL627.

2.6.7.4.　毒性試験：被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7-4：　毒性試験に使用した CSL627 製剤一覧

被験物質：CSL627

Products	Batch No.	Study Number	Type of Study
CSL627	[redacted]	APQ0010	Single-dose toxicity, rat
		APQ0013	4 weeks repeat-dose toxicity, rat
CSL627	[redacted]	APQ0011	Single-dose toxicity, cynomolgus monkey
		APQ0014	4 weeks repeat-dose toxicity, cynomolgus monkey
		S30668	Thrombogenicity, rabbit
CSL627	[redacted]	APQ0013	4 weeks repeat-dose toxicity, rat
		APQ0012	Local tolerance, rabbit

表 2.6.7-5：　毒性試験に使用した CSL627 の製剤規格

被験物質：CSL627

Products	Batch No.	CSL627 (IU/mL after reconstitution)	Additives / Impurities [a]				
			Polysorbate 80 (mg/mL)	L-Histidine (mg/mL)	Calcium di-chloride (mg/mL)	Sodium chloride (mg/mL)	Sucrose (mg/mL)
CSL627	[redacted]	415	NA	3.1 [b]	0.14 [c]	6.6 [d]	6.02
CSL627	[redacted]	400	0.2	20 mmol/L	3.4 mmol/L	280 mmol/L	6
CSL627	[redacted]	359	NA	3.4 [b]	0.14 [c]	6.4 [d]	6.7
Nominal composition for submission products		250 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		375 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		500 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		1000 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		1500 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		2000 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		2500 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6
		3000 IU	0.2	3.1	0.4	16.4	6

a) Impurities are presented in the quality section (CTD Module 3.2.P.5.5).　b) Measure quantified as Histidine
c) Measure quantified as Calcium　d) Measure quantified as Sodium

2.6.7.5.　単回投与毒性試験

表 2.6.7-6：　単回投与毒性試験

被験物質：CSL627

Species and Strain	Method of Administration	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL Dose (IU/kg)	Approximate Lethal Dose (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Rat[redacted](SD)	Bolus i.v.	0, 50, 250 and 1500	5 F + 5 M	1500	> 1500	Doses up to 1500 IU/kg were well tolerated, no findings indicative of adverse toxicity and no irritation at the site of injection.	APQ0010
Monkey/ *Macaca fascicularis*	Bolus i.v.	0, 50, 250 and 1500	3 F + 3 M	1500	> 1500	Doses up to 1500 IU/kg were well tolerated, no effects observed.	APQ0011

2.6.7.6.　反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施していない。

2.6.7.7.　反復投与毒性試験：重要な試験

表 2.6.7-7：　CD ラットの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験

Report Title: CSL627: Toxicity Study by Intravenous Bolus Administration to CD Rats for 4 Weeks Followed by a 14 Day Recovery Period					Test Article: CSL627			
Species/Strain: [redacted](SD) Rat		Duration of Dosing: 4 weeks			Study No. APQ0013			
Initial Age: 43-49 days (main study and recovery animals) and 46-52 days (interim kill)		Duration of Postdose: 2 weeks			Location in CTD: 4.2.1.3.1			
Date of First Dose: [redacted]		Method of Administration: Intravenous bolus administration			GLP Compliance: Yes			
		Vehicle/Formulation: Water for injection / Solution						
Special Features: Examinations of anti-product antibodies were performed.								
No Observed Adverse Effect Level: 1250 IU/kg/day.								
Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		50 (30) [b]		250		1250	
Number of Animals [a]	M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20
Toxicokinetics: The toxicokinetic assessment could not be performed due to the formation of anti-product antibodies against CSL627, resulting in no/negligible amounts of CSL627 being detected in the plasma samples taken on Day 28.								
Examinations of anti-product antibodies (Number of antibody positive animals / Number of examined animals)								
Anti-human FVIII Day -2	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15	0 / 15
Day 6	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
Day 16	0 / 10	0 / 10	3 / 10	8 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10
Day 29	0 / 10	0 / 10	9 / 10	9 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10

a) Including five animals for interim sacrifice (Day 6) in each group and five animals for recovery in control and 1250 IU/kg/day group.

b) The formulation analysis revealed low results for the preparations given to Group 2 on Days 9, 14 and 28. The results suggest a dose of approximately 30 IU/kg/day was achieved.

表 2.6.7-7：　CD ラットの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（続き）

被験物質：CSL627

Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		50 (30) [b]		250		1250	
Number of Animals [a]		M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (% [c])	W0 (n=20 or 15)	264 g	199 g	+1.1	+0.5	−1.1	−4.0	+1.1	+0.5
	D8 (n=15 or 10)	291 g	214 g	+5.5	−2.3	+2.1	−5.1	+5.2	+0.9
	W2 (n=15 or 10)	328 g	227 g	+3.7	−2.2	+2.7	−5.3	+5.2	+2.6
	W3 (n=15 or 10)	349 g	241 g	+4.3	−2.1	+4.3	−5.8	+6.3	+1.7
	W4 (n=15 or 10)	352 g	250 g	+2.3	−2.8	+2.0	−6.4	+5.1	+1.6
	RW1 (n=5)	393 g	270 g	NA	NA	NA	NA	+2.3	+2.2
	RW2 (n=5)	417 g	286 g	NA	NA	NA	NA	+1.0	−1.0
Food Consumption (% [c])	W1 (n=2 or 3)	187 g/animal	133 g/animal	+5.9	−2.3	+3.2	−6.0	+6.4	+1.5
	W2 (n=2 or 3)	184 g/animal	139 g/animal	+6.0	+0.7	+5.4	−3.6	+9.8	+3.6
	W3 (n=2 or 3)	170 g/animal	136 g/animal	+4.7	−0.7	+7.6	−2.9	+9.4	+1.5
	W4 (n=2 or 3)	152 g/animal	135 g/animal	−2.0	−0.7	−1.3	−3.0	+5.3	+4.4
	RW1 (n=1)	186 g/animal	122 g/animal	NA	NA	NA	NA	−1.1	+24.6
	RW2 (n=1)	178 g/animal	113 g/animal	NA	NA	NA	NA	−1.7	+27.4
Irwin Assessment [d]		–	–	–	–	–	–	–	–
Ophthalmic Examination		–	–	–	–	–	–	–	–

−: No noteworthy findings.　D: Day,　W: Week,　RW: Recovery Week

a) Including five animals for interim sacrifice (Day 6) in each group and five animals for recovery in control and 1250 IU/kg/day group.

b) The formulation analysis revealed low results for the preparations given to Group 2 on Days 9, 14 and 28. The results suggest a dose of approximately 30 IU/kg/day was achieved.

c) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

d) Some minor changes were observed on body temperature, but due to their nature not regarded to be treatment-related, and thus not listed in this table.

表 2.6.7-7：　CD ラットの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験及び 2 週間回復性試験（続き）

被験物質：CSL627

Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		50 (30) [b]		250		1250	
Number of Animals [a]		M: 20	F: 20	M: 15	F: 15	M: 15	F: 15	M: 20	F: 20
Haematology									
aPTT (Mean±S.D., sec)	D6 (n=4-5)	18.4±2.68	14.2±1.82	13.4±2.89	13.3±2.57	12.0±2.64	14.3±3.37	16.2±4.09	12.5±4.72
	W5 (n=9-10)	22.3±1.23	17.6±2.59	22.2±2.76	18.3±3.03	24.2±3.76	19.3±2.66	25.2±2.31*	23.8±7.36**
	RD14 (n=4-5)	20.6±1.90	18.1±1.71	NA	NA	NA	NA	22.5±1.92	18.6±1.24
Blood Chemistry [c]		–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis [c]		–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights [c]		–	–	–	–	–	–	–	–
Macropathology		–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology		–	–	–	–	–	–	–	–
Recovery Study									
Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		50		250		1250	
Number of Animals		M: 5	F: 5	NA	NA	NA	NA	M: 5	F: 5
Died or Sacrificed Moribund		0	1 [d]	NA	NA	NA	NA	0	0
Post-dose Evaluation		–	–	NA	NA	NA	NA	–	–

Conclusion:

- Doses up to 1250 IU/kg/day for 6 or 28 days were well tolerated with no findings indicative of adverse toxicity.
- An immune response resulting in the formation of antibodies against CSL627 was observed after 16 and 28 days of treatment.

–: No noteworthy findings.　D: Day,　W: Week,　RD: Recovery Day,　*: $p < 0.05$,　**: $p < 0.01$ (Williams' test)

a) Including five animals for interim sacrifice (Day 6) in each group and five animals for recovery in control and 1250 IU/kg/day group.

b) The formulation analysis revealed low results for the preparations given to Group 2 on Days 9, 14 and 28. The results suggest a dose of approximately 30 IU/kg/day was achieved.

c) Some (significant) changes were observed, but due to their nature not regarded to be treatment-related, and thus not listed in this table.

d) Due to a dosing accident.

表 2.6.7-8：　カニクイザルの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験

Report Title: CSL627: Toxicity Study by Intravenous Bolus Administration to Cynomolgus Monkeys for 4 Weeks					Test Article: CSL627			
Species/Strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)		Duration of Dosing: 4 weeks			Study No. APQ0014			
Initial Age: 32 to 36 months		Duration of Postdose: None			Location in CTD: 4.2.1.3.2			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		Method of Administration: Intravenous bolus administration			GLP Compliance: Yes			
		Vehicle/Formulation: Water for injection / Solution						
Special Features: Examinations of anti-product antibodies were performed.								
No Observed Adverse Effect Level: 500 IU/kg								
Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		50		150		500	
Toxicokinetics								
Number of Animals [a]	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Day 1 (n = 4) C_{max} (IU/mL)	NC	NC	1.72	1.58	3.66	4.05	15.3	13.9
t_{max} (h)	NC	NC	0.81	0.25	0.81	0.31	0.25	0.25
$AUC_{0\text{-}tlast}$ (IU•h/mL)	NC	NC	13.9	15.0	40.4	45.6	144	155
AUC_{24h} (IU•h/mL)	NC	NC	14.6	15.2	41.1	42.6	156	155
$t_{1/2\beta}$ (h)	NC	NC	5.82	9.25	10.3	10.2	11.9	10.4
Day 28 (n = 3) C_{max} (IU/mL)	NC	NC	1.67 [b]	2.48 [b]	NC	1.97 [c]	6.59 [b]	3.46 [c]
t_{max} (h)	NC	NC	0.25 [b]	0.25 [b]	NC	0.50 [c]	0.25 [b]	0.25 [c]
$AUC_{0\text{-}tlast}$ (IU•h/mL)	NC	NC	9.38	16.5	0.00	1.58	19.0	1.59
AUC_{24h} (IU•h/mL)	NC	NC	9.43	16.5	0.00	1.58	22.3	1.96
$t_{1/2\beta}$ (h)	NC	NC	6.40 [c]	4.35 [c]	NC	NC	4.44 [c]	1.44 [c]

a) Including one animal for interim sacrifice (Day 6) in each group.
b) n = 2　c) n = 1

表 2.6.7-8：　カニクイザルの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験　（続き）

被験物質：CSL627

Daily Dose (IU/kg/day)		0 (Control)		50		150		500	
Number of Animals [a]		M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Examinations of anti-product antibodies (Number of antibody positive animals / Number of examined animals)									
Anti-human FVIII	Day 1	0 / 4	0 / 4	0 / 4	1 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
	Day 6	0 / 4	0 / 4	0 / 4	1 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
	Day 14	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	1 / 3	1 / 3	1 / 3	1 / 3
	Day 29	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	3 / 3	2 / 3	2 / 3	1 / 3
Noteworthy Findings									
Died or Sacrificed Moribund		0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (% [b])	Week 0	2.58 kg	2.43 kg	+5.8	+4.9	+3.5	−2.5	−1.9	+4.9
(n =3)	Week 4	2.73 kg	2.47 kg	+5.5	+4.0	0	0	−9.5	+7.3
Clinical Observations (Number of animals with clinical sign / Number of examined animals)									
Body tremors		0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4	4 / 4	4 / 4	3 / 4	4 / 4
Bruising at the injection site		4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4
Swelling at the injection site		3 / 4	3 / 4	2 / 4	2 / 4	4 / 4	3 / 4	4 / 4	3 / 4
Ophthalmoscopy		–	–	–	–	–	–	–	–
Electrocardiography [c]		–	–	–	–	–	–	–	–
Blood pressure and pulse rate [c]		–	–	–	–	–	–	–	–
Haematology (n = 3)									
aPTT (Mean±S.D., sec)	Week 1	36.1±7.65	36.0±3.59	38.6±2.81	36.3±4.71	29.0±6.17	32.6±6.36	29.1±1.32	33.1±2.75
	Week 2	33.9±10.12	33.7±2.15	33.0±0.15	31.6±4.81	34.8±16.43	59.4±28.14	38.9±18.12	61.1±16.05
	Week 3	35.7±9.51	38.5±2.03	40.6±1.07	38.5±6.84	48.3±14.32	71.6±12.02**	51.3±27.08	75.0±9.04**
	Day 29	35.7±9.29	36.3±2.78	44.5±8.05	43.3±13.61	67.0±24.11	61.3±18.88	65.3±24.25	83.6±15.73**

−: No noteworthy findings.　　**: $p < 0.01$ (Williams' test)

a) Including one animal for interim sacrifice (Day 6) in each group.

b) For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown.

c) Some (significant) changes were observed, but due to their nature not regarded to be treatment-related, and thus not listed in this table.

表 2.6.7-8：　カニクイザルの 4 週間静脈内（ボーラス）投与毒性試験（続き）

被験物質：CSL627

Daily Dose (IU/kg/day)	0 (Control)		50		150		500	
Number of Animals [a]	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4	M: 4	F: 4
Blood Chemistry [b]	–	–	–	–	–	–	–	–
Urinalysis [b]	–	–	–	–	–	–	–	–
Organ Weights	–	–	–	–	–	–	–	–
Macropathology	–	–	–	–	–	–	–	–
Histopathology (Number of animals with findings / Number of examined animals)								
Injection sites								
Lt. Saphenous, Perivascular Haemorrhage	0 / 3	1 / 3	1 / 3	1 / 3	1 / 3	1 / 3	1 / 3	2 / 3
Subcutaneous Haemorrhage	0 / 3	1 / 3	1 / 3	0 / 3	1 / 3	1 / 3	2 / 3	1 / 3
Rt. Saphenous, Perivascular Haemorrhage	0 / 3	1 / 3	2 / 3	1 / 3	2 / 3	0 / 3	1 / 3	1 / 3
Subcutaneous Haemorrhage	0 / 3	1 / 3	0 / 3	2 / 3	1 / 3	0 / 3	2 / 3	1 / 3
Conclusion: • Doses up to 500 IU/kg were well tolerated. • Immune response resulting in the formation of antibodies was observed after 13 and 28 days of treatment.								

−: No noteworthy findings.

a) Including one animal for interim sacrifice (Day 6) in each group.

b) Some (significant) changes were observed, but due to their nature not regarded to be treatment-related, and thus not listed in this table.

2.6.7.8.　In Vitro 遺伝毒性試験

試験は実施していない。

2.6.7.9.　In Vivo 遺伝毒性試験

試験は実施していない。

2.6.7.10. がん原性試験

試験は実施していない。

2.6.7.11. 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施していない。

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

試験は実施していない。

2.6.7.13. 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

試験は実施していない。

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

試験は実施していない。

2.6.7.15. 新生児を用いた試験

試験は実施していない。

2.6.7.16. 局所刺激性試験

表 2.6.7-9：　局所刺激性試験

被験物質：CSL627

Species/Strain	Method of Administration	Doses (IU/animal)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/NZW	i.v. i.a. p.v.	Concentration: 359 IU/mL i.v.: 1 mL/animal i.a.: 1 mL/animal p.v.: 0.2 mL/animal	3 M	i.v., i.a. and p.v. injection of CSL627 was well tolerated with no local or systemic sign of reaction to drug-treatment. Observed macropathological and histological findings were considered to be due to the administration procedure (comparable observations in the control group).	APQ0012

2.6.7.17. その他の毒性試験

表 2.6.7-10：　血栓形成性試験

被験物質：CSL627

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL Dose (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit/NZW	i.v.	Single dose	0, 150, 300, 500, 1000	3 F + 3 M	500	150 IU/kg, 300 IU/kg or 500 IU/kg: minimal effects, which were not statistically significant 1000 IU/kg: minimal prothrombotic potential	S30668