ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.4 薬物動態試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
表目次 6
略語一覧 8
2.6.4.1 まとめ 11
2.6.4.2 動物種の選択 14
2.6.4.3 分析方法 15
2.6.4.3.1 F9-KO マウス、血友病 B イヌ及びミニブタにおける非 GLP 薬効薬理試験で用いたノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の生体試料中薬物濃度分析法 16
2.6.4.3.1.1 生体試料中薬物濃度分析 - FIX 凝固一段法 （非 GLP）（Module 4.2.2.2、試験番号 LEEH080102 及び Module 4.2.1.1、試験番号 MIE080701） 16
2.6.4.3.1.2 生体試料中薬物濃度分析 - FIX ELISA（非 GLP）（Module 4.2.2.2、試験番号 LEEH080102 及び LEEH080502） 16
2.6.4.3.1.3 生体試料中薬物濃度分析 - FIX LOCI （非 GLP）（Module 4.2.2.7、試験番号 LEEH130101 及び Module 4.2.3.2、試験番号 212143） 16
2.6.4.3.1.4 生体試料中薬物濃度分析 - FIX 発色性合成基質法 （非 GLP）（Module 4.2.2.7、試験番号 LEEH130101） 17
2.6.4.3.2 重要な反復投与毒性試験（GLP）におけるラット及びカニクイザル血漿中ノナコグ ベータ ペゴルの生体試料中薬物濃度分析法（バリデートされた方法） 18
2.6.4.3.2.1 生体試料中薬物濃度分析 - 凝固一段法（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208446, 210069 及び 210068） 18
2.6.4.3.2.2 生体試料中薬物濃度分析 - ELISA（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208414） 18
2.6.4.3.2.3 生体試料中薬物濃度分析 - LOCI（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 213270） 19
2.6.4.3.3 放射能の定量（非 GLP） 19
2.6.4.3.4 非臨床試験における抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体の分析法 20
2.6.4.3.4.1 ラット血漿中抗ノナコグ ベータ ペゴル／rFIX 抗体のブリッジング ELISA（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 209368） 21
2.6.4.3.4.2 血友病 B イヌにおける FIX 中和抗体の測定 （非 GLP）（Module 4.2.1.1、試験番号 MIE080701） 23
2.6.4.3.4.3 カニクイザル血漿中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体のブリッジング ELISA（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208158） 23

2.6.4.3.4.4 カニクイザル血漿中のノナコグ ベータ ペゴル中和抗体測定用ベセスダ法（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208240） 25
2.6.4.4 吸収／PK 26
2.6.4.4.1 F9-KO マウス、イヌ及びミニブタにおける *in vivo* 薬効薬理試験を裏付ける単回投与 PK 試験 26
2.6.4.4.1.1 *In vivo* 薬効薬理試験を裏付ける単回投与 PK 試験（Module 2.6.5.3.A、試験番号 LEEH080102、Module 2.6.5.3.B、試験番号 MIE080701 及び Module 2.6.5.3.C、試験番号 LEEH080502） 26
2.6.4.4.2 Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける安全性試験を裏付けるノナコグ ベータ ペゴルの単回及び反復投与時の PK 28
2.6.4.4.2.1 Rowett ヌードラットにおける 6 週間投与 PK／免疫原性試験（Module 2.6.5.4.A、試験番号 212143） 28
2.6.4.4.2.2 Rowett ヌードラットにおける 26 週間投与時のノナコグ ベータ ペゴルの PK（Module 2.6.5.4.B、試験番号 212513） 29
2.6.4.4.2.3 カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験におけるノナコグ ベータ ペゴルの PK（Module 2.6.5.4.D、試験番号 208260） 32
2.6.4.4.2.4 カニクイザルにおける 13 週間 PK／免疫原性試験（Module 2.6.5.4.C、試験番号 208405） 34
2.6.4.4.3 PK の動物種間比較 35
2.6.4.4.4 分布、排泄及び代謝試験での放射能標識トレーサー 38
2.6.4.4.5 総放射能の結果に基づく推定 PK パラメータ 40
2.6.4.4.5.1 総放射能及び[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーの F9-KO マウスにおける PK パラメータ（Module 2.6.5.3.D、試験番号 213393） 40
2.6.4.4.5.2 [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーの総放射能に基づいたラットにおける PK パラメータ（Module 2.6.5.3.D、試験番号 213393） 42
2.6.4.4.5.3 ラットにおける [^{3}H-PEG]トレーサーの総放射能に基づく PK パラメータ（Module 2.6.5.3.E、試験番号 213395） 43
2.6.4.5 分布 44
2.6.4.5.1 マウスにおける[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルの組織分布（Module 2.6.5.5.A、試験番号 210169）及び選択した組織の免疫組織化学的分析（Module 2.6.5.8、試験番号 210167） 44
2.6.4.5.2 F9-KO マウスにおける PEG 部分を放射能標識した[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの組織分布（Module 2.6.5.5.B、試験番号 212166） 45

2.6.4.5.3 PEG を放射能標識した[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルのラットにおける組織分布（Module 2.6.5.5.C、試験番号 214076）.....46
2.6.4.5.4 ラットにおける 40 kDa [^{3}H-PEG]の組織分布（Module 2.6.5.5.D、試験番号 212213）.....47
2.6.4.6 代謝.....48
2.6.4.6.1 *In vivo* 代謝 - [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを投与した F9-KO マウスの血漿、尿及び糞中代謝物プロファイル（Module 2.6.5.9.A、試験番号 214438 及び Module 2.6.5.9.B、試験番号 214456）.....48
2.6.4.6.2 *In vivo* 代謝 - [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを投与したラットの尿及び糞中代謝物プロファイル（Module 2.6.5.9.C、試験番号 215080 及び Module 2.6.5.9.D、試験番号 215081）.....49
2.6.4.6.3 *In vivo* 代謝 - [^{3}H-PEG]投与ラットにおける尿及び糞中の代謝物プロファイル（Module 2.6.5.9.E、試験番号 215078）.....51
2.6.4.6.4 *In vitro* - [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルのラット血球分配（Module 2.6.5.10.A、試験番号 214152）.....51
2.6.4.7 排泄.....52
2.6.4.7.1 F9-KO マウスにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの排泄（Module 2.6.5.13.A、試験番号 212160）.....53
2.6.4.7.2 ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの排泄（Module 2.6.5.13.B、試験番号 214077）.....53
2.6.4.7.3 ラットにおける[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルの排泄（Module 2.6.5.13.C、試験番号 213466）.....53
2.6.4.7.4 ラットにおける 40 kDa [^{3}H-PEG]の排泄（Module 2.6.5.13.D、試験番号 212115）.....53
2.6.4.8 薬物動態学的相互作用.....55
2.6.4.9 その他の PK 試験.....56
2.6.4.9.1 第 3 相臨床試験用 3 ロットを比較するマウスにおける PK 試験（Module 2.6.5.16、試験番号 LEEH130101）.....56
2.6.4.10 考察及び結論.....59
2.6.4.10.1 PK.....59
2.6.4.10.2 分布、代謝及び排泄.....59
2.6.4.10.3 結論.....63
参考文献.....64

図目次

ページ

図 2.6.4-1　ノナコグ ベータ ペゴルの分布、排泄及び代謝試験に用いた放射能標識トレーサー 13
図 2.6.4-2　F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の PK 27
図 2.6.4-3　血友病 B イヌにおけるノナコグ ベータ ペゴル（40KPEG-rFIX、●）及び BeneFIX®（■）0.4 mg/kg 単回投与時の血漿中 FIX 濃度の経時推移.....28
図 2.6.4-4　Rowett ヌードラットにおけるノナコグ ベータ ペゴルの 5 日に 1 回静脈内投与時の第 26 週時のノナコグ ベータ ペゴル濃度 - 時間プロファイル（片対数） 30
図 2.6.4-5　ノナコグ ベータ ペゴルの静脈内投与後 4 時間の試料で測定した、第 1 週から 26 週までの Rowett ヌードラットにおける 4 週ごとの血漿中濃度（片対数） 31
図 2.6.4-6　ノナコグ ベータ ペゴルを 350（上）、1300（中央）及び 3750 IU/kg（下）で単回投与時（第 1 日、左図）及び週 1 回反復投与時（第 22 日、右図）の個体別血漿中活性プロファイル（n = 8） 33
図 2.6.4-7　ノナコグ ベータ ペゴル 200 IU/kg の単回投与時（第 1 日、左図）及び週 1 回反復投与時（第 92 日／13 週、右図）の個体別血漿中活性プロファイル（n = 8） 34
図 2.6.4-8　ノナコグ ベータ ペゴルの CL（単回投与時）／体重比の単純アロメトリックスケーリング.....36
図 2.6.4-9　ラット、サル及びヒト血友病 B 患者におけるノナコグ ベータ ペゴルの定常状態での静脈内投与用量と $AUC_{(0-t)}$の関係.....38
図 2.6.4-10　2 種のトレーサー及び検出法を用いた F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル濃度 - 時間プロファイル.....41
図 2.6.4-11　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴル静脈内投与時の濃度 - 時間プロファイル（片対数） 43
図 2.6.4-12　F9-KO マウスにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの経時的な *in vivo* 血漿中代謝物プロファイル.....49
図 2.6.4-13　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの経時的な *in vivo* 血漿中代謝物プロファイル.....50
図 2.6.4-14 ラットに投与した[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの経時的な *in vivo* での尿中（左）及び糞中（右）代謝物プロファイル.....51
図 2.6.4-15　F9-KO マウスにおける 3 ロットの第 3 相臨床試験用ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg 静脈内ボーラス投与時の PK（LOCI） 57
図 2.6.4-16　F9-KO マウスにおける 3 ロットの第 3 相臨床試験用ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg 静脈内ボーラス投与時の PK（発色性合成基質法） 58

図 2.6.4-17 ラットにおける [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg（PEG として約 0.6 mg/kg）の単回静脈内ボーラス投与時の選択した組織での濃度 - 時間プロファイル 60
図 2.6.4-18 ラットにおける[^{3}H-PEG]0.6 mg/kg の単回静脈内ボーラス投与時の選択した組織での濃度 - 時間プロファイル 60
図 2.6.4-19 ラットに[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{3}H-PEG]単回静脈内投与時の血漿及び脈絡叢での濃度 - 時間プロファイル 62
図 2.6.4-20 ラット尿及び糞中への PEG 関連放射能の経時的排泄 63

表目次

ページ

表 2.6.4-1 PK、分布、代謝及び排泄試験の概要 11
表 2.6.4-2 分析法の概要 15
表 2.6.4-3 バリデーションパラメータ（凝固一段法） 18
表 2.6.4-4 バリデーションパラメータ（ELISA 及び LOCI） 19
表 2.6.4-5 放射能標識ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の定量法 20
表 2.6.4-6 非臨床試験で用いた抗薬物抗体測定法の概要 21
表 2.6.4-7 バリデーションパラメータ：ラット血漿中抗ノナコグ ベータペゴル抗体及び抗 rFIX 抗体のブリッジング ELISA 22
表 2.6.4-8 バリデーションパラメータ（カニクイザル血漿中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体検出用ブリッジング ELISA） 25
表 2.6.4-9 バリデーションパラメータ（カニクイザル血漿中のノナコグ ベータ ペゴル中和抗体検出用ベセスダ法） 25
表 2.6.4-10 F9-KO マウス、血友病 B イヌ及びミニブタにおけるノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®単回静脈内投与時の PK パラメータ 27
表 2.6.4-11 ノナコグ ベータ ペゴル単回静脈内投与時の PK パラメータの動物種間比較 35
表 2.6.4-12 ノナコグ ベータ ペゴルの CL の動物種間スケーリングに用いた体重データ 36
表 2.6.4-13 ヒト、ラット及びカニクイザルにおける反復静脈内投与時の定常状態でのノナコグ ベータ ペゴルの C_{max}、$AUC_{(0-t)}$及び $t_{1/2}$ 37
表 2.6.4-14 動物とヒトの曝露量比（40 IU/kg 投与時の $AUC_{(0-t)}$及び 100 IU/kg 投与時の C_{max}） 37
表 2.6.4-15 放射能標識トレーサーを用いた試験における換算に用いた分子量 39
表 2.6.4-16 代謝試験に用いたノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG 放射能標識トレーサーの詳細 39

表 2.6.4-17　F9-KO マウスに投与された各種 ^{3}H 標識ノナコグ ベータ ペゴル関連放射能の推定血漿中 PK パラメータの概要 41
表 2.6.4-18　ラットに投与された各種の放射能標識ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG に関連する放射能の推定血漿中 PK パラメータの概要 42
表 2.6.4-19　ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の組織分布試験の概要 44
表 2.6.4-20　ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の排泄試験の概要 52
表 2.6.4-21　F9-KO マウス及びラットに単回静脈内投与後 12 週での推定排泄回収率（%） 52
表 2.6.4-22　ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG 単回静脈内投与後 12 週でのラット排泄データ（%）の比較 54
表 2.6.4-23　F9-KO マウスにおける静脈内投与後の推定 PK パラメータ：ノナコグ ベータ ペゴルの 3 ロットデータ（LOCI） 56
表 2.6.4-24　F9-KO マウスにおける静脈内投与後の推定 PK パラメータ：ノナコグ ベータ ペゴルの 3 ロットデータ（発色性合成基質法） 57

略語一覧

aPTT	:	Activated Partial Thromboplastin Time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
ASN	:	Asparagine（アスパラギン）
ASp	:	Aspartic acid（アスパラギン酸）
AT	:	Antithrombin III（アンチトロンビン III）
AUC	:	Area under the activity versus time curve（活性－時間曲線下面積）
$AUC_{(0-\infty)}$	:	AUC from zero hours to infinity（投与開始時から投与後無限大の AUC）
$AUC_{(0-t)}$	:	AUC from zero to time（投与開始時から投与後任意時間 t の AUC）
$AUC_{(0-96h)}$	:	AUC from zero hours to 96h（投与開始時から投与後 96 時間の AUC）
AUC_{tau}	:	AUC within the dosing interval（1 投与間隔の AUC）
BLA	:	Biologic Licence Application（生物学的製剤承認申請）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human use（ヒト用医薬品委員会）
CL	:	Clearance（クリアランス）
C_{max}	:	Peak activity（最高血中濃度）
CMP-NAN	:	Cytidine-5’-monophospho-N-acetylneuraminic acid disodium salt（シチジン-5’-モノホスホ-N-アセチルノイラミン酸二ナトリウム塩)
CNS	:	Central nervous system（中枢神経系）
CSF	:	Cerebrospinal fluid（脳脊髄液）
C57BL	:	C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice（C57 ブラック、バックグラウンド系統として遺伝子改変マウスの作製に広く使用される一般的な近交系実験用マウス）
DNA	:	Deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DP	:	Drug Product（製剤）
DS	:	Drug Substance（原薬）
ECG	:	Electrocardiogram（心電図）
EGF	:	Epidermal Growth Factor（上皮成長因子）
ELISA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicine Agency（欧州医薬品庁）
EOSL	:	End of Shelf Life（有効期間）
EU	:	European Union（欧州連合）
Eq.	:	Equivalents（等価量）
F	:	Female（雌）
F1	:	A factor to account for extrapolation between species（種間での外挿係数）
F2	:	A factor of 10 to account for variability between individuals（個体間の変動を考慮した係数）
F3	:	A variable factor to account for toxicity studies of short-term exposure（毒性試験の期間が短い場合に適用する変数）
F4	:	A factor that may be applied in cases of severe toxicity, e.g., non-genotoxic carcinogenicity, neurotoxicity or teratogenicity（重篤な毒性、例えば、遺伝毒性を伴わない発がん性、神経毒性又は催奇形性の場合に適応される係数）
F5	:	A variable factor that may be applied if the no-effect level was not established（無毒性量が得られていない場合に適用する変数）
FDA	:	Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
FHD	:	First Human Dose（ヒト初回投与）
FIX	:	Coagulation Factor FIX（血液凝固第 IX 因子）
FIX-KO	:	Coagulation Factor FIX-Knock out（血液凝固第 IX 因子ノックアウト）
FIXa	:	Activated Coagulation Factor FIX（活性型血液凝固第 IX 因子）

FV	:	Coagulation Factor V（血液凝固第 V 因子）
FVa	:	Activated Coagulation Factor V（活性型血液凝固第 V 因子）
FVII	:	Coagulation Factor FVII（血液凝固第 VII 因子）
FVIIa	:	Activated Coagulation Factor FVII（活性型血液凝固第 VII 因子）
FVIIa-TF	:	Activated Coagulation Factor FVII - tissue factor（活性型血液凝固第 VII 因子-組織因子）
FVIII	:	Coagulation Factor FVIII（血液凝固第 VIII 因子）
FVIIIa	:	Activated Coagulation Factor FVIII（活性型血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	Coagulation Factor X（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	Activated Coagulation Factor X（活性型血液凝固第 X 因子）
FXI	:	Coagulation Factor XI（血液凝固第 XI 因子）
FXIa	:	Activated Coagulation Factor XI（活性型血液凝固第 XI 因子）
F9-KO	:	Coagulation factor IX Knock out（血液凝固第 IX 因子ノックアウト）
Gla (domain)	:	Gamma-carboxylated (domain)（γ-カルボキシル化（ドメイン））
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性試験の実施の基準）
h(rs)	:	Hour(s)（時間）
HCP	:	Host cell protein（ホスト細胞タンパク質）
HE	:	Hematoxylin and eosin（ヘマトキシリン・エオジン）
HMWP	:	High Molecular Weight Protein（高分子タンパク質）
ICH	:	International Conference on Harmonisation（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IgG	:	Immunoglobulin（免疫グロブリン）
IHC	:	Immunohistochemical（免疫組織化学的検査）
INN	:	International Nonproprietary Name（国際一般名）
IU	:	International Unit（国際単位）
i.v.	:	Intravenous（静脈内）
kDa	:	KiloDalton（キロダルトン）
KO	:	Knock Out（ノックアウト）
LLOQ	:	Lower Limit Of Quantification（定量下限値）
LOCI	:	Luminescent Oxygen Channelling Immunoassay（LOCI 法）
LoQ	:	Limit of Quantification（定量限界）
LSC	:	liquid Scintillation counting（液体シンチレーション計数法）
M	:	Male（雄）
MTG	:	Maximum thrombus generation（最高血栓形成（速度））
NA	:	Not applicable（適応なし）
NaCl	:	Sodium Chloride（塩化ナトリウム）
Nc	:	Not calculated（計算せず）
NOAEL	:	No Observed Adverse Effect Level（無毒性量）
N9	:	Recombinant FIX produced as intermediate for nonacog beta pegol（ノナコグ ベータ ペゴルの中間体として製造された遺伝子組換え FIX）
N9-GP	:	ノナコグ ベータ ペゴル
PD	:	Pharmacodynamic(s)（薬力学）
PDE	:	Permissible daily exposure（許容 1 日曝露量）
PDCO	:	Paediatric Committee（小児委員会）
pdFIX	:	Plasma Derived FIX（血漿由来の FIX）
PEG	:	Polyethylene glycol polymer（ポリエチレングリコール）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PK	:	Pharmacokinetic(s)（薬物動態）
PLT	:	Platelet counts（血小板数）

PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japan（医薬品医療機器総合機構）
Pos	:	Positive（陽性）
PSC	:	Cytidine-5'-monophospho-2''-yl-(N-(N-(2,3-bis)-methyl-poly(oxyethylen)-oxy)-propyloxycarbonyl)-glycinyl)-D-neuraminic acid disodium salt（シチジン-5'-モノホスホ-2''-イル-(N-(N-(2,3-ビス)-メチル-ポリ(オキシエチレン)-オキシ)-プロピルオキシカルボニル)-グリシニル)-D-ノイラミン酸二ナトリウム塩）
PT	:	Prothrombin Time（プロトロンビン時間）
q.s.	:	Quantum satis (sufficient amount)（十分量）
QWBA	:	Quantitative whole body autoradiography（定量的全身オートラジオグラフィ）
R-time	:	Clot time（凝固時間）
rER	:	Rough endoplasmatic reticulum（粗面小胞体）
rFIX	:	Recombinant Coagulation Factor IX（遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFIXa	:	Activated Recombinant Coagulation Factor IX（活性型遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFVIIa	:	Recombinant Activated Coagulation Factor VII（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
SD	:	Standard Deviation（標準偏差）
SD	:	Single Dose（単回投与）
SEM	:	Standard Error of Means（標準誤差）
SS	:	Steady State（定常状態）
SWP	:	Scientific Working Party（科学的ワーキング・パーティー）
TTC	:	Threshold of Toxicological Concern（毒性学的懸念の閾値）
TEG	:	Thromboelastography（トロンボエラストグラフィー法）
TF	:	Tissue Factor（組織因子）
TFPI	:	Tissue Factor Pathway Inhibitor（組織因子経路インヒビター）
TGA	:	Thrombin Generation Assay（トロンビン生成試験）
TK	:	Toxicokinetics（トキシコキネティクス）
$t_{1/2}$	:	terminal half-life（消失半減期）
t_{max}	:	time at which the highest concentration occurs（最高血中濃度到達時間）
TNF-α	:	Tumor Necrosis Factor alpha（腫瘍壊死因子 α）
Tyr	:	Tyrosine（チロシン）
U	:	Unit（単位）
US	:	United States（米国）
VEGF	:	Vascular endothelial growth factor（血管内皮細胞増殖因子）
WBCT	:	Whole Blood Clotting Time（全血凝固時間）
WK	:	Week（週）
^{14}C	:	Radiocarbon/Carbon-14（放射性炭素/炭素-14）
^{3}H	:	Tritium/hydrogen-3（トリチウム/水素-3）
40K PEG	:	40 kilo dalton polyethylene glycol （40 キロダルトンポリエチレングリコール）
40 kDa PEG	:	40 kilo dalton polyethylene glycol （40 キロダルトンポリエチレングリコール）

2.6.4.1 まとめ

ノナコグ ベータ ペゴルは、他の FIX 製剤よりも半減期を長くし、全般的に薬物動態（PK）プロファイルを改善することで、治療の有用性を高め、治療の負担を軽減することを目的として開発された。PEG 化による血中循環の延長は、腎排泄、受容体を介した取込み及びタンパク質分解など、各種消失過程の効率低下によるものと考えられている。患者において、ノナコグ ベータ ペゴルはその生理活性物質 FVIIa 及び FXIa によって損傷部位で活性型 rFIX（rFIXa）に転換される。この過程で、PEG 化された活性化ペプチドが遊離する。したがって、活性化されるとノナコグ ベータ ペゴルは内因性 FIXa と同一の作用機序を持ち、同一の制御機構の対象となる。活性化後は、活性化ペプチドに生物学的役割はなくタンパク質分解を受け、リンカーに結合した PEG は血中に残る。

表 2.6.4-1 に実施した PK 試験の概要を示す。

表 2.6.4-1　　PK、分布、代謝及び排泄試験の概要

Discipline and type of study	Route of administration	Species	Study ID	GLP (Yes/No)
Pharmacokinetics(PK)				
Single dose PK supporting in vivo Efficacy studies				
Single dose	i.v.	F9-KO mice	LEEH080102	No
Single dose	i.v.	Beagle dog	MIE080701	No
Single dose	i.v.	Minipig	LEEH080502	
Single and repeat dose PK of safety studies				
6 weeks repeat dose study	i.v.	Rowett nude rats	212143	No
26 weeks repeat dose toxicity study (GLP)	i.v.	Rowett nude rat	212513	Yes
4 week repeat dose toxicity (GLP)	i.v.	Cynomolgus monkey	208260	Yes
13 weeks repeat dose study	i.v.	Cynomolgus monkey	208405	No
Estimated single dose PK based on radioactivity from distribution and excretion studies				
Single dose PK of radiolabelled nonacog beta pegol	i.v.	F9-KO mice/Wistar rats	213393	No
Single dose PK of radiolabelled PEG	i.v.	Wistar rat	213395	No
Distribution - Quantitative whole body autoradiography (QWBA)				
QWBA [^{3}H-Activation peptide]-nonacog beta pegol	i.v.	F9-KO mice	210169	No
Immunohistochemistry (IHC) on selected tissues from study 210169	i.v.	F9-KO mice	210167	No
QWBA [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	i.v.	F9-KO mice	212166	No
QWBA [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	i.v.	Wistar rats	214076	No
QWBA [^{3}H-PEG]	i.v.	Wistar rats	212213	No

Discipline and type of study	Route of administration	Species	Study ID	GLP (Yes/No)
Metabolism				
Profiling of components in plasma, urine and faeces	i.v.	F9-KO mice	214438	No
Metabolite profile by gel electrophoresis and radiometry of plasma and urine	i.v.	F9-KO mice	214456	No
^{3}H-N9-GP, metabolite profiling of plasma, urine & faeces from rat (HPLC)	i.v.	Wistar rat	215080	No
^{3}H-N9-GP - metabolite profiling of plasma and urine from rat (GEL electrophoresis)	i.v.	Wistar rat	215081	No
^{3}H-PEG - metabolite profiling of plasma, urine and faeces (HPLC)	i.v.	Wistar rat	215078	No
Partitioning into red blood cells	*In vitro*	-	214152	No
Excretion				
12 week excretion after single dose with [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	i.v.	F9-KO mice	212160	No
12 week excretion after single dose with [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	i.v.	Wistar rats	214077	No
12 week excretion after single dose with [^{14}C-linker]-nonacog beta pegol	i.v.	Wistar rats	213466	No
12 weeks excretion after a singe dose with the 40 kDa PEG moiety alone [^{3}H-PEG]	i.v.	Wistar rats	212115	No
PK drug interaction – No studies performed				
Other pharmacokinetics				
Single dose PK study in mice comparing three phase 3 clinical batches	i.v.	Mice	LEEH130101	No

ノナコグ ベータ ペゴルの PK 特性は、ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質分子を検出する生体試料中薬物濃度分析法を用いて明らかにされている。一般に、ノナコグ ベータ ペゴルの PK は、各種の非臨床試験に用いた動物種において、静脈内ボーラス投与後、1 相性の血漿消失パターンを示す。Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおいて、全身曝露量は概して用量比例的に増加した。

各種トレーサーを用いて実施した分布及び排泄試験において、PEG の PK 及びクリアランス（CL）を検討した。分布試験では、トリチウム［^{3}H］で分子のタンパク質（活性化ペプチド）部分を標識したトレーサー（[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴル）及び PEG を標識したトレーサー（[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル）ならびに PEG とタンパク質の間に位置するリンカー（グリシン）を炭素 14［^{14}C］で標識したトレーサー（[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴル）の 3 種の放射能標識体を用いた（図 2.6.4-1）。

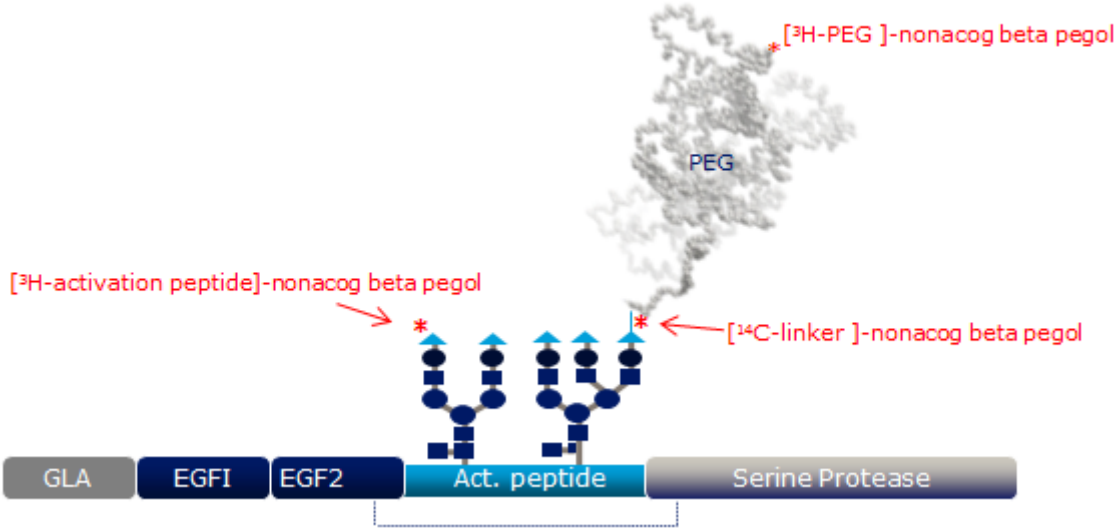


図 2.6.4-1　　ノナコグ ベータ ペゴルの分布、排泄及び代謝試験に用いた放射能標識トレーサー

PEG 関連放射能は尿中及び糞中に血漿中から 2 相性に消失し、初期相の消失半減期（$t_{1/2}$）は約 2～3 日、その後の終末相の $t_{1/2}$ は 15～18 日と推定された。第 2 相の消失が遅いのは、タンパク質部分の分解後、PEG 又はリンカーに附加された PEG が体内循環しているためと考えられた。単回投与後 12 週においても、残屍中に低濃度の PEG 関連放射能が検出された。放射能の特定の器官への局在は認められなかった。

分布試験では、ノナコグ ベータ ペゴルは速やかに全身に分布し、組織中濃度は血流量の多い組織で最も高く、中枢神経系（CNS）で最も低かった。PEG を放射能標識した際、[^{3}H-PEG]及び[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの血漿中プロファイルは類似しており、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーは PEG の PK／CL に従うことを示している。

ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質部分は分解され、主に 40 kDa PEG が体内を循環していた。FIX ノックアウト（F9-KO）マウスにおいて、PEG 関連成分（40 kDa 以下の PEG 由来分子）は尿及び糞中に排泄され、大部分は消失の速い初期相の期間に排泄された。

2.6.4.2 動物種の選択

吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）試験は、通常、薬効薬理及び毒性試験と同一の動物種及び動物モデルを用いて実施した。薬効薬理試験では、血友病 B 動物モデル、すなわち F9-KO マウスや血友病 B イヌを用いた。毒性試験では、正常な血液凝固能を有する動物、すなわちカニクイザル及びラットを用いて実施した。ノナコグ ベータ ペゴルは、出血時にのみ活性化されると考えられることから、正常な血液凝固能を有する動物の使用は妥当と考えられる。臨床における予防的な投与の状況では、出血は最小限に低減すると考えられ、したがって、ノナコグ ベータ ペゴルの大部分は活性化されることなく、全長分子として循環すると考えられる。したがって、非血友病動物モデルから得られた ADME データは、臨床上、有用であると考えられる。

2.6.4.3 分析方法

凝固一段法、発色性合成基質法、抗原（ag）濃度を測定する酵素免疫吸着測定法（ELISA）又は Luminescent Oxygen Channelling Immunoassay（LOCI）法など、ノナコグ ベータ ペゴルの PK を評価するための種々の生体試料中濃度測定法が開発された。凝固活性測定における変動を最小限に抑えるため、すべての凝固一段法を用いた非臨床試験での測定では、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）試薬として SynthAFax を使用した。試薬の選択については、薬理試験の概要文（Module 2.6.2.3）を参照のこと。これらの生体試料中薬物濃度分析法に共通することは、タンパク質部分を検出することであり、それぞれ、FIX 活性（凝固活性）、FIX 抗原（LOCI／ELISA）あるいは全長分子（サンドイッチ ELISA 法では FIX と PEG 双方を捕捉する）を測定する。毒性試験を支持するため、結合抗体及び中和抗体を検出する分析法が開発された。表 2.6.4-2 に PK 解析用に開発された分析法の概要を示す。

表 2.6.4-2　　分析法の概要

Method of analysis		**Species**	**Measures**	**Study ID**
Clotting Activity	One-stage clotting assay[1]	F9-KO mice	Human rFIX[2]	LEEH080102
	One-stage clotting assay (GLP)[1]	Rat	Human rFIX[2] and rat FIX	210068; 210069
	One-stage clotting assay[1]	Haemophilia B Dogs	Human rFIX[2] and dog FIX	MIE080701
	One-stage clotting assay (GLP)[1]	Cynomolgus monkey	Human rFIX[2] and cynomolgus FIX	208446
	Two-stage chromogenic assay	F9-KO mice	Human rFIX[2] and mice FIX	LEEH130101
Antigen concentration	ELISA - antigen	F9-KO mice	Human rFIX[2]	LEEH080102
	LOCI - antigen	F9-KO mice	Human rFIX[2]	LEEH130101
	LOCI - antigen (GLP)	Rat	Human rFIX[2]	213270
	ELISA - antigen	Minipig	Human rFIX[2]	LEEH080502
	ELISA antigen (GLP)	Cynomolgus monkey	Nonacog beta pegol (full molecule: rFIX and PEG)	208414
Binding anti-drug antibody assays	Bridging ELISA (GLP)	Rat	Anti-rFIX antibodies and anti-nonacog beta pegol antibodies	209368
	Bridging ELISA (GLP)	Cynomolgus monkey	Anti-nonacog beta pegol antibodies	208158
Neutralising anti-drug antibody assay	Bethesda like assay (non-GLP)	Dog	Anti-dog FIX antibodies and anti-rFIX antibodies	MIE080701
	Bethesda like assay (GLP)	Cynomolgus monkey	Anti-nonacog beta pegol antibodies or cross-reacting monkey FIX antibodies	208240

[1]To minimise the PEG interference in the one-stage clotting assay, SynthAFax was used as aPTT reagent.
[2] Human rFIX is from nonaog beta pegol or BeneFIX® depending on assay.

2.6.4.3.1 F9-KO マウス、血友病 B イヌ及びミニブタにおける非 GLP 薬効薬理試験で用いたノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の生体試料中薬物濃度分析法

2.6.4.3.1.1 生体試料中薬物濃度分析 - FIX 凝固一段法 （非 GLP）（Module 4.2.2.2、試験番号 LEEH080102 及び Module 4.2.1.1、試験番号 MIE080701）

FIX 凝固一段法は、FIX 活性依存的なフィブリン血栓形成時間を測定する。FIX 凝固一段法は、内在系凝固カスケードを測定する aPTT 測定法の改変に基づく凝固一段法である。接触因子活性化剤（aPTT 試薬中のエラグ酸）を用いて FXIIa の産生を刺激し、$CaCl_2$ 添加によって反応をさらに誘発した。テナーゼ及びプロトロンビナーゼ複合体形成面を提供するためリン脂質を加えた。FIX 以外のすべてのヒト血液凝固因子を十分かつ均一な量で確保するため、本法ではヒト FIX 欠乏血漿を使用した。同量（40 μL）の試験試料、ヒト FIX 欠乏血漿［免疫学的に吸着除去、Instrumental Laboratory Systems（ILS）社］、aPTT 試薬（SynthAFax、ILS 社）及び $CaCl_2$（0.02mol/L）を使用した。試料を HBS/BSA（0.5%）FIX 希釈緩衝液で 10～20 倍に希釈した。凝固時間を ACL9000 機器（Instrumentation Laboratory 社）で測定した。LLOQ は、F9-KO マウス及びイヌで、約 300 ng/mL（約 0.070～0.075 IU/mL）であった。

2.6.4.3.1.2 生体試料中薬物濃度分析 - FIX ELISA（非 GLP）（Module 4.2.2.2、試験番号 LEEH080102 及び LEEH080502）

本測定法（F9-KO マウス及びミニブタで使用）は 2 種の抗体を用いるサンドイッチ ELISA である。ヒト FIX に特異的なモノクローナル抗体（3F14A3B6）をマイクロプレートウェル表面に固定化した。その後、ウェルに血漿試料又は検量線試料を加え、次いでペルオキシダーゼ標識抗体を加えた（検出用：RDI-FAC9-DET FIX-EIA 140-D Detecting AB、Fitzgerald 社）。ペルオキシダーゼ濃度を、比色シグナルの発生によって酵素的に測定した。発生したシグナル量はペルオキシダーゼ濃度に比例し、すなわち FIX の濃度に比例する。血漿試料を 50 倍以上に希釈し、血漿からのマトリックスの影響を回避した。F9-KO マウスの ELISA では、LLOQ は 0.25 ng/mL であった。ミニブタの ELISA では、LLOQ は 0.4 ng/mL であった。

ミニブタでは、ブタ FIX を認識しない、ヒト FIX 特異抗体を使用した。これは、測定された血漿中 FIX 濃度が、ミニブタの内因性 FIX 濃度ではなく、被験物質のみに由来することを示す。F9-KO マウスでは血中に FIX は検出されず、したがって FIX 濃度は被験物質にのみ関連する。

2.6.4.3.1.3 生体試料中薬物濃度分析 - FIX LOCI （非 GLP）（Module 4.2.2.7、試験番号 LEEH130101 及び Module 4.2.3.2、試験番号 212143）

F9-KO マウス及びラットから得られた血漿試料中のノナコグ ベータ ペゴルを LOCI で分析した。概略すると、LOCI は、2 種類のビーズ、すなわちユーロピウムコーティングアクセプタービーズとスト

レプトアビジンコーティングドナービーズの近接に基づくホモジニアスな測定法である。アクセプタービーズにヒト FIX に対する特異抗体を結合させ、ヒト FIX 特異的試薬となった。ドナービーズは非特異的であった。ヒト FIX に対するビオチン化抗体を加え、免疫サンドイッチを作製した。レーザー励起により、ドナービーズに存在する光増感剤が周囲の酸素をさらに励起状態に変換し、それがアクセプタービーズに反応し化学的に蛍光を発生させる。これが、さらにアクセプタービーズに含まれる蛍光色素分子を活性化して発光させ、その光量を測定する。発光量は試料中の FIX（ノナコグ ベータ ペゴルを含む）に比例する。

検量線に対する測定値の結果を FIX LOCI 抗原のデータとした。データは ng/mL で測定され、F9-KO マウスではノナコグ ベータ ペゴルの分子量を用いて nmol/L に換算された（この換算では FIX の分子量として 56000 g/mol を用いた）。本測定法では、ラット及びマウスの FIX を認識しないヒト FIX 特異抗体を使用した。これは、測定された血漿中 FIX 濃度が、マウス/ラットの内因性 FIX 濃度ではなく、被験物質のみに由来することを意味する。

2.6.4.3.1.4 生体試料中薬物濃度分析 - FIX 発色性合成基質法 （非 GLP）（Module 4.2.2.7、試験番号 LEEH130101）

F9-KO マウスに用いた本測定法は、Hyphen Biomed 社から市販されている Biophen FIX キットの改変法である。概略すると、本測定法は FXa を測定するものである；リン脂質（PLP）及びカルシウムの存在下で、試験試料中に存在する FIXa は、測定系に一定濃度かつ過剰に供給されるトロンビン活性化血液凝固第 VIII 因子（VIII:C）と酵素複合体を形成し、測定系に存在する血液凝固第 X 因子を活性型血液凝固第 X 因子（FXa）に活性化する。この活性は、制限因子である FIXa 量と直接的に相関する。次いで、FXa の発色基質に対する比活性によって生成された FXa 量は正確に測定される。FXa は、基質を開裂させて p-ニトロアニリン（pNA）を放出し、次いで pNA 量を 405 nm の波長で測定する。生成された pNA 量は FIXa の活性に正比例する。

WHO FIX 国際標準品に対して校正されたノボ ノルディスク社の rFIX 標準物質（PRM0410）を検量線用試料に使用した。発色性合成基質の分析結果は、mU/mL で測定され、次いで、所定の試験化合物の比活性を用いて nmol/L に換算された。LLOQ は 1.4 mU/mL と推定された。

2.6.4.3.2 重要な反復投与毒性試験（GLP）におけるラット及びカニクイザル血漿中ノナコグ ベータ ペゴルの生体試料中薬物濃度分析法（バリデートされた方法）

2.6.4.3.2.1 生体試料中薬物濃度分析 - 凝固一段法（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208446, 210069 及び 210068）

生体試料中薬物濃度分析法を、国際ガイドライン及び勧告に従い、ラット及びカニクイザル血漿（3.8%クエン酸添加）でバリデートした（[1, 2, 3]）。FIX 測定用の凝固法では、ノナコグ ベータ ペゴル、BeneFIX®及び内因性 FIX を区別できないことから、測定された活性は、ノナコグ ベータ ペゴル／BeneFIX®ならびに存在する場合には内因性 FIX を含むものであった（表 2.6.4-3）。

表 2.6.4-3 バリデーションパラメータ（凝固一段法）

Validation parameter	**Rat**	**Rat**	**Cynomolgus monkey**
Calibrator LLOQ, calibration LLOQ, sample Precision, (%CV QC's) Accuracy (%RE QC's) Stability at RT Long time stability	nonacog beta pegol 93.8 mIU/ml 938 mIU/ml ≤ 15% ≤± 20% 6 hrs 6 mth at -20˚C 6 mth at -80˚C	BeneFIX® 93.8 mIU/ml 938 mIU/ml ≤ 15% ≤± 20% 6 hrs 6 mth at -20˚C 6 mth at -80˚C	nonacog beta pegol 125 ng/ml [1] 250 ng/ml ≤ 20% ≤± 20% 6 hrs 6 mth at -80˚C
Validation Study ID Stability Study ID ISR Study ID	210068 Module 4.2.2.1, 211053 -	210069 211053	208446 Module 4.2.2.1, 209057 Module 4.2.2.1, 209054
Used for *in vivo* study ID	209353	209353	208260

LLOQ: Lower Limit of Quantification; CV: Coefficient of Variation; QC's: Quality Controls; RE: Relative Error; hrs: hours; mth: month; ISR: Incurred Sample Reproducibility.

[1] The specific activity for nonacog beta pegol used for conversion was 180 IU/mg

2.6.4.3.2.2 生体試料中薬物濃度分析 - ELISA（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208414）

カニクイザルにおいて、PEG に対するモノクローナル抗体によってノナコグ ベータペゴルを捕捉するサンドイッチ ELISA を用いてノナコグ ベータ ペゴルを測定した。複合体は、その後、西洋わさびペルオキシダーゼ（HRP）を標識した FIX 認識抗体によって検出された。HRP 標識抗体は、基質としてテトラメチルベンジジン（TMB）を用いる比色分析によって検出した。本測定法はノナコグ ベータ ペゴルに特異的であり、そのため、内因性 FIX 又は PEG 活性化ペプチドは測定されない。バリデーションパラメータについては表 2.6.4-4 を参照のこと。

2.6.4.3.2.3 生体試料中薬物濃度分析 - LOCI（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 213270）

ラット血漿試料で、LOCI によってノナコグ ベータ ペゴル及び内因性 FIX を分析した。本測定法は、GLP 試験用に、現行の基準及びガイドライン [1, 2, 3] に従ってバリデートされた。本測定では、ラット FIX を認識しないヒト FIX 特異抗体を使用した。これは、測定された血漿中 FIX 濃度がラットの内因性 FIX 濃度ではなく、被験物質のみに由来することを意味する（表 2.6.4-4）。

表 2.6.4-4 バリデーションパラメータ（ELISA 及び LOCI）

Validation parameter	**Cynomolgus monkey**	**Rat**
Assay Calibrator LLOQ, calibration LLOQ, samples Precision, (%CV QC's) Accuracy (%RE QC's) Stability at RT Long-time stab	ELISA nonacog beta pegol 10 ng/ml 10 ng/ml ≤ 20% ≤± 25% 24 hrs 6 mth at -20˚C[1] 24 mth at -80˚C[1]	LOCI nonacog beta pegol 15 ng/ml 15 ng/ml ≤20%[2] ≤±20% 4 hrs -
Validation study report ISR study report	208414 Module 4.2.2.1, 209029	213270 The ISR is a integrated part of study ID 212513
Used for *in vivo* study ID	208260	212143; 212513

LLOQ: Lower Limit of Quantification, CV: Coefficient of Variation, QC's: Quality Controls, RE: Relative Error; ISR: Incurred Sample Reproducibility

[1] The long-time stability in Cynomolgus monkey are covered with the results from the stability in human (Module 5.3.1.4, 211306)

[2] The precision of samples are ≤30%

2.6.4.3.3 放射能の定量（非 GLP）

各種試験において、F9-KO マウス及びラットへ放射能標識トレーサーを投与し、投与後の放射能を定量した。LLOQ 又は検出限界（LOD）を表 2.6.4-5 に示す。

表 2.6.4-5　　放射能標識ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の定量法

Study ID	Compound	Species	Radio-Isotope	Matrix	Method	LLOQ
210169	Nonacog beta pegol	F9-KO mice	[^{3}H-activation peptide]	Tissue/ plasma	QWBA LSC	0.052 µg eq. /g tissue 0.0003 µg eq./g (LOD)
212166	Nonacog beta pegol	F9-KO mice	[^{3}H-PEG]	Tissue/ plasma	QWBA LSC	0.040 µg eq./g tissue 0.0005 µg eq./g (LOD)
212160	Nonacog beta pegol	F9-KO mice	[^{3}H-PEG]	Plasma, Urine, Faeces	LSC LSC LSC	Not reported[1] Not reported[1] Not reported[1]
214076	Nonacog beta pegol	Rat	[^{3}H-PEG]	Tissue/ plasma	QWBA LSC	0.049 µg eq./g tissue 0.00006 µg eq./g (LOD)
214077	Nonacog beta pegol	Rat	[^{3}H-PEG]	Plasma, Urine, Faeces	LSC LSC LSC	Not reported[1] Not reported[1] Not reported[1]
213466	Nonacog beta pegol	Rat	[^{14}C-PEG]	Plasma, Urine, Faeces	AMS AMS AMS	0.028 ng eq./ml Not reported[1] Not reported[1]
212213	40 kDa PEG	Rat	[^{3}H-PEG]	Tissue/ plasma	QWBA LSC	0.017 µg eq./g tissue 0.00016 µg equiv/g (LOD)
212115	40 kDa PEG	Rat	[^{3}H-PEG]	Plasma, Urine, Faeces	LSC LSC LSC	Not reported[1] Not reported[1] Not reported[1]

AMS: Accelerator Mass Spectrometry, LLOQ= lower limit of quantification, LOD =Limit of detection, LSC = liquid scintillation counting, QWBA = quantitative whole body autoradiography. All values in this table are based on total radioactivity recalculated to µg full molecule (nonacog beta pegol) using the know ratio between unlabelled versus labelled compound.
[1]LOQ was based on two times the mean background of a control sample (plasma, urine, faeces) containing the liquid scintillant

2.6.4.3.4　　非臨床試験における抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体の分析法

GLP 試験で用いた抗体測定法は、国際ガイドライン及び勧告に従ってバリデートされた[4, 5]。表 2.6.4-6 に非臨床試験のために開発された抗薬物抗体測定法の概要を示す。

表 2.6.4-6　　非臨床試験で用いた抗薬物抗体測定法の概要

Assay (lab)	Description	Non-clinical studies	Method Validation report
Anti-nonacog beta pegol/rFIX antibody bridging ELISA in rat plasma (Novo Nordisk)	Used for detection of binding antibodies against nonacog beta pegol and recombinant FIX in rat plasma. The assay is also used to determine the specificity of the antibody response (i.e. towards the rFIX- or the PEG-moiety)	Study 209353 (Nonacog beta pegol and BeneFIX® comparable immunogenicity in rat) Study 212143 (6wk Rowett nude rat Pharmacokinetic & Immunogenicity) Study 212513 (26wk Rowett nude rat PEG toxicity)	209368
Neutralising FIX antibody determination in haemophilia B dogs, Bethesda assay (Novo Nordisk)	Used for characterization of the neutralising effect of anti-nonacog beta pegol antibodies in dog plasma	Pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) study of different human Factor IX preparations in Hemophilia B dogs (MIE080701)	MIE080701
Anti-nonacog beta pegol antibody bridging ELISA in cynomolgus monkey plasma (Novo Nordisk)	Used for detection of binding antibodies against nonacog beta pegol and to determine the specificity of the antibody response (i.e. towards the rFIX- or the PEG-moiety) in cynomolgus plasma	Study 208260 (4wk repeat dose toxicity in cynomolgus monkey) Study 209353 (13wk immunogenicity study in monkey)	208158
Neutralising anti-nonacog beta pegol Bethesda assay in cynomolgus monkey plasma (Novo Nordisk)	Used for characterization of the neutralising effect of anti-nonacog beta pegol antibodies in cynomolgus plasma	Study 208260 (4wk repeat dose toxicity in cynomolgus monkey) Study 209353 (13wk immunogenicity study in monkey)	208240

2.6.4.3.4.1　ラット血漿中抗ノナコグ ベータ ペゴル／rFIX 抗体のブリッジング ELISA（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 209368）

抗体スクリーニング法を用いて、ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®に対する抗体を検出した。これらの抗体の中和作用を、ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®の FIX 活性測定によって確認した。

同一測定で rFIX（N9 及び BeneFIX®）及びノナコグ ベータ ペゴルに対する抗体を一斉に測定する目的で開発し、バリデートされたブリッジング ELISA をスクリーニング法に用いた（表 2.6.4-7）。その

ため、動物に投与された BeneFIX®及びノナコグ ベータ ペゴルからの抗体の結果を直接に比較可能であった。

概略すると、薬物と抗体を解離させるため血漿試料を酢酸で処理した。インキュベーション後、トリス（pH 9.5）中 25%ペルオキシダーゼ標識ノナコグ ベータ ペゴル及び 25%ペルオキシダーゼ標識 rFIX、25%ビオチン化ノナコグ ベータ ペゴル及び 25%ビオチン化 rFIX の混合液中で酢酸処理試料溶液を中和した。インキュベーション後、混合液をストレプトアビジンコーティングプレートに移し、洗浄した後、TMB 基質を加えた。発色量は試料中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体又は抗 rFIX 抗体の量に比例した。

抗体陽性の可能性のある試料を特定するため、2 回の陰性対照の平均＋正規化係数（バリデーション中に決定）としてカットポイントを算出した。測定された抗体の特異性を確認し特定するため、カットポイント以上で測定された試料は、特異性試験 1 では過剰量のノナコグ ベータ ペゴルによって、特異性試験 2 では過剰量の rFIX によって阻害された。抗体反応の大きさ／抗体力価を評価するため、陽性試料の抗体力価を測定した。

表 2.6.4-7　　バリデーションパラメータ：ラット血漿中抗ノナコグ ベータペゴル抗体及び抗 rFIX 抗体のブリッジング ELISA

Parameter	**Assay Performance**
Screening cut point (5% false positive rate)	Mean OD of Negative QC + normalisation factor
Specificity cut point (1% false positive rate) for rFIX	Signal inhibition ((A-B)/A)*100 ≥ -11%
Specificity cut point (1% false positive rate) for nonacog beta pegol	Signal inhibition ((A-B)/A)*100 ≥ +27%
Sensitivity (based on a polyclonal anti-rFIX antibody*)	0.017 µg/ml in 13/13 assays
Drug interference with rFIX	0.5 µg/ml anti-rFIX antibody detectable at 32 µg/ml rFIX
Drug interference with nonacog beta pegol	0.5 µg/ml anti-rFIX antibody detectable at 32 µg/ml nonacog beta pegol
Precision QC low (~0.04 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	39% CV
Precision QC med (~0.5 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	20% CV
Precision QC high (~6.25µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	6% CV
Validation Study ID	209368

* = Polyclonal anti-rFIX antibody was used as the control antibody. Compared with a monoclonal anti-rFIX antibody the content of rFIX specific antibody was ~5%. The listed values are rFIX specific antibodies.
(A-B/A) = Used in the confirmation/specificity test. Sample tested without (A sample) and in the presence of excess nonacog beta pegol or rFIX (B sample), specificity test 1 and 2, respectively.

2.6.4.3.4.2　血友病 B イヌにおける FIX 中和抗体の測定　（非 GLP）（Module 4.2.1.1、試験番号 MIE080701）

阻害作用を有する抗体の存在及び抗体力価を、血友病 B イヌ血漿中の抗 FIX 抗体測定用に開発されたベセスダ法の変法を用いて測定した。本測定法は非 GLP 試験下で用いられ、正式にバリデートされなかったため、バリデーション情報は得られていない。

本測定法は、投与動物から得られた血漿試料による FIX 活性の不活化に基づく。FIX 供給源として正常イヌ血漿を用い、投与動物の試料を測定用緩衝液で希釈した。残存 FIX 活性を、標準的な FIX 凝固一段法を用いて測定した。

ヒト FIX に対する抗体がイヌ FIX 活性の中和作用を有するか不明であったため、第 2 の手法も検討した。本手法は、血漿試料による FIX 濃縮物（この場合は BeneFIX®）の不活化に基づく。各イヌ個体から採取された最終時点の試料を、同じ個体から採取された投与前の試料と比較した。各試料を FIX 希釈用緩衝液で、あらかじめ 3、9、27 及び 81 倍に希釈した。希釈試料を、同量の正常イヌ血漿、1 IU/mL BeneFIX®又は FIX 希釈用緩衝液と混合した。試料に残存する抗体と FIX との結合を促進するため、これらの試料を 37℃で 1 時間反応させた。反応後、すべての試料を FIX 希釈用緩衝液でさらに 5 倍希釈した。すべての試料を、HBS/BSA 緩衝液（ウシ血清アルブミンを含む HEPES 緩衝生理食塩水）で希釈した正常イヌ血漿（すべての希釈物中に 10%以上のイヌ血漿を含む）又は BeneFIX®（3.3%のブランク血友病 B イヌ血漿を含む又は含まない）の検量線に対する残存 FIX 活性について分析した。

2.6.4.3.4.3　カニクイザル血漿中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体のブリッジング ELISA（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208158）

カニクイザル血漿中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体のスクリーニングを、ブリッジング ELISA を用いて実施した。本測定法では、ノナコグ ベータ ペゴル特異抗体はペルオキシダーゼ標識ノナコグ ベータ ペゴル及びビオチン化ノナコグ ベータ ペゴルと反応し、複合体はその後ストレプトアビジンでコーティングされたマイクロタイタープレートに結合する。試料中の抗体量は、ELISA リーダーで測定されたノナコグ ベータ ペゴル標識ペルオキシダーゼの基質反応に比例した。

本測定法のカットポイントは、10 回の投与前値の平均+ 1.645*SD と推定され、カニクイザル血漿中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体を検出する測定感度は、モノクローナル及びポリクローナル抗体を用いて 1000 ng/mL 未満と確定された。

カットポイント測定を示した試料を確認試験に供した。確認試験では、過剰量の非標識ノナコグ ベータ ペゴルで阻害された状態でのブリッジング ELISA のシグナルを求めた。ポリクローナルウサギ抗 rFIX 抗体を用いて陽性対照試料を調製した。

陽性と判定された試料は、表 2.6.4-8 の中和抗体測定法により、中和活性をさらに検討した。

表 2.6.4-8　バリデーションパラメータ（カニクイザル血漿中の抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体検出用ブリッジング ELISA）

Parameter	Assay Performance
Screening cut point (5% false positive rate)	Mean OD of Negative QC x 1.2
Specificity cut point (5% false positive rate)	Signal inhibition ((A-B)/A)*100 ≥ +28%
Sensitivity (based on a polyclonal anti-rFIX antibody*)	0.1 µg/ml
Drug interference with nonacog beta pegol	0.156 µg/ml anti-rFIX antibody detectable at 10 µg/ml nonacog beta pegol
Precision QC low (~0.375 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	41% CV
Precision QC med (~1.0 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	26% CV
Precision QC high (~3.5µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	17% CV
Validation Study ID	208158

* Polyclonal antibody was used as the control antibody. Compared with a monoclonal anti-rFIX antibody the content of rFIX specific antibody was ~5%. The listed values are rFIX specific antibodies..
(A-B/A) = Used in the confirmation test. Sample tested without (A sample) and in the presence of excess nonacog beta pegol or rFIX (B sample).

2.6.4.3.4.4　カニクイザル血漿中のノナコグ ベータ ペゴル中和抗体測定用ベセスダ法（GLP 用にバリデートされた方法）（Module 4.2.2.1、試験番号 208240）

カニクイザル血漿において、ノナコグ ベータ ペゴル（及び内因性 FIX）活性中和作用を有する抗体を評価するための活性中和作用の測定法を開発した。

本測定法は、3 µg/mL のノナコグ ベータ ペゴル（~0.5 U/mL）と同量のカニクイザルの血漿試料（FIX 一段法で活性を示すことが分かっている~1 U/mL のサル FIX を含む）を混合し測定した FIX 凝固一段法に基づく。中和作用を示す抗ノナコグ ベータ ペゴル抗体／抗サル FIX 抗体は、それぞれの投与前の抗体陰性試料（残存活性が 100%）と抗体陽性試料との比較により識別した。

表 2.6.4-9　バリデーションパラメータ（カニクイザル血漿中のノナコグ ベータ ペゴル中和抗体検出用ベセスダ法）

Parameter	Assay Performance
Screening cut point (5% false positive rate)	83.5% residual FIX activity compared to reference plasma
Sensitivity (based on a polyclonal anti-rFIX antibody*)	4.1 µg/ml
Drug interference with nonacog beta pegol	4 µg/ml anti-rFIX antibody was detectable at 0.5 µg/ml PEGylated BeneFIX®
Precision QC low (~4 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	4% CV
Precision QC med (~8 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	5% CV
Precision QC high (~16 µg/ml pAb anti-rFIX antibody)	8% CV
Validation Study ID	208240

* Polyclonal antibody was used as the control antibody. Compared with a monoclonal anti-rFIX antibody the content of rFIX specific antibody was ~5%. The listed values are rFIX specific antibodies.

2.6.4.4 吸収／PK

目的とする臨床投与経路を反映して、静脈内投与後のノナコグ ベータ ペゴルの PK を評価した。単回投与時（F9-KO マウス、イヌ、ミニブタ、Rowett ヌードラット及びカニクイザル）及び反復投与時（Rowett ヌードラット及びカニクイザル）の PK の評価を、ノンコンパートメント解析（NCA）によって実施した。

2.6.4.4.1 F9-KO マウス、イヌ及びミニブタにおける *in vivo* 薬効薬理試験を裏付ける単回投与 PK 試験

2.6.4.4.1.1 *In vivo* 薬効薬理試験を裏付ける単回投与 PK 試験（Module 2.6.5.3.A、試験番号 LEEH080102、Module 2.6.5.3.B、試験番号 MIE080701 及び Module 2.6.5.3.C、試験番号 LEEH080502）

F9-KO マウス及び血友病 B イヌにおいて、ノナコグ ベータ ペゴルと BeneFIX®を比較した *in vivo* 薬効薬理試験の一部として PK を評価した。開発の初期段階で、第 2 の非げっ歯類動物種としてミニブタを含めた。静脈内投与直後に初期相を示した後、ノナコグ ベータ ペゴルは概ね 1 相性の消失パターンを示し、その終末相 $t_{1/2}$ は、F9-KO マウスで 41 時間（ELISA で測定）～67 時間（凝固一段法で測定）、血友病 B イヌで 113 時間（凝固一段法で測定）、ミニブタで 76 時間（ELISA で測定）であった。ノナコグ ベータ ペゴルの $t_{1/2}$ は、概して BeneFIX®の $t_{1/2}$ よりも 2～6 倍長かった。ノナコグ ベータ ペゴルの CL は、BeneFIX®と比較して、ミニブタで 7 倍、血友病 B マウス及びイヌで 10～20 倍低かった。タンパク質として同用量（mg/kg 単位）を単回静脈内投与したとき、*in vivo* での血漿中回収率（C_{max}）は、BeneFIX®と比較して、ノナコグ ベータ ペゴルの方が 1.1～1.8 倍高かった。これらの PK データは、F9-KO マウス及び血友病 B イヌの薬効薬理試験で認められた長い効果持続時間と一致している。F9-KO マウス、イヌ及びミニブタにおける単回静脈内投与時の PK パラメータを表 2.6.4-10 に示す。F9-KO マウスにおける PK プロファイルについては図 2.6.4-2 を、血友病 B イヌにおける PK プロファイルについては図 2.6.4-3 を、PK のための生体試料中薬物濃度分析法の概要については表 2.6.4-2 を参照のこと。

表 2.6.4-10　　F9-KO マウス、血友病 B イヌ及びミニブタにおけるノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®単回静脈内投与時の PK パラメータ

Species (Sex)	Dose	Assay	C_{max} (ng/mL)	CL (mL/h/kg)	Vz (mL/kg)	$t_{½}$ (h)
Nonacog beta pegol						
Mouse, F9-KO (M/F)	1.5 mg/kg	ELISA	15500	3.6	214	41
	1.5 mg/kg	Clot	9913	4.8	479	67
Haemophilia B dog (F)	0.4 mg/kg	Clot	6321	0.62	101	113
Minipig (M)	0.2 mg/kg	ELISA	1993	1.7	188	76
BeneFIX®						
Mouse, F9-KO (M/F)	1.5 mg/kg	ELISA	8777	36	873	17
	1.5 mg/kg	Clot	7044	50	401	5.5
Haemophilia B dog (F)	0.4 mg/kg	Clot	3434	13	329	18
Minipig (M)	0.2 mg/kg	ELISA	1850	12	260	16

FIX KO mouse: Study ID LEEH080102; Haemophilia B Dog: Study ID MIE080701; minipig: Study ID LEEH080502. M: male; F: female. Clot= one-stage clotting assay. The animals were dosed in mg/kg, for conversion to IU/kg the following conversions can be used: 1 mg nonacog beta pegol= 152 IU, 1 mg of BeneFIX® = ~ 240 IU.

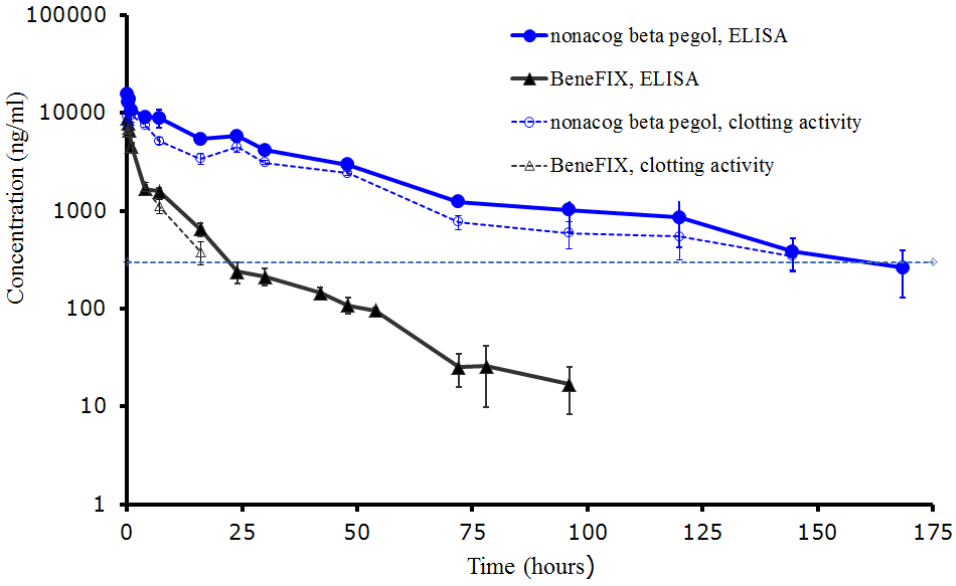


図 2.6.4-2　　F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の PK

PK profiles determined by ELISA (full lines) and clotting activity (dotted lines) after i.v. administration of 1.5 mg/kg of nonacog beta pegol (blue dots) or BeneFIX® (black triangles) to F9 KO mice. Data are shown as mean ± SD (n=3). One-stage clotting assay quantification limit of approx. 300 ng/ml, shown in figure as a horizontal dotted line

マウスでは、凝固一段法による LLOQ が高く、得られた値は ELISA で得られた値と異なる傾向があるため、この方法による PK パラメータの推定は困難であった。ELISA で推定された 41 時間というノナコグ ベータ ペゴルの $t_{1/2}$ は、別途実施した PK 試験（試験番号 LEEH130101、Module 2.6.4.9 参照）において確認された。この PK 試験では、抗原を測定する LOCI 及び活性を測定する発色性合成基質法により半減期は 38～45 時間と推定された。

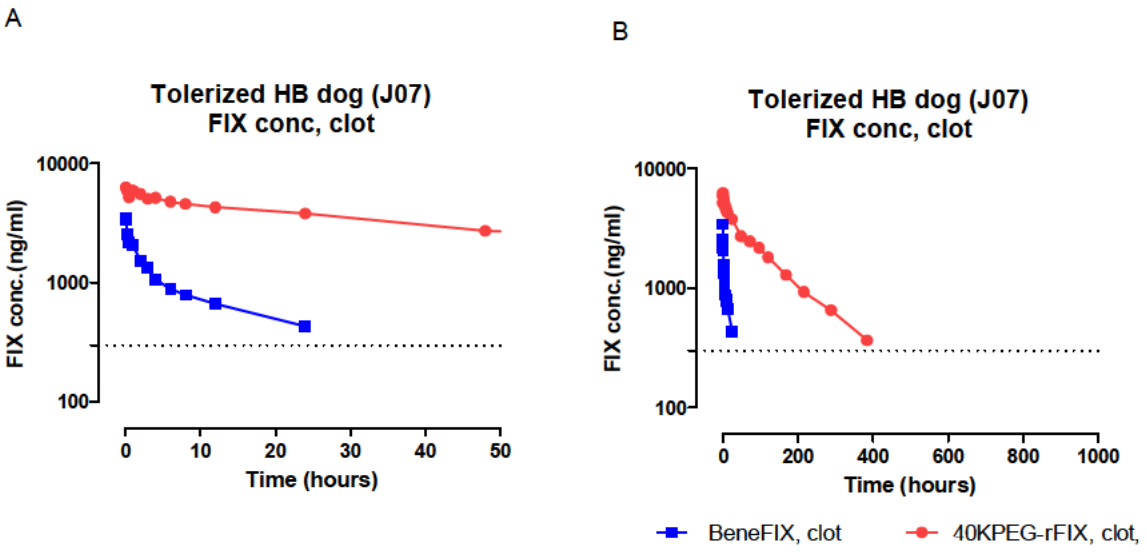


図 2.6.4-3　血友病 B イヌにおけるノナコグ ベータ ペゴル（40KPEG-rFIX、●）及び BeneFIX®（■）0.4 mg/kg 単回投与時の血漿中 FIX 濃度の経時推移

PK profiles determined by one-stage clotting assay. Assay quantification limit approx. 300 ng/ml, shown in figure as horizontal black dotted line; Panel A shows profile up to 50 hours and panel B up to 1000 hours.

2.6.4.4.2　Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける安全性試験を裏付けるノナコグ ベータ ペゴルの単回及び反復投与時の PK

Rowett ヌードラット（6 及び 26 週間投与）及びカニクイザル（4 及び 13 週間投与）における反復投与試験において PK を検討した。

2.6.4.4.2.1　Rowett ヌードラットにおける 6 週間投与 PK／免疫原性試験（Module 2.6.5.4.A、試験番号 212143）

免疫不全 Rowett ヌードラットにおける PK 及び免疫原性を評価するため、40 又は 1200 IU/kg の用量でノナコグ ベータ ペゴルを雌雄 Rowett ヌードラットに 6 週間投与した。初回及び 2 回目の投与を除き、被験動物には週 2 回投与した。単回投与時の完全な PK プロファイルを得る目的で、2 回目の投与は初

回投与の 1 週間後に投与した。トキシコキネティクス（TK）を算出するために、第 1 日及び第 6 週時に投与前及び投与後 168 時間までの血液試料を採取し、LOCI により測定した。雌雄ヌードラットにおいて、C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}168h)}$ は 2 用量間で用量依存性の増加が認められた。雌では用量比例性を上回る増加が、雄ではほぼ用量比例性の増加が認められた。$AUC_{(0\text{-}168h)}$ に基づいた累積率の実測値（Rac_{Obs}）は概略 1.8～2.3 であり、ある程度の累積が認められた。一貫した性差は認められなかったが、第 1 及び 6 週で、低用量群の C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}168h)}$ は雌の方が低く、逆に高用量群では、第 1 及び 6 週で、これらのパラメータは雌の方が高かった。$t_{1/2}$ は 27～38 時間であった。

2.6.4.4.2.2 Rowett ヌードラットにおける 26 週間投与時のノナコグ ベータ ペゴルの PK（Module 2.6.5.4.B、試験番号 212513）

4 種の用量（40、150、600 及び 1200 IU/kg）の静脈内投与による 26 週間反復投与毒性試験において、雌雄の免疫不全 Rowett ヌードラットにノナコグ ベータ ペゴルを 5 日に 1 回の頻度で投与した。TK を算出するために、第 1 日及び第 6 週時に投与前及び投与後 96 時間まで血液試料を採取し、LOCI にて測定した。さらに、曝露確認用に、第 4、8、12、16、20 及び 24 週時の投与後約 4 時間の血液試料を、雌雄動物から採取した。

雌雄の双方において、C_{max} 及び AUC_{last}（$AUC_{(0\text{-}96h)}$）は用量の増加とともに増加した。この増加は用量にほぼ比例していた。抗薬物抗体が形成されなかったことと一致して、反復投与時の曝露量の低下は認められなかった（反復投与時の PK プロファイルについては図 2.6.4-4 を参照のこと）。また、雌雄ともに、26 週間反復投与後に全身曝露量の軽微な累積が認められた（最大 1.4 倍）。C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}96h)}$ の雌雄比の平均は、それぞれ 1.01（0.823～1.19）及び 0.780（0.681～0.878）であった。概して曝露量（$AUC_{(0\text{-}96h)}$）は雌で低く、性差の可能性が示唆されたが、C_{max} に差は認められなかった。単回及び反復投与時の $t_{1/2}$ は、それぞれ 26～27 時間及び 12～39 時間であった。試験期間中の雄性動物における曝露量については図 2.6.4-5 を参照のこと。

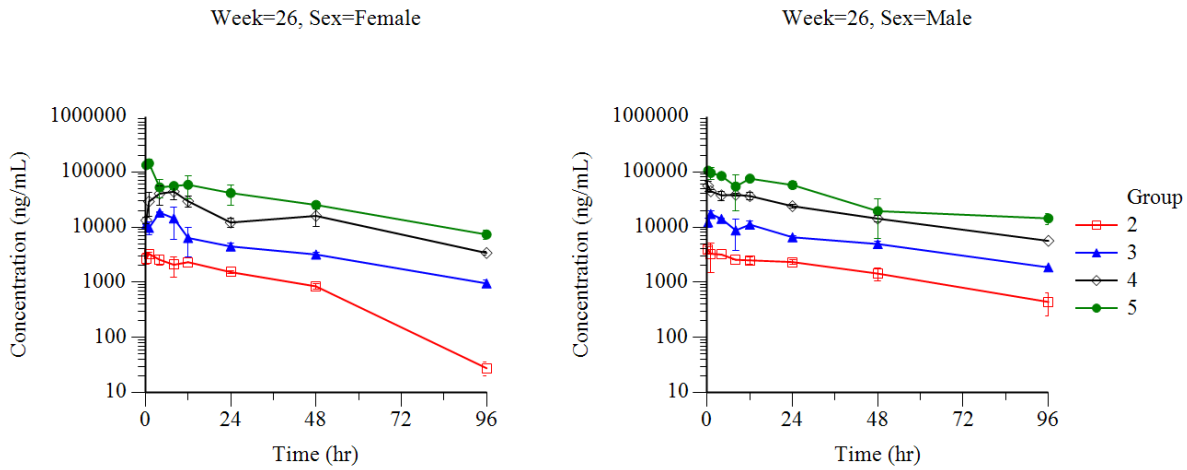


図 2.6.4-4　　Rowett ヌードラットにおけるノナコグ ベータ ペゴルの 5 日に 1 回静脈内投与時の第 26 週時のノナコグ ベータ ペゴル濃度 - 時間プロファイル（片対数）

Nonacog beta pegol was dosed every fifth day at 40 IU/kg (group 2), 150 (group 3), 600 (group 4) and 1200 (group 5) IU/kg (n=3/time-point, mean±SD); determined by LOCI. The vehicle control group was group 1, there was no exposure above LLOQ in this group and the group is not included in the figure.

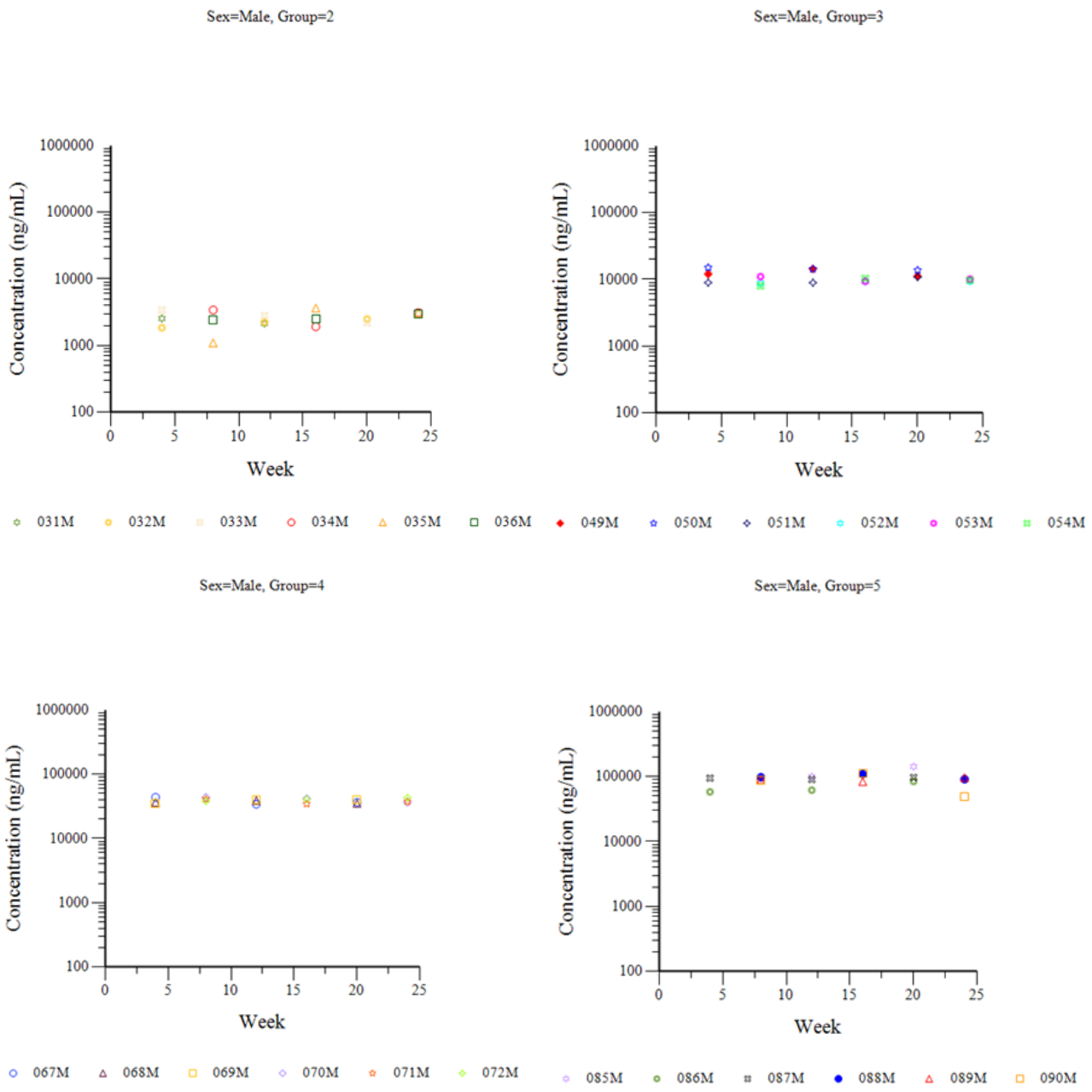


図 2.6.4-5　ノナコグ ベータ ペゴルの静脈内投与後 4 時間の試料で測定した、第 1 週から 26 週までの Rowett ヌードラットにおける 4 週ごとの血漿中濃度（片対数）

Nonacog beta pegol was dosed every fifth day at 40 IU/kg (group 2), 150 (group 3), 600 (group 4) and 1200 (group 5) IU/kg (n=3/time-point, sparse sampling; concentrations determined by LOCI; individual animal IDs in legend). The vehicle control group was group 1, there was no exposure above LLOQ in this group and the group is not included in the figure.

2.6.4.4.2.3　カニクイザルを用いた 4 週間反復投与毒性試験におけるノナコグ ベータ ペゴルの PK（Module 2.6.5.4.D、試験番号 208260）

4 週間反復投与毒性試験（試験番号 208260）において、ノナコグ ベータ ペゴルを 3 用量（350、1300 及び 3750 IU/kg）で週 1 回（第 1、8、15、22 及び 29 日）カニクイザルに静脈内投与した。PK 評価用（凝固一段法及び ELISA）の血漿試料を、第 1 日の投与前及び投与後 168 時間まで採取した。週ごとの試料も投与前（前週の投与後 168 時間）ならびに投与後 2 及び 24 時間に採取した。投与最終日（第 29 日）には、主試験群の動物では投与後 48 時間まで、回復群では投与後 168 時間まで採取し、さらに回復期間中に週 1 回試料を採取した。FIX 凝固活性データからベースライン値を減じて NCA を算出した。

すべての動物において、凝固一段法及び ELISA データから得られた $AUC_{(0\text{-}168h)}$は、用量に比例して増加した。動物は、試験期間中 LLOQ を上回るノナコグ ベータ ペゴルの全身曝露がみられた。第 1 日の $t_{1/2}$は、凝固活性のデータに基づけば 40～69 時間であり、一方、ELISA のデータに基づけば、166 時間と推定された 1 頭を除き、33～88 時間であった。概して、両測定法とも、個体別の $t_{1/2}$は反復投与後減少する傾向がみられた（第 22 日と第 1 日との比較）。図 2.6.4-6 に、ベースライン値を減ずる前の第 1 日と第 22 日の凝固一段法で測定した個別の PK プロファイルを示す。

第 29 日に、最終投与後 48 時間で主試験群の動物を安楽死させ、さらに後天性血友病の発現のため高用量群（3750 IU/kg）の動物 4 頭を試験終了前に安楽死させた。試験終了付近で、1300 IU/kg 投与群の動物 8 頭中 1 頭に後天性血友病が発現し、3750 IU/kg 投与群では 8 頭中 6 頭に後天性血友病が発現した。第 22 日と第 1 日の $AUC_{(0\text{-}168h)}$から累積率を求めた。累積率は、凝固一段法に基づけば 0.87～2.0 であり、ELISA に基づけば 1.1～3.2 であった。高用量群における ELISA 測定で変動が最も大きかった（1.6～3.2）。ELISA で測定した高用量群の累積率の変動が他より大きかった原因は、タンパク質の正常な CL を妨げる抗薬物抗体によるものと考えられた。

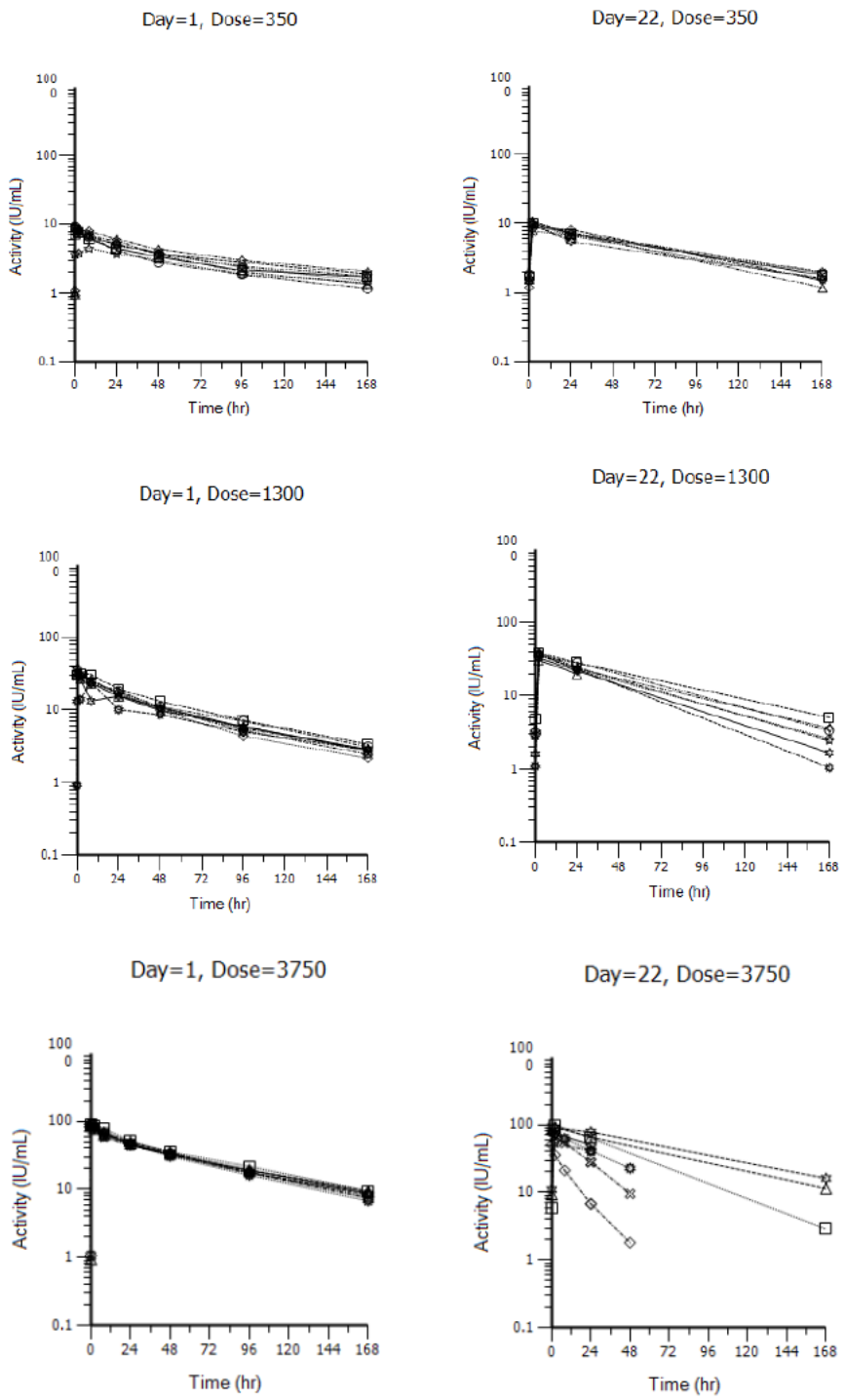


図 2.6.4-6　ノナコグ ベータ ペゴルを 350（上）、1300（中央）及び 3750 IU/kg（下）で単回投与時（第 1 日、左図）及び週 1 回反復投与時（第 22 日、右図）の個体別血漿中活性プロファイル（n = 8）

Main group animals (n=5) were sacrificed 48 hours after last dose on day 29, therefore the day 22 profiles are shown instead.

2.6.4.4.2.4　カニクイザルにおける 13 週間 PK／免疫原性試験（Module 2.6.5.4.C、試験番号 208405）

抗薬物抗体形成の経時変化を検討するため、雄性カニクイザルに 200 IU/kg のノナコグ ベータ ペゴルを週 1 回、13 週間静脈内投与した。本試験の目的はノナコグ ベータ ペゴルがどの程度の期間まで投与可能かを推定することであったため、投与に関連した後天性血友病の発現がみられた 4 週間反復投与毒性試験の結果に基づいて、低用量（200 IU/kg）群のみとした。最終投与後 5 週間の回復期間に抗体試料を採取した。PK 評価（凝固一段法）用の血漿試料を、第 1 日及び第 92 日の投与前及び投与後 168 時間まで採取した。また、週ごとに、投与後 2 時間及び 24 時間の試料を採取した。さらに、回復期間中に、すべての動物から週に 1 回試料を採取した。8 頭中 6 頭で中和抗体が形成し、中和抗体陽性を示した 6 頭中 4 頭で後天性血友病の徴候が認められた。

すべての動物において、第 22 日まで LLOQ を上回るノナコグ ベータ ペゴルの全身曝露が認められた。第 1 日の凝固活性に基づく $t_{1/2}$ は 42～127 時間であった。すべての動物で $t_{1/2}$ を正確に算出できたのは第 1 日のみであった。$t_{1/2}$ は経時的に減少すると考えられた。曝露は、4 回目の投与時までは維持されたが、個体間の変動がみられた。5 回目の投与以後、1 頭以上の動物で曝露が認められなかった。中和抗体陰性を示した動物 2 頭では、試験期間を通して全身曝露が確認された（図 2.6.4-7）。

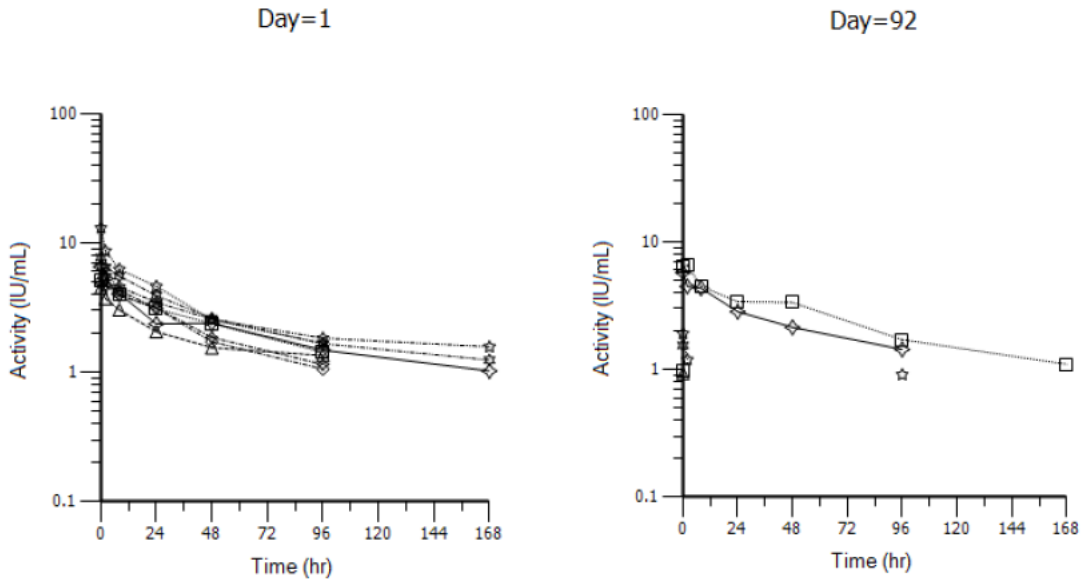


図 2.6.4-7　ノナコグ ベータ ペゴル 200 IU/kg の単回投与時（第 1 日、左図）及び週 1 回反復投与時（第 92 日／13 週、右図）の個体別血漿中活性プロファイル（n = 8）

2.6.4.4.3 PK の動物種間比較

表 2.6.4-11 に、ノナコグ ベータ ペゴルの単回投与時の PK パラメータを示す。単回投与時の CL／体重比の単純なアロメトリックスケーリングを図 2.6.4-8 に示す。表 2.6.4-13 に、重要な毒性試験で得られた反復投与時の曝露量パラメータを示し、第 3 相臨床試験における曝露量と比較した。表 2.6.4-13 において比較のため選択したパラメータは、C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}t)}$であり、表 2.6.4-14 には動物対ヒトの曝露量比を示す。

表 2.6.4-11 ノナコグ ベータ ペゴル単回静脈内投与時の PK パラメータの動物種間比較

Study	**Assay**	**CL (mL/h/kg)**	**Vz (mL/kg)**	**$t_{½}$ (h)**
Mouse (F9-KO) (M/F)	ELISA	3.6	214	41
LEEH080102	LOCI	4.4	267	42
LEEH130101	Chromogenic	4.3	246	39
Nude Rat (M)	LOCI	2.2	NR	26-27
212513				
Cynomolgus Monkey (M)	ELISA	1	90	33-166
208260	Clot	0.82	NR	40-69
Minipig (M)	ELISA	1.7	188	76
LEEH080502				
Dog, Haemophilia B (F)	Clot	0.62	101	113
MIE080701				
Human, Haemophilia B (M)	Clot	0.39-0.44	53	87-94
NN7999-3747				

NR: not reported. Clot: one-stage clotting assay. Chromogenic: two-stage chromogenic assay. Single dose clearance was not reported for rat and was calculated for this table and for interspecies scaling, from $CL=Dose/AUC_{(0\text{-}inf)}$ and a conversion factor of 152 IU/mg to convert $AUC_{(0\text{-}inf)}$ from ng*h/mL to IU*h/mL. For an overview of PK in human, see Module 2.7.2.

単回投与時のノナコグ ベータ ペゴルの CL／体重比の関係は動物種間でアロメトリックな関係にあった（図 2.6.4-8 参照）。これは、ノナコグ ベータ ペゴルの FIX タンパク質部分が主に血漿に分布していると仮定した場合に分子のタンパク質部分について予想されるものであり、スケーリングデータの基とした単回投与時の血漿 CL 値がタンパク質を測定する分析法を用いて得られたものであることによる。（PK 測定については表 2.6.4-2 を、体重データについては表 2.6.4-12 を参照のこと）。

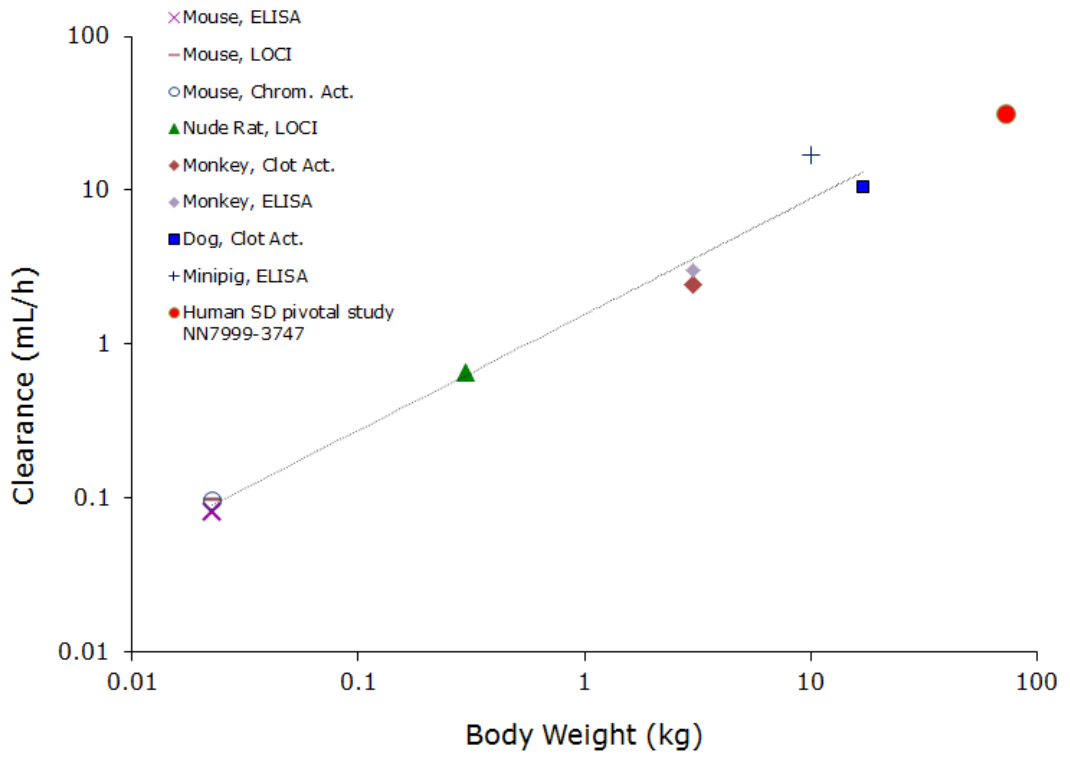


図 2.6.4-8　　ノナコグ ベータ ペゴルの CL（単回投与時）／体重比の単純アロメトリックスケーリング

表 2.6.4-12　　ノナコグ ベータ ペゴルの CL の動物種間スケーリングに用いた体重データ

Species	**Mean body weight (kg)**	**Age (Sex)**	**Study ID**
F9-KO mouse	0.023	20-21 weeks (M+F)	LEEH080102,
	0.023	16-20 weeks (M+F)	LEEH130101
Rowett nude rat	0.30	10-14 weeks (M)	212513
Cynomolgus monkey	3.0	67-141 weeks (M)	208260
Minipig	10	Ca. 22 weeks (M)	LEEH080502
Haemophilia B dog	17	NR (F)	MIE080701

NR: not reported.

表 2.6.4-13　　ヒト、ラット及びカニクイザルにおける反復静脈内投与時の定常状態でのノナコグ ベータ ペゴルの C_{max}、$AUC_{(0-t)}$及び $t_{1/2}$

Species	**Dose (IU/kg)**	**C_{max} (IU/mL)**	**$AUC_{(0-t)}$ (hr*IU/mL)**	**$t_{1/2}$ (hr)**
Human	10	NR	26.48	109
NN7999-3747	40	NR	93.19	112
Rat, Rowett Nude[1]	40	0.588	22.5	30
212513	150	2.61	81.5	39
26 week repeat dose (every fifth day dosing)	600	8.50	261	35
	1200	16.0	508	NR
Rat normalised to 40 IU/kg		0.60	20	
Monkey, cynomolgus	350[2]	8.83	517	31-60
208260	1300[2]	34.77	1850	20-45
4 week repeat dose (weekly dosing)	3750[2]	78.13	5895	8-64
	350[3]	9.42	483	26-279
	1300[3]	35.17	2221	24-219
	3750[3]	95.59	6985	19-72
Monkey normalised to 40 IU/kg (Day 22)		0.97	60	

NR: not reported. **Assay:** Human and monkey: one-stage clotting assay, rat: LOCI. **1**: Rat data were converted for this table from ng/mL to IU/mL by using a conversion factor of 152 IU/mg. **2**: Day 22, n=3-7. **3**: Day 29, n=1-4. $AUC_{(0-t)}$: $AUC_{(0-96hr)}$ for rat, and $AUC_{(0-168hr)}$ for monkey and human NN7999-3747. Dosing interval: 0-120 hours for rat (but last sample taken at 96 hours) and 0-168 hours for monkey and human.

表 2.6.4-14　　動物とヒトの曝露量比（40 IU/kg 投与時の $AUC_{(0-t)}$及び 100 IU/kg 投与時の C_{max}）

Species	**Sex**	**Dose (IU/kg)**	**Phase**	**C_{max} Ratio[1]**	**$AUC_{(0-t)}$ Ratio[2]**
Rat, Rowett Nude	M	40	SS	0.46	0.24
212513	M	150	SS	2.0	0.87
26 week repeat dose	M	600	SS	6.6	2.8
(every fifth day dosing)	M	1200 (NOAEL)	SS	12	5.4
Monkey, cynomolgus	M	350	SS[3]	6.9	5.5
208260	M	1300 (NOAEL)	SS[3]	27	20
4 week repeat dose	M	3750	SS[3]	61	63
(weekly dosing)	M	350	SS[4]	7.4	5.2
	M	1300	SS[4]	27	24
	M	3750	SS[4]	75	75

SS: steady state. M: male. Values represent ratios between animals and patients, based on data shown in 表 2.6.4-13. **1**: C_{max} exposure ratios are calculated by dividing C_{max} in animals by C_{max} determined at dose level 100 IU/kg in the clinical phase 1 trial, NN7999-3639 i.e. 1.28 IU/mL. C_{max} was not determined in the phase 3 trial, NN7999-3747. **2**: $AUC_{(0-t)}$ exposure ratios are calculated by dividing $AUC_{(0-t)}$ in animals by AUC_{0-t} in the clinical trial NN7999-3747 at 40 IU/kg i.e. 93.19 (hr*IU)/mL. **3**: SS day 22, n=3-7. **4:** SS day 29, n=1-4**.** AUC_{0-t}: $AUC_{(0-168hr)}$ for monkey and human, and $AUC_{(0-96hr)}$ for rat. Dosing interval: 0-120 hours for rat (but last sample taken at 96 hours) and 0-168 hours for monkey and human.

$AUC_{(0\text{-}t)}$は、40 IU/kg という定期補充療法時の推奨臨床用量と比較して、ラットの最高用量で 5 倍、サルの最高用量では最大 75 倍高かった。データは、ラットを除き（IU/mL に換算された LOCI、1 mg =152 IU）、凝固一段法によるデータに基づく。

図 2.6.4-9 において、ノナコグ ベータ ペゴル反復静脈内投与時の曝露量（$AUC_{(0\text{-}t)}$）の対用量関係を重要な非臨床試験と第 3 相臨床試験とで比較する。

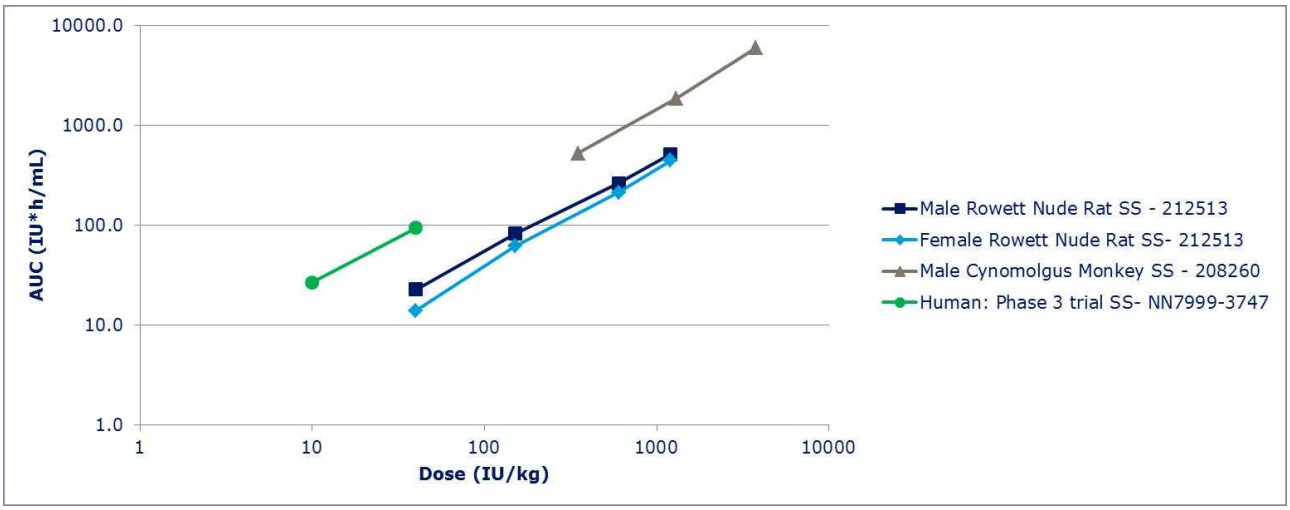


図 2.6.4-9　　ラット、サル及びヒト血友病 B 患者におけるノナコグ ベータ ペゴルの定常状態での静脈内投与用量と $AUC_{(0\text{-}t)}$の関係

Dosing interval (tau): 0-120 hours for rat (but last sample taken at 96 hours) and 0 -168 hours for monkey and human. For human and monkey, AUC_{tau} is shown, except for rat where $AUC_{(0\text{-}96h)}$ is shown. Data are one-stage clotting activity data except for rat (LOCI converted to IU/mL). Monkey data are from Day 22.

2.6.4.4.4　　分布、排泄及び代謝試験での放射能標識トレーサー

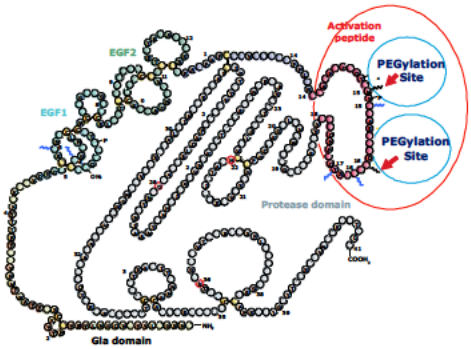
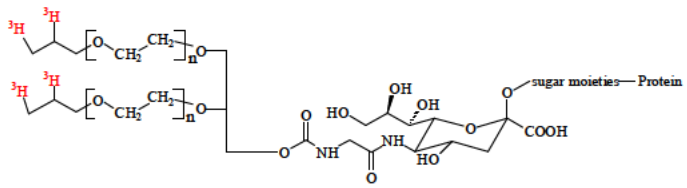
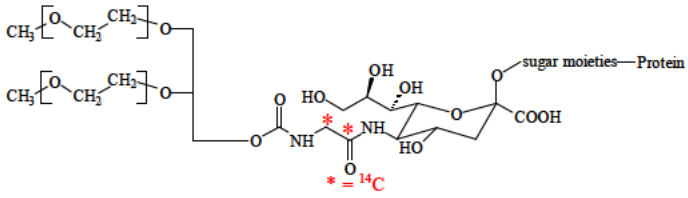
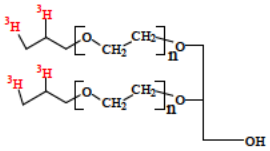
ノナコグ ベータ ペゴルの分布、排泄及び代謝試験を、ノナコグ ベータ ペゴル分子のタンパク質部分（活性化ペプチド）のトリチウム（^{3}H）標識体（[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴル）、PEG 部分の ^{3}H 標識体（[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル）及び PEG とタンパク質部分のリンカー（グリシン）の炭素 14（^{14}C）標識体（[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴル）の 3 種類の放射能標識トレーサーを用いて実施した。比較のため、^{3}H で標識した 40 kDa PEG の代謝試験も行った（図 2.6.4-1 に示す放射能標識トレーサー及び表 2.6.4-16 に示す詳細を参照のこと）。

放射能標識トレーサーを用いて行われた試験で投与された用量は、mg タンパク質/kg ではなく、mg 全分子/kg に基づいた。適用した換算係数を表 2.6.4-15 に示す。IU の推定には、1 mg = 150 IU を用いた。

表 2.6.4-15　　放射能標識トレーサーを用いた試験における換算に用いた分子量

Molecule	Molecular weight (average)
Full molecule (nonacog beta pegol)	98 kDa
Protein with sugar moieties	55.5 kDa
PEG	40 kDa

表 2.6.4-16　　代謝試験に用いたノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG 放射能標識トレーサーの詳細

Compound	Structure & labelling position
[^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol	 A tritiated sialic acid moiety was incorporated in the activation peptide on one of the two possible PEGylation sites not taken up by the PEG moiety.
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	 Tritium incorporated into the end of the PEG moiety of nonacog beta pegol
[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol	 Carbon 14 incorporated into the glycine-linker (via a carbamate bond to PEG) between the PEG moiety and rFIX with and PEG of nonacog beta pegol sialic acid.
[^{3}H-PEG]	 Tritium incorporated into to the end of the PEG moiety of 40 kDa PEG alone

被験物質中への ^{3}H 又は ^{14}C の導入は、被験物質の分布及び代謝にほとんど影響を及ぼさないことが一般に認められている。したがって、^{3}H 又は ^{14}C 標識ノナコグ ベータ ペゴルの使用は、分布及び代謝試験に妥当であると考えられるものの、PEG を[^{3}H]で標識したノナコグ ベータ ペゴルの *in vivo* 安定性ならびに *in vivo* 活性を検討した。^{3}H トレーサーの血漿中での *in vivo* 安定性を、生成したトリチウム水（$^{3}H_2O$）の量を特性マーカーとして用いて、投与後 12 週まで経時的にモニターした。実際には、血漿試料の凍結乾燥前後の総放射能量を測定した。試験期間を通して、血漿中にトリチウム水はほとんど検出されなかったため、トレーサーは安定であり、使用目的に適していると認められ、[^{3}H]標識ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG の生体内運命に関する有意義な評価が可能であると考えられた。さらに、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは、ノナコグ ベータ ペゴルの標準品と比べて 72.6±2.4%の活性を示し、この放射能標識トレーサーはほぼ完全な *in vitro* FIX 活性を保持していることを示している（探索的データ）。

PEG を放射能標識したトレーサー（[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{3}H-PEG]）は、*O*-メチル化非標識ノナコグ ベータ ペゴルとは異なり、*O*-プロピル化に留意する必要がある。この改変により、PEG に最大 4 個までのトリチウム原子の導入が可能である。この改変による分子量の増加は、全分子の分子量と比べてごくわずかである（40.000 Da PEG への約 64 Da の追加）。

2.6.4.4.5 総放射能の結果に基づく推定 PK パラメータ

雄性 F9-KO マウス又はラットに静脈内投与された放射能標識トレーサー（[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴル、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル、[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴル又は[^{3}H-PEG]）について、経時的に測定した血漿中総放射能に基づく、終末相 $t_{1/2}$、分布容積（V_{ss}）及び CL の推定を行った。[^{3}H-activation peptide]]-ノナコグ ベータ ペゴルでは 2 週間まで、その他のトレーサーの試験では 12 週間まで血漿試料を採取し、液体シンチレーション計数法（LSC）によって総放射能濃度を測定した。すべての PK パラメータを、標準的な NCA を用いて推定した（推定パラメータの概要については表 2.6.4-17 及び表 2.6.4-18 を参照のこと）。

2.6.4.4.5.1 総放射能及び[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーの F9-KO マウスにおける PK パラメータ（Module 2.6.5.3.D、試験番号 213393）

2 種類の放射能標識トレーサーを雄性 F9-KO マウスに静脈内投与した（表 2.6.4-17 の概要参照）。活性化ペプチドを放射能標識した[^{3}H-activation peptide]ノナコグ ベータ ペゴルの濃度 - 時間プロファイルは 1 相性の消失パターンを示した。総放射能データに基づいて推定した終末相血漿中 $t_{1/2}$ は 60 時間であった。このプロファイル及び推定 $t_{1/2}$ は、ELISA 及び凝固活性による生体内試料中濃度測定法を用いて、非標識体で実施した以前の試験結果と同様であった（表 2.6.4-10）。この $t_{1/2}$ は、PEG 部分を放射能標識した[^{3}H-PEG]ノナコグ ベータ ペゴルで観察された $t_{1/2}$（28～31 日）よりもかなり短い。[^{3}H-

activation peptide]トレーサーを用いた場合の結果は、主にタンパク質部分の生体内運命／CL に関連することが示唆される。これは、図 2.6.4-10 で示されるような投与後 2～3 週間の遅い時点から始まる PEG の生体内運命に関連すると考えられる[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーの結果とは異なる。放射能の CL は、PEG を標識したトレーサー（[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル）よりも、活性化ペプチドを標識したトレーサー（[^{3}H-activation peptide]ノナコグ ベータ ペゴル）の方が高いことが示された。V_{ss} は、活性化ペプチドを標識したトレーサーよりも PEG 部分を標識したトレーサーの方が大きかった。V_{ss} から、放射能が血漿及び末梢に分布したことが示された。

表 2.6.4-17　　F9-KO マウスに投与された各種 ^{3}H 標識ノナコグ ベータ ペゴル関連放射能の推定血漿中 PK パラメータの概要

Study ID	Compound	Dose (nonacog beta pegol & corresponding PEG-load)	Assay	$t_{½}$ days	V_{ss} (ml/kg)	CL (ml/h/kg)
210169	[^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol	2.2 mg/kg ~ 0.9 mg/kg PEG	LSC	2.5	239	2.49
212160	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	2.8 mg/kg ~ 1.2 mg/kg PEG	LSC	28	596	1.36
212166	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	2.8 mg/kg ~ 1.2 mg/kg PEG	LSC	31	592	1.41

LSC = liquid Scintillation counting

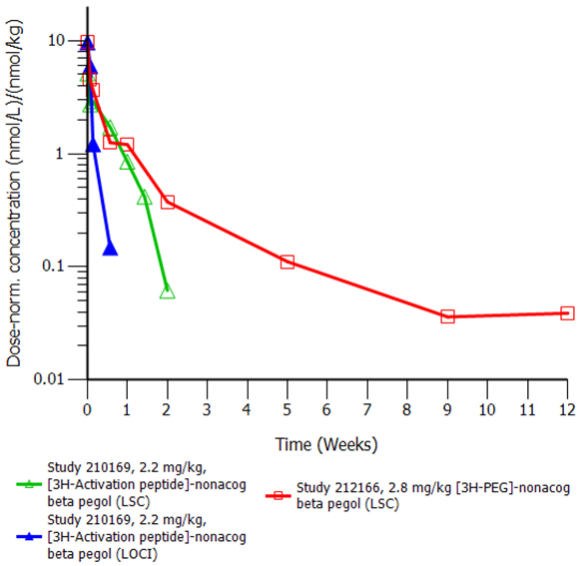


図 2.6.4-10　　2 種のトレーサー及び検出法を用いた F9-KO マウスにおけるノナコグ ベータ ペゴル濃度 - 時間プロファイル

Concentration of nonacog beta pegol determined by LOCI (blue line), total radioactivity determined by LSC (liquid scintillation counting) of [^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol (green line) and [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol (red line). The graphs show that when the radio label is placed in the

activation peptide (green) it primary resemble the fate of the protein part (blue), and when the radio label is placed in the PEG moiety if follows the fate of PEG (red).

2.6.4.4.5.2 [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーの総放射能に基づいたラットにおける PK パラメータ（Module 2.6.5.3.D、試験番号 213393）

ノナコグ ベータ ペゴルの 2 種の放射能標識トレーサーをラットに静脈内投与した（表 2.6.4-18 の概要参照）。[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは PEG 部分を標識し（試験番号 214076 及び 214077）、一方、[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルはリンカーを標識した（試験番号 213466）。各トレーサーの静脈内ボーラス投与後、放射能標識ノナコグ ベータ ペゴルの血漿中放射能濃度 - 時間プロファイルは、速やかな初期相（$t_{1/2}$ 約 2～3 日）及び緩徐な終末相（$t_{1/2}$ 約 15～18 日）からなる、2 相性の消失パターンを示した。各種の推定 PK パラメータは両トレーサーで類似したことから、リンカー（グリシン）はタンパク質部分の分解後も PEG 部分に結合していることが示された。

さらに、放射能標識ノナコグ ベータ ペゴルの血漿中濃度を、タンパク質の生体内運命を追跡する LOCI（FIX 抗原）で評価した。LOCI によるデータは、両トレーサーについて同様の PK を示し、推定 $t_{1/2}$ は[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルで 1.7 日（41 時間）、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルで 1.4 日（34 時間）であった（図 2.6.4-11、青線）。

表 2.6.4-18 ラットに投与された各種の放射能標識ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG に関連する放射能の推定血漿中 PK パラメータの概要

Study ID	Compound	Dose (nonacog beta pegol and/or PEG)	Assay	$t_{1/2}$ days	V_{ss} (ml/kg)	CL (ml/h/kg)
213466	[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol	0.30 mg/kg ~0.12 mg/kg PEG[a]	LSC	18	157	0.68
214076	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	1.5mg/kg, ~ 0.6 mg/kg PEG	LSC	15	249	1.1
214077	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	1.5mg/kg, ~ 0.6 mg/kg PEG[b]	LSC	16	200	0.82
212213	40 kDa [^{3}H-PEG]	0.6 mg/kg PEG	LSC	19	510	1.9
212115	40 kDa [^{3}H-PEG]	1 mg/kg	LSC	24	450	1.1
		12 mg/kg	LSC	26	420	0.84
		100 mg/kg	LSC	59	940	0.78
		200 mg/kg	LSC	42	750	0.88

LSC = liquid Scintillation counting
[a] $t_{1/2}$ estimated based on LOCI measurements: 1.7days
[b] $t_{1/2}$ estimated based on LOCI measurements: 1.4 days

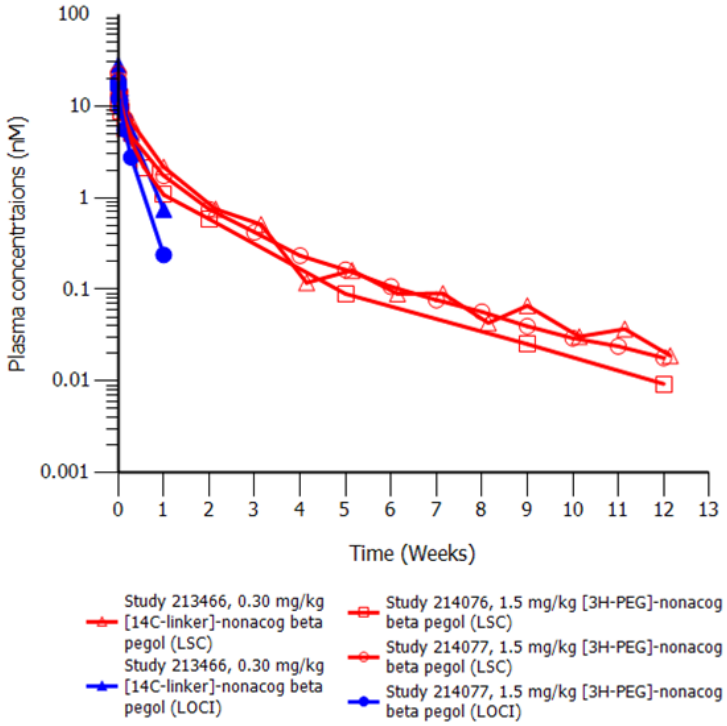


図 2.6.4-11　　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴル静脈内投与時の濃度 - 時間プロファイル（片対数）

Total radioactivity determined by LSC (liquid scintillation counting) of [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol and [^{14}C-linker]-nonacog beta pegol. The graphs show that when the radio label is placed in the PEG moiety (red squares and circles) or in the linker part (red triangle) it if follows the biphasic elimination pattern of PEG, whereas concentrations of nonacog beta pegol determined by LOCI follow the monophasic pattern of the protein (blue triangles and circles).

2.6.4.4.5.3　　ラットにおける [^{3}H-PEG]トレーサーの総放射能に基づく PK パラメータ（Module 2.6.5.3.E、試験番号 213395）

ラットに異なる用量の放射能標識 40 kDa PEG（[^{3}H-PEG]）を投与する試験を実施し、漸増用量での PK を検討した。5 用量の[^{3}H-PEG]で得られたデータ比較（試験番号 212213 及び 212115）から、用量の増加に伴って CL は減少し、V_{ss} は増加した。用量の増加に伴う V_{ss} の増加は、血漿コンパートメント外へ分布する被験物質の割合が増加したことを示している。終末相 $t_{1/2}$ も高用量でより長く、用量依存的であると考えられた。

PEG として同等の用量（PEG として 0.6 mg/kg）での[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{3}H-PEG]の終末相 $t_{1/2}$ は類似しており（[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルで 16 日、[^{3}H-PEG]で 19 日）、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを用いて得られた結果は PEG 部分の生体内運命（血漿からの CL）であることを示している。

2.6.4.5 分布

ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG を用いて組織分布試験［定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）］を実施した。2 種類のトリチウムトレーサー、すなわちノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質（活性化ペプチド）の標識体（[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴル）及び PEG 部分の標識体（[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル）を用いた。分布試験のうち、2 試験で雄性 F9-KO マウスを用い、ノナコグ ベータ ペゴルを用いた 1 試験及び 40 kDa PEG 単体を用いた 1 試験で雄性ラットを用いた（表 2.6.4-19）。

表 2.6.4-19　　ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の組織分布試験の概要

Technique	Study ID	Compound	Species
QWBA	210169	[^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol	F9-KO mice
QWBA	212166	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	F9-KO mice
QWBA	214076	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Han Wistar rats
QWBA	212213	40 kDa [^{3}H-PEG]	Han Wistar rats

QWBA = Quantitative Whole Body Autoradiography

2.6.4.5.1 マウスにおける[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルの組織分布（Module 2.6.5.5.A、試験番号 210169）及び選択した組織の免疫組織化学的分析（Module 2.6.5.8、試験番号 210167）

活性化ペプチドを放射能標識した[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルを用い、2.2 mg/kg（約 1.2 mg タンパク質/kg 約 187 IU/kg、PEG としての投与量：0.9 mg/kg）の用量で単回静脈内投与後の組織分布試験（QWBA、210169）を実施した。投与後 1、12、24、96、168、240 及び 336 時間で、それぞれマウス 1 匹を安楽死させ、切片を作製した。

全体として、[^{3}H-activation peptide]-ノナコグ ベータ ペゴルは速やかに分布し、大部分の組織において最高濃度は投与後 1 時間以内に認められた。組織中放射能濃度は一般に全血中濃度よりも低かった。すべての時点で、全血中濃度は血漿中濃度よりも高く（2～5 倍）、血中成分との相互作用が示唆されるものの、この所見の生物学的意義は不明である。最高濃度が認められた組織は肝臓（投与後 1 時間で 17.9 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）及び副腎皮質（投与後 1 時間で 15.1 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）で、全血中濃度（投与後 1 時間で 19.0 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）と同程度の濃度であった。一方、脾臓、腎皮質、副腎髄質、骨髄、歯髄及び腎髄質中濃度は、血漿中濃度（投与後 1 時間で 6.13 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）と比較し、同程度又は僅かに高かった。組織中放射能濃度は、最終時点（投与後 336 時間）まで全血中濃度及び血漿中濃度と並行して減少した。最終時点でも、大部分の組織において、濃度は低いものの検出可能なレベルの放射能が認められた。CNS における濃度は、一般に試験期間を通して低かった（脳中の濃度は、投与後 1 時間で 0.131 µg ノナコグ ベータ ペ

ゴル当量/g であり、投与後 336 時間では、0.054 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g まで減少した）。脈絡叢中の濃度（5.68 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）は、投与後 1 時間では血漿中濃度と同程度であったが、経時的に減少し、最終時点（投与後 336 時間）では 0.129 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g であった。組織中の LLOQ は 0.052 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g であった。

投与後 1、24 及び 168 時間で、2 匹のマウスから選択して得られた組織（肝臓、腎臓、脈絡叢を含む脳、ならびに精巣上体を含む精巣）について、免疫組織化学的（IHC）染色法を用いて検討した（試験番号 210167）。組織を固定し、rFIX 及び PEG に対する蛍光抗体で染色した。両染色に関して、投与後 1 時間で最高強度が認められ、強度は経時的に減少したが、投与後 168 時間においても明瞭に認められた。蛍光は検査した臓器の血管に認められた。rFIX 及び PEG に対する抗体を用いた組織中の蛍光の共局在化は、検討した最終時点（168 時間）での染色強度は弱かったものの、この時点まで未変化のノナコグ ベータ ペゴルが存在することが示された。

2.6.4.5.2 F9-KO マウスにおける PEG 部分を放射能標識した[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの組織分布（Module 2.6.5.5.B、試験番号 212166）

PEG 部分を[^{3}H]標識したノナコグ ベータ ペゴル［ノナコグベータペゴルとして 2.8 mg/kg（約 1.6 mg タンパク質/kg 又は約 238 IU/kg）、PEG 用量、約 1.2 mg/kg］を単回静脈内投与した F9-KO マウスにおいて、QWBA を実施した。投与後 12 週まで、投与後 1、12、24、96 時間ならびに 1、2、5、9 及び 12 週で 1 時点あたり 1 匹のマウスを安楽死させた。放射能は広範囲に分布した。検討したすべての組織で放射能の最高濃度は 24 時間又はそれ以前に認められたことから、組織中の放射能は投与後 24 時間までに最高濃度に達すると考えられた。血漿の他に、膀胱、血液、肝臓、副腎、腎臓及び脾臓において、高濃度の放射能（>8.0 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）が投与後 24 時間までの時点で認められた。CNS（脳及び脊髄）中の薬物関連物質（放射能）濃度は、最終採取時点まで低かった。脳では、投与後 1 時間で 0.265 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g で、336 時間では 0.044 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g まで減少し、以降は LLOQ 未満であった。脊髄では、投与後 1 時間で 0.334 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g であり、投与後 336 時間では 0.042 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g まで減少した。脈絡叢では、投与後 1 週で 0.533 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g であり、投与後 12 週では 0.126 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g まで減少した。大部分（およそ 80%）の組織では、最終サンプリング時点（投与後 12 週）においても放射能は定量可能であり、リンパ液、下顎リンパ節、唾液腺、ブドウ膜/網膜、尿道球腺、ハーダー腺、膵臓、眼窩外涙腺、眼窩内涙腺、下垂体及び食道壁に最も高い濃度（>0.400 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）の放射能が存在した。なお、組織中の LLOQ は約 0.040 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g であった。

一般に、放射能濃度は全血よりも血漿で高く、ノナコグ ベータ ペゴルは血球成分よりも血漿に多く分布することが示唆される。

選択した 3 時点（1、24 及び 96 時間）で、選択した組織（肝臓、腎臓、脾臓、脳、精巣、心臓、副腎及び骨髄）への顕微鏡レベルでの分布を評価するため、ミクロオートラジオグラフィも実施した。全体として、ミクロオートラジオグラフィによって、同一組織における放射能を検出する QWBA の結果が確認され、さらに、肝細胞、クッパー細胞及び脈絡叢上皮細胞への放射能の取り込みも認められた。脳脊髄液では、バックグラウンドレベルの低濃度の放射能が検出された。

2.6.4.5.3 PEG を放射能標識した[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルのラットにおける組織分布（Module 2.6.5.5.C、試験番号 214076）

PEG 部分を[^{3}H]標識したノナコグ ベータ ペゴルの QWBA をラットでも実施した。1.5 mg/kg のノナコグ ベータ ペゴル〔（約 0.9 mg タンパク質/kg 又は約 127 IU/kg）、PEG 用量、約 0.6 mg/kg〕を単回静脈内投与した。投与後 12 週まで、投与後 1、12、24、96 時間ならびに 1、2、5、9 及び 12 週に 1 時点あたり 1 匹のラットを安楽死させた。PEG 関連放射能は広範囲に分布し、放射能は血流量の多い組織で最も高く、CNS（脳及び脊髄）で最も低かった。

概して、組織における放射能濃度は試験期間を通して緩徐に低下した。投与後 24 時間までの測定時点では、ほとんどの場合、膀胱（内容物）、血液、血漿、胆管、肝臓、尿道球腺、副腎及び肺で最も高い測定値（>5.0 µg ～18.5 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）が認められた。以降の測定時点では、リンパ液で最も高い濃度が認められた。脳では、投与後 1 時間で 0.276 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g、336 時間では 0.053 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g まで減少し、336 時間以降は LLOQ 未満であった。脊髄では、投与後 1 時間で 0.159 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g、336 時間では 0.065 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g まで減少した。すべての時点で、脈絡叢で低濃度の放射能（1.14 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g 以下）が検出された。検討した組織の約半数では最終測定時点（投与後 12 週）においても放射能が検出され、これらのうち、松果体、歯髄、副腎皮質、眼窩外涙腺及び膵臓に最も高い濃度（> 0.300 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g）が認められた。組織中の LLOQ は 0.049 µg ノナコグ ベータ ペゴル当量/g であった。対応するサンプリング時点での血漿中放射能濃度は、一般に全血中濃度よりも高かった。この結果は、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは血球成分よりも血漿により多く分布することが示唆される。選択した組織の濃度－時間プロファイルについては図 2.6.4-17 を参照のこと。

選択した 3 時点（1、24 及び 96 時間）で、選択した組織（肝臓、腎臓、脾臓、脳、精巣、心臓、副腎及び骨髄）への顕微鏡レベルでの分布を評価するため、ミクロオートラジオグラフィを実施した。

全体として、ミクロオートラジオグラフィにより、同一の組織における放射能を検出した QWBA の結果が確認され、さらに、肝細胞、クッパー細胞及び脈絡叢上皮細胞への放射能の取り込みも認められた。脳脊髄液中では、バックグラウンドレベルの低濃度の放射能が検出された。

2.6.4.5.4 ラットにおける 40 kDa [^{3}H-PEG]の組織分布（Module 2.6.5.5.D、試験番号 212213）

比較のために、40 kDa PEG の組織分布も検討した。ラットに 0.6 mg/kg の用量で [^{3}H-PEG]を静脈内投与した。投与後 12 週まで、投与後 1、12、24 及び 96 時間ならびに 1、2、5、9 及び 12 週で 1 時点あたり 1 匹のラットを安楽死させた。PEG 関連放射能は広範囲に分布し、濃度は血流量の多い組織で最も高く、CNS（脳及び脊髄）で最も低かった。放射能の最高濃度は、概して 1 又は 12 時間の測定時点で認められ、検討した組織の大部分では、これらの時点で放射能の最高濃度が認められた。その他の組織では投与後 96 時間で最高濃度に達し、下顎リンパ節では投与後 5 週間で最高濃度に達した。一般に、組織中放射能濃度は試験期間を通して減少し、最終測定時点（投与後 12 週）では、30%の組織でのみ定量可能であった。投与後 1 及び 12 時間で、最も高い放射能濃度（>1.0 µg PEG 当量/g）は概して膀胱（内容物及び壁）、血液、血漿、肺、胆管、歯根膜、腎臓（皮質及び髄質）、副腎（皮質及び髄質）及び肝臓に認められた。12 時間以降では、リンパ液に高濃度の放射能が認められた。概して、脳、白色脂肪、脊髄、筋肉、精嚢、目の水晶体及び皮毛における放射能は低かった（<0.1 µg PEG 当量/g）。脳では、投与後 1 時間で 0.043 µg PEG 当量/g、12 時間では 0.031 µg PEG 当量/g まで減少し、以降は LLOQ 未満であった。脊髄では、投与後 1 時間で 0.036 µg PEG 当量/g、12 時間では 0.024 µg PEG 当量/g まで減少し、以降は LLOQ 未満であった。脈絡叢では、すべての時点で≤ 0.379 µg PEG 当量/g であった。組織中の LLOQ は 0.017 µg PEG 当量/g であった。選択した組織の濃度 - 時間プロファイルについては図 2.6.4-18 を参照のこと。

一般に、試験期間の大部分を通して血漿中放射能が全血中放射能より高く、放射能は赤血球にはほとんど結合しないことが示唆された。

選択された 3 時点（1、24 及び 96 時間）で、選択した組織（肝臓、腎臓、脾臓、脳、精巣、心臓、副腎及び骨髄）の顕微鏡レベルでのミクロオートラジオグラフィを実施した。全体的に、ミクロオートラジオグラフィによって、同一組織における放射能を検出した QWBA の結果が確認され、さらに、肝細胞、クッパー細胞及び脈絡叢上皮細胞への放射能の取り込みも認められた。脳脊髄液に低濃度の放射能が検出された。

2.6.4.6 代謝

体内を循環している又は経時的に排泄される放射性成分を評価するため、F9-KO マウス及びラットにおける試験から選択した血漿、尿及び糞試料中の放射性代謝物プロファイルを、HPLC 及びゲル電気泳動によって分析した。

2.6.4.6.1 *In vivo* 代謝 - [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを投与した F9-KO マウスの血漿、尿及び糞中代謝物プロファイル（Module 2.6.5.9.A、試験番号 214438 及び Module 2.6.5.9.B、試験番号 214456）

マウスから得られたデータで、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは経時的に 40 kDa 以下の PEG に分解されることが明らかとなった（図 2.6.4-12）。HPLC（試験番号 214438）及びゲル電気泳動（試験番号 214456）による評価結果から、同一の概括的結論が得られた。40 kDa 以下の PEG は尿及び糞中に排泄されることが認められた。血漿中ではトリチウム水は検出されないかごく少量であり、一方、尿及び糞中ではトリチウム水は経時的に増加した。この結果から、トレーサーは、循環血中では安定であり、腎臓及び肝臓もしくは尿糞中で分解されると考えられる。

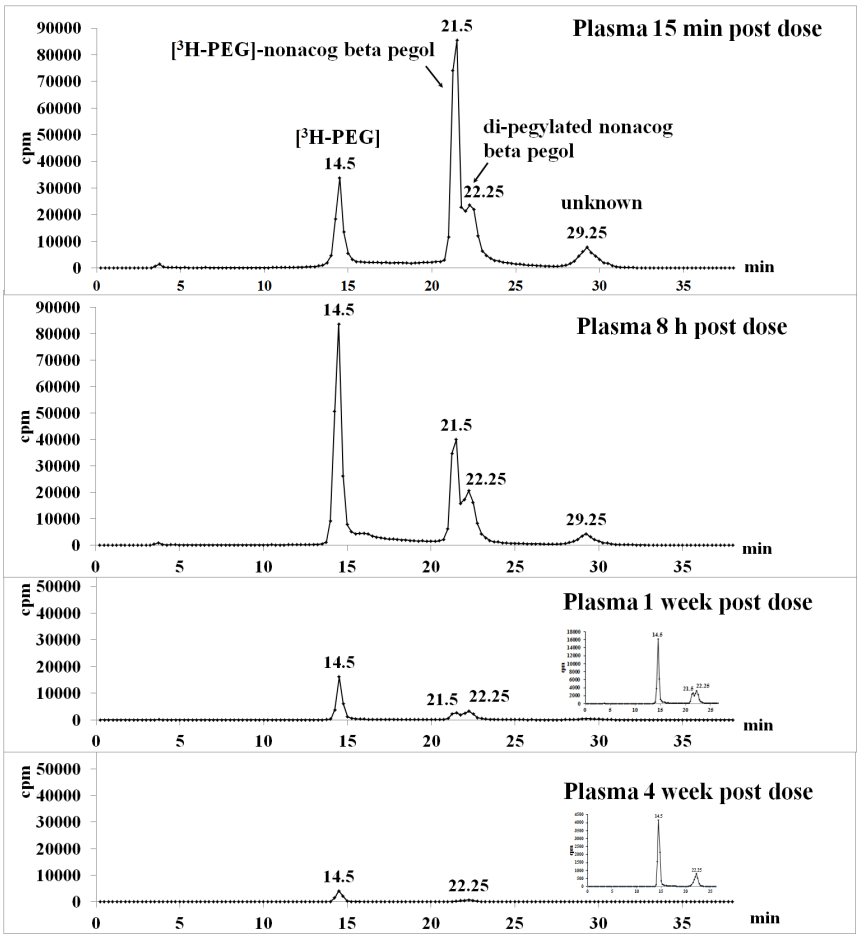


図 2.6.4-12　F9-KO マウスにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの経時的な *in vivo* 血漿中代謝物プロファイル

Plasma profiles 15 min, 8 hours, 1 week and 4 weeks after a single bolus i.v. administration of 2.8 mg/kg [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol (~PEG-dose: 1.2 mg/kg) to F9-KO mice (HPLC data, Module 2.6.5.9.A, 214438). The relative high amount of [^{3}H-PEG] present in the first plasma sample was likely due to a combination of an impure dosing formulation and *in vivo* degradation of [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol.

2.6.4.6.2　*In vivo* 代謝 - [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを投与したラットの尿及び糞中代謝物プロファイル（Module 2.6.5.9.C、試験番号 215080 及び Module 2.6.5.9.D、試験番号 215081）

HPLC（試験番号 215080）及びゲル電気泳動（試験番号 215081）によるラットでの *in vivo* 代謝の評価から、マウスと同様の概括的結論が得られた。[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは血漿中で 40 kDa PEG に分解され（図 2.6.4-13）、さらに腎臓及び肝臓あるいは尿糞中でより小さな PEG に分解される（図 2.6.4-14）ことが示された。

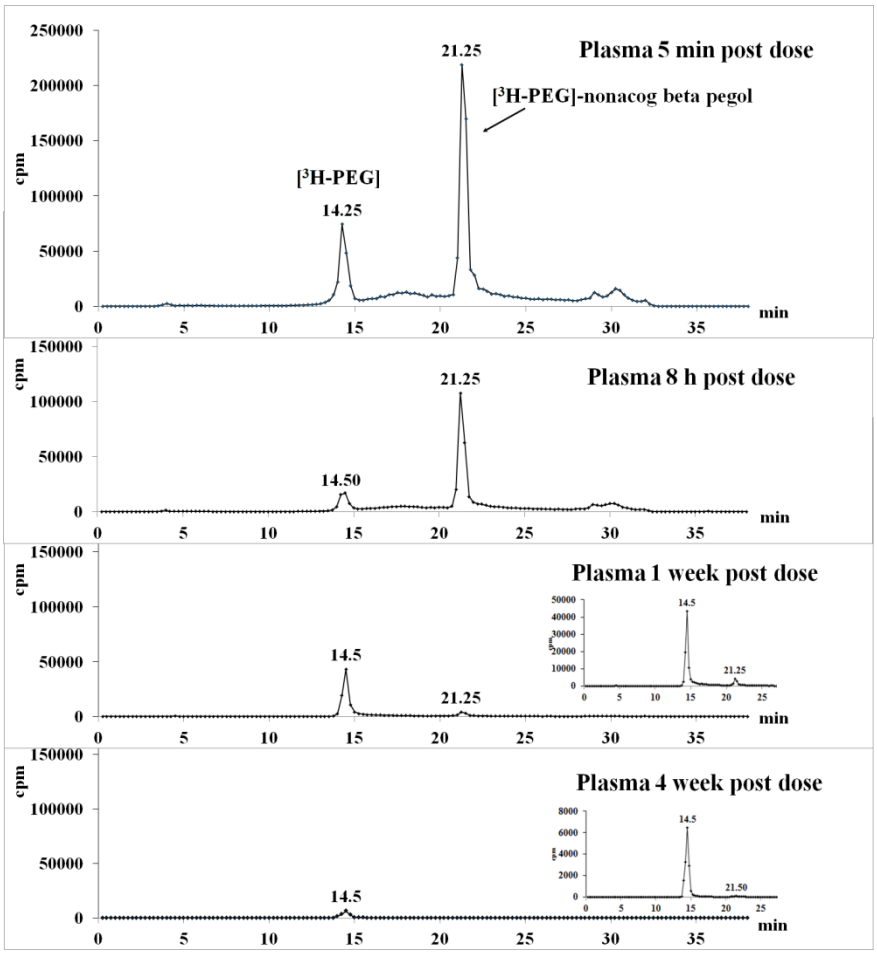


図 2.6.4-13　　ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの経時的な *in vivo* 血漿中代謝物プロファイル

Plasma profiles 5 min, 8 hours, 1 week and 4 weeks post-dose a single bolus i.v. administration of 1.5 mg/kg [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol (~PEG-dose: 0.6 mg/kg) to rats (HPLC data, Module 2.6.5.9.C, 215080). The relative high amount of [^{3}H-PEG] present in the first plasma sample was likely due to a combination of an impure dosing formulation and *in vivo* degradation of [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol.

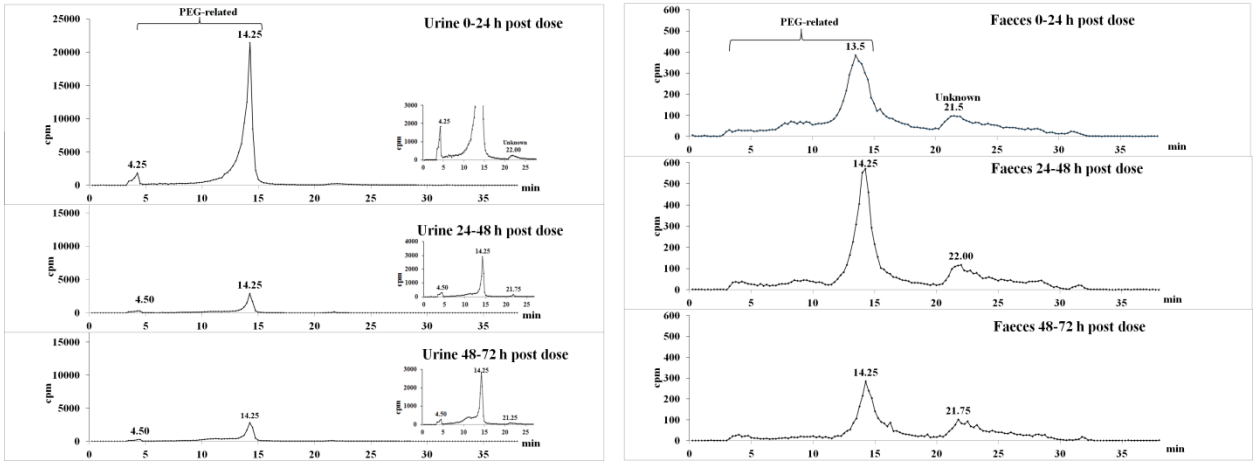


図 2.6.4-14　　ラットに投与した[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの経時的な *in vivo* での尿中（左）及び糞中（右）代謝物プロファイル

Urine and faeces profile 0-24 h, 24-48 h and 48-72 h post-dose a single bolus i.v. administration of 1.5 mg/kg [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol (~PEG-dose:0.6 mg/kg) to rats. The fronting PEG peak (at 14.25 in urine and 13.50-14.25 in faeces) indicate detection of 40 kDa PEG as well as smaller sized PEGs in both urine and faeces. The small peak detected ~21 min in both urine and faeces is unknown and not expected to be nonacog beta pegol (HPLC data, Module 2.6.5.9.C, 215080).

2.6.4.6.3　*In vivo* 代謝 - [^{3}H-PEG]投与ラットにおける尿及び糞中の代謝物プロファイル（Module 2.6.5.9.E、試験番号 215078）

HPLC による 40 kDa PEG（[^{3}H-PEG]）のラットにおける *in vivo* 代謝の評価から、40 kDa PEG は血漿中を循環し、40 kDa 以下の PEG として肝臓及び腎臓を介して経時的に排泄されるという、ノナコグ ベータ ペゴルと同様の概括的結論が得られた。

2.6.4.6.4　*In vitro* - [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルのラット血球分配（Module 2.6.5.10.A、試験番号 214152）

抗凝固薬として K2 EDTA、3.8%クエン酸又はヘパリンリチウムを用いて採取したラット血液で、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの *in vitro* 分配を検討した。ラットからそれぞれ血液試料を、K2 EDTA、3.8%クエン酸あるいはヘパリンリチウムでコーティングしたチューブに採取し、抗凝固剤ごとにプールした。被験物質を 4 µg/mL 及び 100 µg/mL の理論濃度で添加した血液試料を 37℃で、0、15、30、60 及び 120 分間反応させた後、血球分配を測定した。4 及び 100 µg/mL の濃度では、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルは赤血球中への顕著な取り込みは認められなかった。また、用いた抗凝固薬は、検討した濃度範囲での取り込みに影響を及ぼさなかった。本結果は、この[^{3}H-PEG]ノナコグ ベータ ペゴルトレーサーを用いたラットでの *in vivo* 試験で報告された結果と一致している（Module 2.6.5.5.C、試験番号 214076）。

2.6.4.7 排泄

F9-KO マウス及びラットに、PEG 部分又はリンカーを放射能標識したノナコグ ベータ ペゴルトレーサーを投与し、PEG 部分の排泄を検討した。40 kDa PEG 単体の排泄には PEG を放射能標識したトレーサーを用いた（表 2.6.4-20）。

表 2.6.4-20　　ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の排泄試験の概要

Study ID	Compound/tracer	Species
212160	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	F9-KO mice
214077	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Han Wistar rats
213466	[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol	Han Wistar rats
212115	40 kDa [^{3}H-PEG]	Han Wistar rats

F9-KO マウス及びラットに放射能（^{3}H 又は ^{14}C）で標識したノナコグ ベータ ペゴルを単回静脈内投与し、投与後の PEG 関連放射能の排泄を検討した。排泄を投与から 12 週間追跡した。動物を代謝ケージ内で 12 週間にわたって継続的に収容することは、ストレス過多となると考えられることから、動物愛護の理由から行わなかった。そのため、個々の動物の排泄は 12 週間の全期にわたっての追跡は行わなかった。その代わり、より短期間（試験デザインに応じ 3～7 日）に継続的な排泄物の採取を行い、以降は、投与後 12 週まで週 1 回 24 時間排泄物の採取を行った。そのため、排泄回収率は測定時点間の補間を利用した推定値であるため、3 試験の結果にばらつきが生じると考えられる。ラット及び F9-KO マウスにおける試験から、PEG 部分が尿（約 42～56%）及び糞中（約 28～50%）に排泄され、また、投与後 12 週間で 5～11%の放射能が残屍に認められた（表 2.6.4-21）。

表 2.6.4-21　　F9-KO マウス及びラットに単回静脈内投与後 12 週での推定排泄回収率（%）

	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol F9-KO mice (212160)	**[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol Rats (214077)**	**[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol Rats (213466)**
Dose	2.8 mg/kg (1.2 mg/kg~PEG)	1.5 mg/kg (~0.6 mg/kg PEG)	0.30mg/kg (~0.12 mg/kg PEG)
Urine + cage wash	42	44	56
Faeces	50	28	49
Carcass	11	5	7
Total	103	77	112

2.8 mg/kg ~ 238 IU/kg, 1.5 mg/kg ~ 127 IU/kg, 0.30 mg/kg ~ 25 IU/kg

2.6.4.7.1 F9-KO マウスにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの排泄（Module 2.6.5.13.A、試験番号 212160）

[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを 2.8 mg/kg（タンパク質として約 1.6 mg /kg 又は約 238 IU/kg、PEG としての用量：1.2 mg/kg）の用量で単回静脈内投与し、投与後の PEG 関連放射能の排泄を検討した。雄性マウス（n = 4）を試験期間の最初の 7 日間は連続して、以降は 12 週間まで週 1 回 24 時間代謝ケージに収容した。総放射能の推定平均回収率は 103%であり、そのうち約 42%が尿中に排泄され、約 50%が糞中から回収され、11%が残屍中に残存した。投与後 12 週においても、排泄物中及び血漿中に低濃度の放射能が検出された。

2.6.4.7.2 ラットにおける[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルの排泄（Module 2.6.5.13.B、試験番号 214077）

雄性ラット（n = 3）に [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを 1.5 mg/kg（約 0.8 mg タンパク質/kg 又は約 120 IU/kg、PEG 用量：0.6 mg/kg）の用量で単回静脈内投与し、投与後の PEG 関連放射能の排泄を検討した。ラットを試験期間の最初の 8 日間は連続して、以降は 12 週間まで週 1 回 24 時間、代謝ケージに収容した。総放射能の推定平均回収率は 77%であり、そのうち約 44%が尿中に排泄され、約 28%が糞中から回収され、5%が残屍中に残存した。投与後 12 週においても、排泄物中及び血漿中に低濃度の放射能が検出された（概要については表 2.6.4-22 を参照のこと）。

2.6.4.7.3 ラットにおける[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルの排泄（Module 2.6.5.13.C、試験番号 213466）

雄性ラット（n = 3）に[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルを 0.55 mg/kg（タンパク質として約 0.3 mg /kg 又は約 47 IU/kg、PEG としての用量：0.2 mg/kg）の用量で単回静脈内投与し、投与後の PEG 関連放射能の排泄を検討した。ラットを試験期間の最初の 8 日間は連続して、以降は 12 週間まで週 1 回 24 時間、代謝ケージに収容した。総放射能の推定平均回収率は 112%であり、そのうち約 56%が尿中に排泄され、約 49%が糞中から回収され、7%が残屍中に残存した。投与後 12 週においても、排泄物中及び血漿中に低濃度の放射能が検出された（概要については表 2.6.4-22 を参照のこと）。

2.6.4.7.4 ラットにおける 40 kDa [^{3}H-PEG]の排泄（Module 2.6.5.13.D、試験番号 212115）

雄性ラット（n = 3）に 40 kDa の ^{3}H 標識 PEG（[^{3}H-PEG]）（1、12、100 又は 200 mg/kg）を単回静脈内投与した。ラットを試験期間の最初の 3 日間は連続して、以降は 12 週間まで週 1 回 24 時間、代謝ケージに収容した。総放射能の推定平均回収率は、4 用量で 88～93%であり、尿中への排泄率は低用量で増加した（200 mg/kg で 62%及び 1 mg/kg で 74%）。糞中排泄率は一定であった（12～13%）。最終時点で排泄されず残存した放射能は用量の増加に伴い増加した（1 mg/kg での 5%から 200 mg/kg での

18%へ増加）。投与後 12 週においても、排泄物中及び血漿中に低濃度の放射能が検出された（概要については表 2.6.4-22 を参照のこと）。

表 2.6.4-22　　ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa PEG 単回静脈内投与後 12 週でのラット排泄データ（%）の比較

	40 kDa [^{3}H-PEG]* Rat (212115)		**[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol Rat (214077)**	**[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol Rat (213466)**
	200 mg/kg	**1 mg/kg**	**1.5 mg/kg (~0.6 mg/kg PEG)**	**0.30mg/kg (~0.12 mg/kg PEG)**
Urine & cage wash	62	75	44	56
Faeces	12	13	28	49
Carcass	18	5	5	7
Total	92	93	77	112

***** Only the highest and the lowest 40 kDa [^{3}H-PEG] doses are shown here for simplification

2.6.4.8 薬物動態学的相互作用

ノナコグ ベータ ペゴルは薬物代謝酵素（CYP450）による代謝を受けず、また、血漿タンパク質（アルブミン、α1 酸性糖タンパク質など）に結合しないと考えられること、及びヒト FIX に特異的な薬物動態学的相互作用が認められておらず、また予測されていない（ワルファリン等の血液凝固経路と相互作用する薬物を除く）ことから、非臨床薬物相互作用試験は実施しなかった。PEG 化医薬品は広く研究されており、文献的にもタンパク質又はペプチドに結合した PEG 部分に関連する薬物相互作用は報告されていないため、PEG 部分に起因する薬物相互作用が起こることは予測されない。

2.6.4.9 その他の PK 試験

2.6.4.9.1 第 3 相臨床試験用 3 ロットを比較するマウスにおける PK 試験（Module 2.6.5.16、試験番号 LEEH130101）

2 種類の製造工程を用いて生産された 3 ロット〔最初に第 3 相臨床試験向けに用いられた工程（ロット番号：DLDP001 及び CLDP010）及び以降の第 3 相臨床試験（NN7999-3774）に使用し、市販予定品に含まれた商業用工程ロット（ロット番号：CR40375）〕のノナコグ ベータ ペゴルの PK を比較検討するため、F9-KO マウスにおいて PK 試験を行った。

マウスに 1.5 mg/kg で各ロットのノナコグ ベータ ペゴルを静脈内投与した（ロット及びプロファイルあたり 15 匹のマウス、プロファイル当たり 15 時点及びマウスあたり 3 時点）。試料中の FIX を LOCI 及び発色性合成基質法によって分析した。推定 PK パラメータについては表 2.6.4-23（図 2.6.4-15）及び表 2.6.4-24（図 2.6.4-16）を参照のこと。本試験から、F9-KO マウスにおいて 3 ロットのノナコグ ベータ ペゴルの PK は同等であり、重要な試験用から予定市販品での工程の変更はマウスの PK に影響を与えなかったことが示された。

表 2.6.4-23 F9-KO マウスにおける静脈内投与後の推定 PK パラメータ：ノナコグ ベータ ペゴルの 3 ロットデータ（LOCI）

Test substances	Analysis	Dose (mg/kg)	t_{max} (h)	C_{max} (µg/L)	AUC (h*µg/L)	AUC_{extrap} (%)	$t_{1/2}$ (hrs)	CL (mL/h/kg)	V_z (mL/kg)	MRT (h)
CLDP010	LOCI	1.5	0.08	10247	325302	4.4	40.4	4.6	269	53.6
CR40375	LOCI	1.5	0.08	11067	362301	5.3	44.7	4.1	267	58.7
DLDP001	LOCI	1.5	0.08	9913	343125	4.0	42.2	4.4	266	53.9

Data based on antigen data (LOCI)

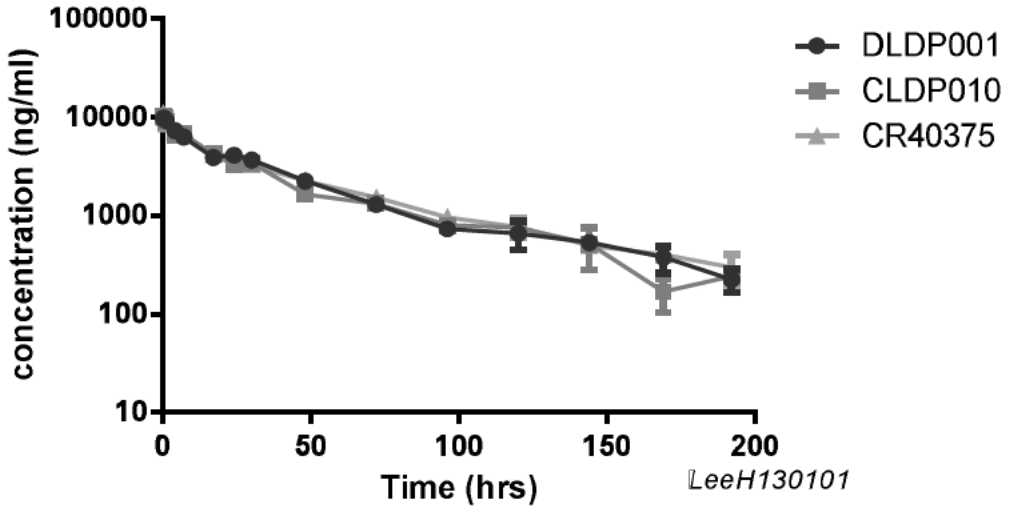


図 2.6.4-15　F9-KO マウスにおける 3 ロットの第 3 相臨床試験用ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg 静脈内ボーラス投与時の PK（LOCI）

Study: LEEH130101. Batches: DLDP001 (circle, black), CLDP010 (square, gray) and CR40375 (triangle, light gray, commercial batch). Semilogarithmic plot of the antigen values (in ng/ml) based on the LOCI assay. Results are shown as mean ± SD; n = 3 per time point; mice were sampled accordingly to a sparse schedule; with 3 mice per time, 3 samples per mouse.

表 2.6.4-24　F9-KO マウスにおける静脈内投与後の推定 PK パラメータ：ノナコグ ベータ ペゴルの 3 ロットデータ（発色性合成基質法）

Test substances	Analysis	Dose (IU/kg)	t_{max} (h)	C_{max} (IU/L)	AUC (h*IU/L)	AUC_{extrap} (%)	$t_{1/2}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_z (mL/kg)	MRT (h)
CLDP010	Chromogenic	240.3	0.08	2054	60435	3.5	37.8	4.0	217	48.8
CR40375	Chromogenic	251.1	0.08	1797	52937	4.4	41.9	4.7	287	54.1
DLDP001	Chromogenic	229.5	0.5	1709	52937	2.9	37.6	4.3	235	48.3

Data based on FIX two-stage chromogenic activity data. The dose of 1.5 mg/kg was converted to IU/kg using the specific activity for the individual batch.

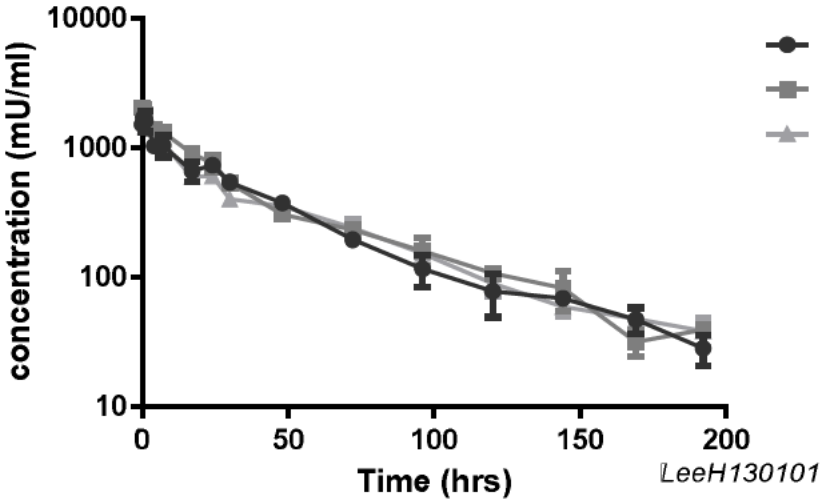


図 2.6.4-16　F9-KO マウスにおける 3 ロットの第 3 相臨床試験用ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg 静脈内ボーラス投与時の PK（発色性合成基質法）

Study: LEEH130101. Batches: DLDP001 (circle, black), CLDP010 (square, gray) and CR40375 (triangle, light gray, commercial batch). Semilogarithmic plot of the FIX activity values (in mIU/ml) based on the two -stage chromogenic assay . Results are shown as mean ± SD; n = 3 per time point; mice were sampled accordingly to a sparse schedule; with 3 mice per time, 3 samples per mouse.

2.6.4.10 考察及び結論

2.6.4.10.1 PK

ノナコグ ベータ ペゴルの PK 特性は、ノナコグ ベータペゴルのタンパク質部分を検出する生体試料中薬物濃度分析法により明らかにされている。一般に、ノナコグ ベータ ペゴルの PK は、各種の非臨床試験動物種において、静脈内ボーラス投与後、1 相性の消失パターンを示した。Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおいて、全身曝露量は概して用量の増加に比例して増加した。非臨床動物種における CL はアロメトリックな関係を示し、ヒトでの CL が予測可能であった。非臨床と臨床での C_{max} 及び AUC の比較で、非臨床安全性試験における曝露量は、40 IU/kg という推奨臨床用量での曝露量と比較し、ラットでは 0.2～5 倍、サルでは 5～75 倍であった（表 2.6.4-14）。

カニクイザルにおいて、曝露量は 4 回以上の反復投与後減少し、同時に高用量群（3750 IU/kg）の数匹で aPTT が増加し始めた（毒性試験の概要文 Module 2.6.6.3.2 反復投与毒性試験を参照のこと）。aPTT は、中和作用を示す交叉反応抗体形成のサロゲートマーカーの一つである。したがって、曝露量の減少は中和抗体の形成に起因すると考えられ、慢性毒性試験でのサルの使用の意義は低いものとして排除される。Rowett ヌードラットは胸腺が欠如しており、T 細胞依存性抗体応答を引き起こさない。このモデルは、慢性毒性試験に適していることが認められた。本動物モデルでは、中和抗体を形成した動物はみられず、動物は 26 週間にわたって曝露された。

2 種類の製造工程（第 3 相臨床試験用及び市販品用工程）で製造された、3 ロットを比較する F9-KO マウスにおける単回投与 PK 試験で、PK プロファイルは同等であることが明らかとなった。

2.6.4.10.2 分布、代謝及び排泄

ノナコグ ベータ ペゴル分子の異なる部位を標識した 3 種の放射能標識トレーサーを用いて、ノナコグ ベータ ペゴルの分布、排泄及び代謝試験を実施した（図 2.6.4-1）。

他の PEG 化タンパク質と同様、ノナコグ ベータ ペゴルのタンパク質部分は、リソソーム酵素によるタンパク質分解によって短いペプチド及びアミノ酸に分解されると考えられる。ラットにおいて、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルと[^{14}C-linker]-ノナコグ ベータ ペゴルに関して同様の血漿中代謝物プロファイルが認められ、この結果はノナコグ ベータ ペゴルのリンカー（グリシン）が PEG 部分に結合していることを示唆している。分解時に PEG 又はリンカーを含む PEG はリンパ系及び血液中に放出される。これはリンパ液中の放射能が示されている分布データ及び F9-KO マウスの血漿中代謝物プロファイリングの結果（ノナコグ ベータ ペゴルを表すピークが経時的に減少し、PEG が血漿中に残る）によって支持される。同様の結論が他の PEG 化化合物に関する文献において公表されている[6, 7, 8, 9]。

すべてのトレーサー及び化合物に関して組織分布は全体的に同様であった。放射能は広範囲に分布し、放射能濃度は血流量の多い組織／臓器で最も高く、CNS（脳及び脊髄）で最も低かった（図 2.6.4-17 及び図 2.6.4-18）。試験は F9-KO マウス及びラットを用いて実施され、その結果は非常に類似しており、ノナコグ ベータ ペゴル及び PEG の生体内運命／CL を検討するため正常な血液凝固能を有するラットを用いることは妥当と考えられた。

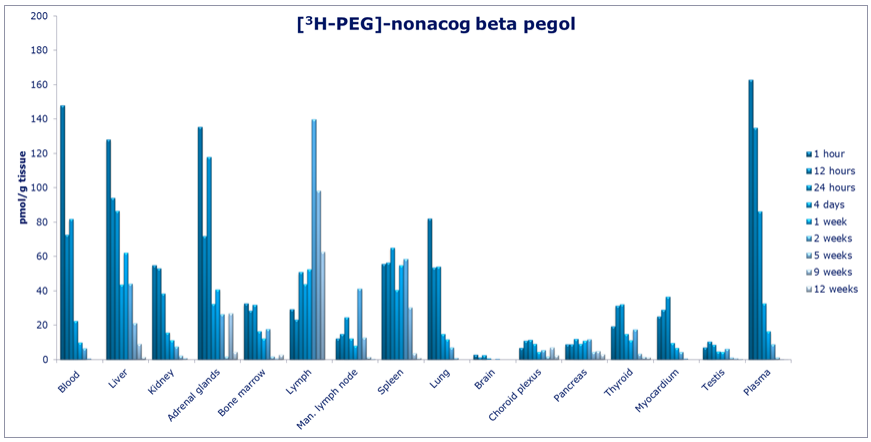


図 2.6.4-17　　ラットにおける [^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル 1.5 mg/kg（PEG として約 0.6 mg/kg）の単回静脈内ボーラス投与時の選択した組織での濃度 - 時間プロファイル

(For detailed data please Module 2.6.5.5.C, 214076)

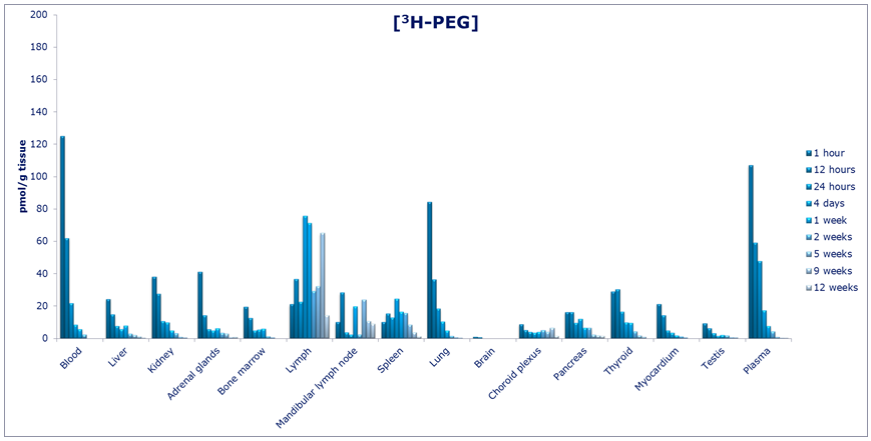


図 2.6.4-18　　ラットにおける[^{3}H-PEG]0.6 mg/kg の単回静脈内ボーラス投与時の選択した組織での濃度 - 時間プロファイル

(For detailed data please refer to Module 2.6.5.5.D, 212213)

分布データから、ノナコグ ベータ ペゴル（図 2.6.4-17）及び 40 kDa PEG（図 2.6.4-18）をラットに、また、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを F9-KO マウスに静脈内投与したとき、PEG 関連放射能は腎

臓及び肝臓を介して消失することが示された。ミクロオートラジオグラフィでは、放射能が肝細胞及びクッパー細胞へ取り込まれることが示され、この結果は、他の研究者によって観察されたように、PEG 化タンパク質の糞中への肝細胞又はクッパー細胞を介した胆汁排泄と一致している [8, 10, 11, 12, 13]。

リンパ系を介した取り込み及び分布（リンパ液、下顎リンパ節及び脾臓の値を参照）が明らかであり、このことはリンパ系への取り込みがノナコグ ベータ ペゴルの PEG 部分の分布に関与することを示している。いくつかの公表文献で、PEG 化分子の静脈内投与時に類似の観察結果が報告されており、タンパク質を PEG 化することで、PEG の血管外溢出とその後のリンパ系への再吸収が促進されることが示唆される。また、PEG 分子量の増加とリンパ系への再分布の増加との関連性も報告されている[14, 15, 16]。

脳における PEG 関連放射能濃度は、全血中濃度と比較し低かった。脳における総放射能濃度は全血中濃度（96 時間までの時点で濃度は LLOQ よりも高かった）の 1～3%であった。脳における放射能は主に血中 PEG 関連放射能を反映していると考えられる。同様の結果が Peginesatide（40 kDa の PEG で PEG 化した赤血球造血刺激因子製剤）[17] 及び 20 kDa の PEG で PEG 化したインターフェロン-α アナログ [11] で公表されている。Peginesatide では、静脈内投与後 24 時間までの時点で、脳には全血中濃度の約 1.6%の放射能が存在していた。このことと一致して、Rudmann *et al.*[18]により、10、20 及び 40 kDa の非結合型 PEG を静脈内投与後、ラットの脳血管中に PEG が認められたことが報告された。40 kDa の PEG は 100 mg/kg の用量で週 2 回投与された。この試験では、脳実質に PEG は認められなかった。

[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa [^{3}H-PEG]を投与時の、脈絡叢における放射能は同程度であり、ノナコグ ベータ ペゴルは脈絡叢へ能動的に取り込まれないことを示している（図 2.6.4-19）。脈絡叢に PEG 関連放射能が認められたという結果は、いずれも 40 kDa の PEG を結合した既承認の PEG 化製剤 Cimzia®[19]及び米国で承認されている Omontys®[20]の公表データと一致している。Cimzia®ではサルに 400 mg/kg の用量での週 1 回、4 週間投与後、Omontys®ではラットに 17 mg/kg の用量で単回静脈内投与後、脈絡叢中に PEG が認められた。

$t_{1/2}$ は PEG の分子量、タンパク質の特性及び分布、投与量ならびに PEG の分析法に依存するため、PEG 部分の血漿からの $t_{1/2}$ を文献値と比較することは困難である。しかしながら、ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 部分の終末相 $t_{1/2}$（ラットで 15～18 日）は、Cimzia®について公表された結果（セルトリズマブ ペゴルの 40 kDa PEG について 23 日という $t_{1/2}$ が報告されている）と一致している [10]。

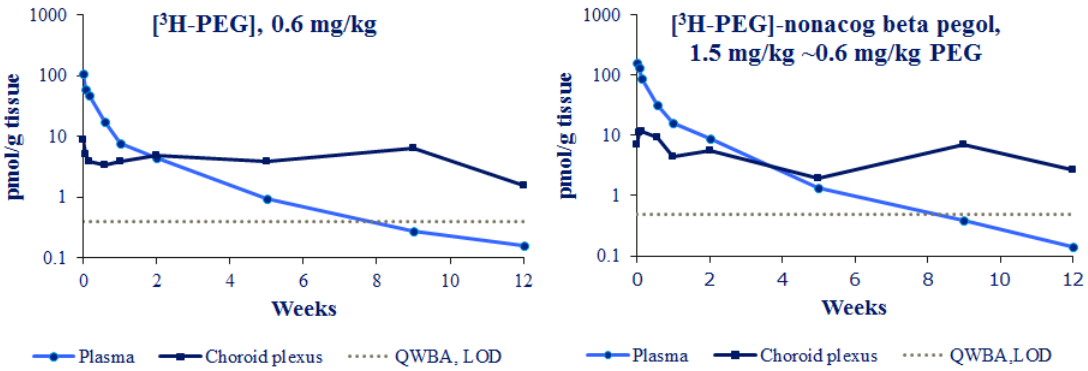


図 2.6.4-19　　ラットに[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び[^{3}H-PEG]単回静脈内投与時の血漿及び脈絡叢での濃度 - 時間プロファイル

(For data used for figure, please refer to Module 2.6.5.5.C, 214076 and Module 2.6.5.5.D, 212213)

分布データと一致して、マウス及びラットにおいて、PEG 関連放射能は尿／腎臓及び糞／肝臓の双方を介して排泄されることが示された。すべての排泄試験で、速やかに消失する初期相と緩徐に消失する終末相から成る 2 相性の消失プロファイルを示した（図 2.6.4-20 の代表例を参照）。PEG 単体に関しては、主要排泄経路は腎臓を介する経路であり、一方、ノナコグ ベータ ペゴル投与後では、肝臓を介する排泄がより多くなった。これらの観測結果は、他の研究者が文献的に公表している結果と一致している [9, 12, 13]。[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを投与した F9-KO マウスでは、尿中に 40 kDa 以下の PEG 及びトリチウム水が認められている。しかしながら、分解が腎臓と尿のいずれにおいて生じたかは不明である。

[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴル及び 40 kDa [^{3}H-PEG]をラットに、[^{3}H-PEG]-ノナコグ ベータ ペゴルを F9-KO マウスに投与後、多くの組織／臓器において最終時点（投与後 12 週）で低濃度の放射能が検出された。残存する PEG 関連放射能の特定の組織／臓器への局在化は認められなかった。ノナコグ ベータ ペゴル投与後、最終時点で排泄されずに残存した量は、ラットで 5～7%、F9-KO マウスで 11%であった。

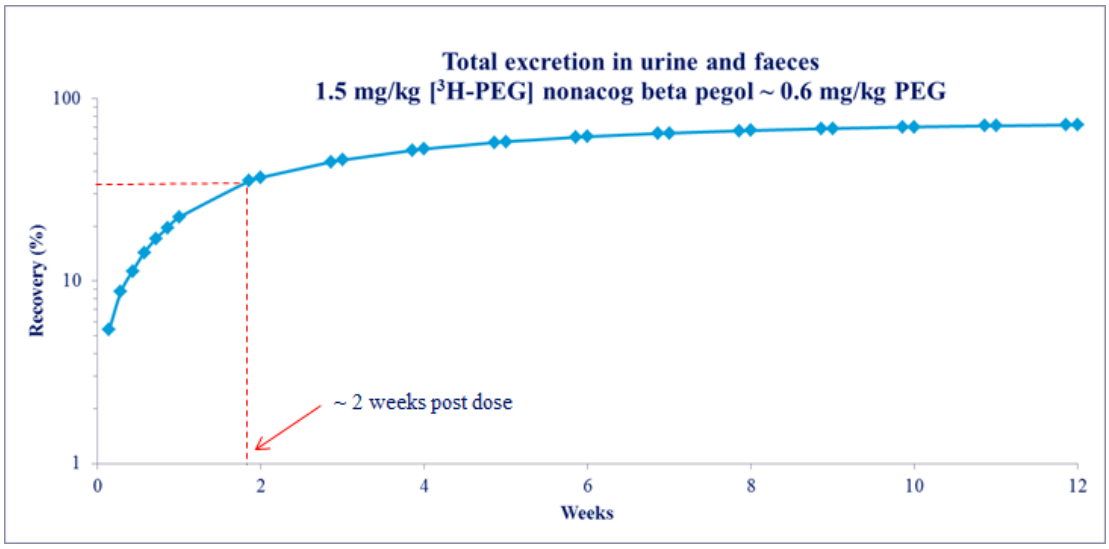


図 2.6.4-20　　ラット尿及び糞中への PEG 関連放射能の経時的排泄

A single i.v. dose of 1.5 mg/kg [^{3}H-PEG]- nonacog beta pegol was administered to rats. Approximately half of the total amount was excreted with the first and fastest phase (~2 weeks post dose). (For data please refer to Module 4.2.2.5, 212160)

2.6.4.10.3　　結論

ノナコグ ベータ ペゴルの PK の特性は、ノナコグ ベータ ペゴル分子のタンパク質部分及び PEG 部分に関して明らかにされている。

ノナコグ ベータ ペゴル分子のタンパク質部分は、静脈内ボーラス投与後 1 相性の消失パターンを示した。全身曝露量は用量比例的に増加した。反復投与後の Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおいて、各動物種で測定された $t_{1/2}$ 及び投与間隔と一致して、軽度の累積が認められた。カニクイザルでは、ほとんどの動物で、4～5 回の反復投与後、中和抗体の形成に伴い、曝露量が減少した。非臨床動物種における CL は、アロメトリックな関係を示し、ヒトでの CL が予測可能であった。

マウス及びラットにおいて、ノナコグ ベータ ペゴルは血流量の多い組織に広範囲に分布した。分子の PEG 部分は、速やかに消失する初期相（$t_{1/2}$ 2～3 日）と緩徐に消失する終末相（$t_{1/2}$ 15～18 日）から成る 2 相性の消失プロファイルで血漿から消失することが示された。ノナコグ ベータ ペゴルは尿及び糞を介して排泄されることが示された。高用量を単回投与後 12 週時に、残屍中に若干の PEG 関連放射能が存在したが、放射能の特定の器官への局在化は認められなかった。

参考文献

1 FDA. Guidance for the Industry. Bioanalytical method validation. US Dept. of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), CDER and CVM. Rockville, MD. May, 2001.

2 DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, et al. Recommendation for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. Pharm Res. 2003;20(11):1885-1900.

3 European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMEA/CHMP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2. 21 July 2011.

4 Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, et al. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. J Immunol Methods. 2004;289(1-2):1-16.

5 Gupta S, Indelicato SR, Jethwa V, Kawabata T, Kelley M, Mire-Sluis AR, et al. Recommendations for the design, optimization, and qualification of cell-based assays used for the detection of neutralizing antibody responses elicited to biological therapeutics. J Immunol Methods. 2007;321(1-2):1-18.

6 Baumann A, Tuerck D, Prabhu S, Dickmann L, Sims J. Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis? Drug Discov Today. 2014;19:1623-1631.

7 Elliott VL, Edge GT, Phelan MM, Lian LY, Webster R, Finn RF, et al. Evidence for metabolic cleavage of a PEGylated protein in vivo using multiple analytical methodologies. Mol Pharm. 2012;9:1291-1301.

8 Webster R, Elliott V, Park BK, Walker D, Hankin M, Taupin P. PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals. In: Veronese FM, editor. PEGylated protein drugs: basic science and clinical applications. Berlin: Birkhäuser; 2009;127-146.

9 Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, Brandli-Baiocco, Cavagnaro J, Dempster M, et al. PEGylated Biopharmaceuticals: Current Experience and Considerations for Nonclinical Development. Toxicologic Pathology. 2015;43(7):959-983.

10 Nesbitt AM, Stephens S, Chartash EK. Certolizumab pegol: a PEgylated anti-tumour necrosis factor alpha biological agent. In: Veronese FM, ed. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications. Basel: Birkhäuser Verlag. 2009;229-254.

11 Cai Y, Zhang Z, Fan K, Zhang J, Shen W, Li M. Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and antiviral activity of pegylated recombinant human consensus interferon-alpha variant in monkeys, rats and guinea pigs. Regul Pept. 2012;173:74-81.

12 Webster R, Didier E, Harris P, Siegel N, Stadler J, Tilbury L, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. Drug Metab Dispos. 2007;35:9-16.

13 Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. J Pharm Sci. 1994;83:601-606.

14 Kaminskas LM, Ascher DB, McLeod VM, Herold MJ, Le CP, Sloan EK, et al. PEGylation of interferon alpha2 improves lymphatic exposure after subcutaneous and intravenous administration and improves antitumour efficacy against lymphatic breast cancer metastases. J Control Release. 2013;168:200-208.

15 Lamka J, Schiavon O, Laznicek M, Caliceti P, Veronese FM. Distribution of catalase, ribonuclease and superoxide dismutase modified by monomethoxy (polyethylene glycol) into rat central lymph and lymphatic nodes. Physiol Res. 1995;44:307-313.

16 Zou Y, Bateman TJ, Adreani C, Shen X, Cunningham PK, Wang B, et al. Lymphatic absorption, metabolism, and excretion of a therapeutic peptide in dogs and rats. Drug Metab Dispos. 2013;41:2206-2214.

17 Woodburn KW, Fong K-L, Wilson SD, Sloneker S, Strzemienski P, Solon E, et al. Peginesatide clearance, distribution, metabolism, and excretion in monkeys following intravenous administration. Drug Metab Dispos. 2013;41:774-784.

18 Rudmann DG, Alston JT, Hanson JC, Heidel S. High molecular weight polyethylene glycol cellular distribution and PEG-associated cytoplasmic vacuolation is molecular weight dependent and does not require conjugation to proteins. Toxicol Pathol. 2013;41(7):970-983.

19 FDA. Cimzia: Pharmacology Reviews. BLA 125160/0. 18 April 2008.
20 FDA. Omontys: Pharmacology Reviews. Application number: 202799Orig1s000. 27 Feb 2012.

ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.5 薬物動態試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.5 薬物動態試験の概要表 4
2.6.5.1 薬物動態試験の概要 4
2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告 7
2.6.5.3 単回投与時の吸収 8
2.6.5.3.A マウス（F9-KO、血友病 B）ノナコグベータペゴル及び BeneFIX® - LEEH080102 8
2.6.5.3.B 血友病 B イヌ ノナコグベータペゴル及び BeneFIX® - MIE080701 10
2.6.5.3.C ミニブタ、ノナコグベータペゴル及び BeneFIX® - LEEH080502 11
2.6.5.3.D 総放射能に基づく推定薬物動態試験パラメータ – 放射能標識ノナコグベータペゴルをマウス及びラットに投与 – 213393 12
2.6.5.3.E 総放射能に基づく推定薬物動態パラメータ – [^{3}H-PEG] をラットに投与 – 213395 14
2.6.5.4 反復投与時の吸収 15
2.6.5.4.A Rowett Nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) ラットを用いる週 2 回、6 週間反復静脈内投与薬物動態及び免疫原性試験 – 212143 15
2.6.5.4.B Rowett Nude Rats (Crl:NIH-Foxn1rnu)を用いる 40K PEG-rFIX (ノナコグベータペゴル) の 26 週間反復静脈内投与毒性試験及び 26 週間回復性試験 – 212513 17
2.6.5.4.C 雄性カニクイザルを用いる 13 週間反復静脈内投与免疫原性試験及び 5 週間回復性試験 – 208405 19
2.6.5.4.D 雄性カニクイザルを用いる 40K PEG-rFIX (ノナコグベータペゴル)の 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び安全性薬理試験並びに 5 週間回復性試験 – 208260 21
2.6.5.5 組織分布 24
2.6.5.5.A 定量的組織分布 (QWBA) - F9-KO マウスを用いる[^{3}H- 活性化ペプチド]-ノナコグベータペゴル 24
2.6.5.5.B 定量的組織分布 (QWBA) 及びミクロオートラジオグラフィ (MARG) – マウスを用いる [^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴル 27
2.6.5.5.C 定量的組織分布 (QWBA) 及びミクロオートラジオグラフィ (MARG) – ラットを用いる [^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴル 30
2.6.5.5.D 定量的組織分布 (QWBA) 及びミクロオートラジオグラフィ (MARG) – ラットを用いる [^{3}H-PEG] 33
2.6.5.6 血漿蛋白結合 36
2.6.5.7 妊娠中又は授乳期の動物での試験 36
2.6.5.8 その他の分布試験－組織分布 37

2.6.5.9 *In Vivo* 代謝.....38
2.6.5.9.A F9-KO マウスにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後の HPLC を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング – 214438.....38
2.6.5.9.B F9-KO マウスにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のゲル電気泳動を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング - 214456.....39
2.6.5.9.C ラットにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後の HPLC を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング – 215080.....40
2.6.5.9.D ラットにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のゲル電気泳動を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング - 215081.....41
2.6.5.9.E ラットに 40KDa PEG を単回静脈内投与後の HPLC を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング – 215078.....42
2.6.5.10 *In Vitro* 代謝.....43
2.6.5.10.A *In vitro* ラット血球分配 – 214152.....43
2.6.5.11 推定代謝経路.....44
2.6.5.12 薬物代謝酵素の誘導及び阻害.....44
2.6.5.13 排泄.....44
2.6.5.13.A [^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後の雄性血友病 B マウスにおける排泄 – 212160.....45
2.6.5.13.B [^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のラットにおける排泄 – 214077.....46
2.6.5.13.C [^{14}C-linker]-ノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のラットにおける排泄 – 213466.....47
2.6.5.13.D [^{3}H-PEG]を単回静脈内投与後のラットにおける排泄 – 212115.....48
2.6.5.14 胆汁中排泄.....49
2.6.5.15 薬物相互作用.....49
2.6.5.16 その他の薬物動態試験：3 バッチのノナコグベータペゴルの薬物動態比較 - LEEH130101.....49

2.6.5 薬物動態試験の概要表

2.6.5.1 薬物動態試験の概要

Test Article: Nonacog beta pegol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility/test site	Study ID	Location in CTD
Absorption					
Single Dose PK					
Single dose pharmacokinetics	Mouse	Intravenous	Novo Nordisk A/S	LEEH080102	4.2.2.2.1
Single dose pharmacokinetics	Dog	Intravenous	University of North Carolina (*in life*)/ Novo Nordisk A/S (*bio-analysis*)	MIE080701	4.2.1.1.16
Single dose pharmacokinetics	Pig	Intravenous	Bioadvice (*in life*)/. Novo Nordisk A/S (*bio-analysis*)S	LEEH080502	4.2.2.2.2
Estimated PK based on total radioactivity					
[^{3}H-PEG]-/[14C-linker]-]nonacog beta pegol	Mouse/rat	N/A	Novo Nordisk A/S	213393	4.2.2.2.3
[^{3}H-PEG]	Rat	N/A	Novo Nordisk A/S	213395	4.2.2.2.4
PK in non-pivotal repeat dose toxicity studies					
6-week PK/immunogenicity study	Rowett Nude Rats	Intravenous	Huntingdon Life Sciences, Cambridgeshire, UK (*in life*)/ Novo Nordisk A/S (*bio-analysis*)	212143	4.2.3.2.1
Pharmacokinetics in 13-week immunogenicity study	Cynomolgus monkey	Intravenous	Covance Laboratories Ltd, Harrogate(*in life*)/	208405	4.2.3.2.2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility/test site	Study ID	Location in CTD
			Novo Nordisk A/S (*bio-analysis*)		
PK in pivotal repeat dose toxicity studies					
26-week toxicology study in nude rat	Rowett Nude Rats	Intravenous	Huntingdon Life Sciences, Cambridgeshire, UK(*in life*)/ . Novo Nordisk A/S (*bio-analysis*)	212513	4.2.3.2.4
4-week toxicology study in cynomolgus monkeys	Cynomolgus monkey	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate(*in life*)/ Novo Nordisk A/S (*bio-analysis*)	208260	4.2.3.2.6
Distribution					
Organ distribution (QWBA), [^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol	Mouse	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	210169	4.2.2.3.1
Organ distribution (QWBA/MARG), [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Mouse	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	212166	4.2.2.3.3
Tissue distribution (IHC), [^{3}H-activation peptide]-nonacog beta pegol	Mouse	Intravenous	Novo Nordisk A/S	210167	4.2.2.3.2
Organ distribution (QWBA/MARG), [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Rat	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	214076	4.2.2.3.4
Organ distribution (QWBA/MARG), [^{3}H-PEG]	Rat	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	212213	4.2.2.3.5
Metabolism					
In vitro partitioning into red blood cells, [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Rat	N/A	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	214152	4.2.2.4.1
Profiling of metabolites in plasma, urine and faeces by HPLC, [^{3}H-PEG]-nonacog beta	Mouse	N/A	Novo Nordisk A/S	214438	4.2.2.4.2

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility/test site	Study ID	Location in CTD
pegol					
Profiling of metabolites in plasma and urine by gel electrophoresis, [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Mouse	N/A	Novo Nordisk A/S	214456	4.2.2.4.3
Profiling of metabolites in plasma, urine and faeces by HPLC, [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Rat	N/A	Novo Nordisk A/S	215080	4.2.2.4.4
Profiling of metabolites in plasma and urine by gel electrophoresis, [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Rat	N/A	Novo Nordisk A/S	215081	4.2.2.4.5
Profiling of metabolites in plasma, urine and faeces by HPLC, [^{3}H-PEG]	Rat	N/A	Novo Nordisk A/S	215078	4.2.2.4.6

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility/test site	Study ID	Location in CTD
Excretion					
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Mouse	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	212160	4.2.2.5
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Rat	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	214077	4.2.2.5
[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol	Rat	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	213466	4.2.2.5
[^{3}H-PEG]	Rat	Intravenous	Covance Laboratories Ltd., Harrogate	212115	4.2.2.5
Pharmacokinetic Drug Interactions					
No studies performed.					
Other					
PK comparability	Mouse	Intravenous	Novo Nordisk A/S	LEEH130101	4.2.2.7

2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告

Please refer to Section 2.6.4.3 *Method of Analysis.*

2.6.5.3 単回投与時の吸収

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.5.3.A マウス（F9-KO、血友病 B）ノナコグベータペゴル及び BeneFIX® - LEEH080102

Location in CTD: 4.2.2.2
Study ID: LEEH080102

Species	**Mouse (F9-KO)**	**Mouse (F9-KO)**	
Gender (M/F) / Number of animals	M12/F18, 3 mice at each timepoint	M12/F18, 3 mice at each timepoint	
Feeding condition	Fed	Fed	
Vehicle/Formulation	0.30 mg/mL nonacog beta pegol, NNC 0156-0000-0009-1B, 10 mM histidine, 260 mM glycine, 1 % sucrose, 0.005 % Tween80, pH 6.8	0.30 mg/mL, BeneFIX®, NNC 0156-0000-0004-1A, 10 mM histidine, 260 mM glycine, 1 % sucrose, 0.005 % Tween80, pH 6.8	
Method of Administration	i.v	i.v	
Dose (mg/kg)	1.5 mg/kg	1.5 mg/kg	
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma	Plasma	
Analyte	FIX	FIX	
Assay	ELISA Clot	ELISA Clot	

PK parameters:			
t_{max} (hr)	ELISA: 0.08 Clot: 0.5	ELISA: 0.08 Clot: 0.5	
C_{max} (ng/ml)	ELISA: 15500 Clot: 9913	ELISA: 8777 Clot: 7044	
AUC (ng*hr/ml)	ELISA: 412465 Clot: 309451	ELISA: 41624 Clot: 29850	
$t_{1/2}$ (hr)	ELISA: 41 Clot: 67	ELISA: 17 Clot: 5.5	
CL (ml/h/kg)	ELISA: 3.6 Clot: 4.8	ELISA: 36 Clot: 50	

Additional Information:
PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point.
Clot: One-stage clotting assay
AUC: $AUC_{(0\text{-inf})}$

2.6.5.3.B 血友病 B イヌ ノナコグベータペゴル及び BeneFIX® - MIE080701

Location in CTD: 4.2.1.1
Study ID: MIE080701

Species	**Haemophilia B dog**	**Haemophilia B dog**	
Gender (M/F) / Number of animals	F1	F1	
Feeding condition	Fed	Fed	
Vehicle/Formulation	0.4 mg/mL nonacog beta pegol, NNC0156-0000-0009-1B, 2.34 mg/ml NaCl, 1.55 mg/ml L-histidine, 0.50 mg/ml L-methionine, 0.05 mg/ml Tween80, 10 mg/ml sucrose, 25 mg/ml mannitol, pH6.8	0.4 mg/mL, BeneFIX®, NNC0156-0000-0004-3A, 0.234% NaCl,10mM histidine, 260mM glycine, 1%sucrose, 0.005% Tween 80, pH 6.8	
Method of Administration	i.v.	i.v.	
Dose (mg/kg)	0.4	0.4	
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma	Plasma	
Analyte	FIX	FIX	
Assay	Clot	Clot	
PK parameters:			
C_{max} (ng/ml)	6321	3434	
AUC (ng*hr/ml)	646594	31170	
$t_{1/2}$ (hr)	113	18	
CL (ml/kg/h)	0.62	13	

Additional Information:
Clot: one-stage clotting assay. Data are individual data from a dog tolerized to human FIX (animal ID: J07).
AUC: $AUC_{(0\text{-}inf)}$

2.6.5.3.C　　ミニブタ、ノナコグベータペゴル及び BeneFIX® - LEEH080502

Location in CTD: 4.2.2.2
Study ID: LEEH080502

Species	**Minipig**	**Minipig**	
Gender (M/F) / Number of animals	M/3	M/3	
Feeding condition	Fed	Fed	
Vehicle/Formulation	0.4 mg/mL nonacog beta pegol, NNC0156-0000-0009-1B, 10 mM histidine, 0.26 M glycine, 1 % sucrose, 0.005% Tween80, pH 6.8	0.4 mg/mL, BeneFIX®, NNC0156-0000-0004-3A, 10 mM histidine, 0.26 M glycine, 1 % sucrose, 0.005% Tween80, pH 6.8	
Method of Administration	i.v	i.v	
Dose (mg/kg)	0.2	0.2	
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma	Plasma	
Analyte	FIX	FIX	
Assay	ELISA	ELISA	
PK parameters:			
t_{max} (hr)	0.08	0.08	
C_{max} (ng/ml)	1993±220	1850±165	
AUC (ng*hr/ml)	117178±16686	16991±1328	
$t_{1/2}$ (hr)	76±3	16±5	
CL (ml/h/kg)	1.7±0.2	12±1	

Additional Information:
AUC: $AUC_{(0\text{-}inf)}$

2.6.5.3.D 総放射能に基づく推定薬物動態試験パラメータ – 放射能標識ノナコグベータペゴルをマウス及びラットに投与 – 213393

Test Article: Nonacog beta pegol

Duration of Dosing: single dose

Title: Nonclinical Cross-study Pharmacokinetic evaluation of nonacog beta pegol	**Location in CTD:** 4.2.2.2 **Study ID:** 213393

Species	Mouse (F9-KO strain, B6.129P2-F9tmlDws/J)[1]
Gender (M/F) / Number of animals	Males only /see below for number of animals
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	[1]The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), L-methionine (0.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection (1 mL). pH = 6.8.
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	See below
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma
Analyte	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]
Assay	Liquid scintillation counting (LSC)

PK parameters for nonacog beta pegol:	**Study type**	**Study ID**	**Dose (mg/kg)**	**Corr. protein dose (mg/kg)[3]**	**Corr. PEG dose (mg/kg)[3]**	**Assay**	**$t_{½}$ (days)**	**V_{ss} (ml/kg)**	**CL (ml/h/kg)**
[^{3}H-Activation peptide]-nonacog beta pegol	QWBA[4]	210169	2.2	1.2	0.9	LSC	2.5	239	2.49
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	Excretion[5]	212160	2.8	1.6	1.2	LSC	28	596	1.36
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol	QWBA[6]	212166	2.8	1.6	1.2	LSC	31	592	1.41

Additional information:

[1]The specific information about the mouse strain and vehicle are not listed in the current report but in the separate study reports, [2]The tracer was named [3H]PEG-N9-GP in the report, [3]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report. [4]plasma sampling schedule: 1, 12, 24, 96 h and 7, 10 and 14 days post dose (n=1 per time point), [5]plasma sampling schedule: 0.25, 1, 2, 6, 8, 24, 48 h and 7, 14, 21, 28, 35, 42, 46,70 and 84 days post dose (n = 2 per time point), [6]plasma sampling schedule: 1, 12, 24, 96 h and 7, 14, 35, 63 and 84 days post dose (n=1 per time point). Non-compartmental analysis (NCA) was used for estimation of the above listed PK parameters. PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point.

Species	Han Wistar rats								
Gender (M/F) / Number of animals	Males only /see below for number of animals								
Feeding condition	Fed								
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), L-methionine (0.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection (1 mL). pH = 6.8.								
Method of Administration	i.v.								
Dose (mg/kg)	See below								
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma								
Analyte	nonacog beta pegol								
Assay	Liquid scintillation counting (LSC) or LOCI								
PK parameters for nonacog beta pegol:	**Study type**	**Study ID**	**Dose (mg/kg)**	**Corr. protein dose (mg/kg)**	**Corr. PEG dose (mg/kg)**	**Assay**	**$t_{½}$ (days)**	**V_{ss} (ml/kg)**	**CL (ml/h/kg)**
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[4]	Excretion	214077	1.5	0.9	0.6	LSC	16	200	0.82
						LOCI	1.4	92.5	2.25
[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[5]	QWBA	214076	1.5	0.9	0.6	LSC	15	249	1.1
[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol[6]	Excretion	213466	0.30	0.2	0.1	LSC	18	157	0.68
						LOCI	1.7	66	1.2

Additional Information:

[4]plasma sampling schedule: 5, 30 minutes, 1, 2, 6, 8 and 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 and 84 days post dose (n=6 per time point, same group of six rats every other time point), [5]plasma sampling schedule: 1, 12, 24, 96 h and 1, 2, 5, 9 and 12 weeks post dose (n=1 per time point), [6]plasma sampling schedule: 5, 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8 and 1, 2, 7, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 and 85 days post dose (n=6 per time point, same group of six rats every other time point).

Non-compartmental analysis (NCA) was used for estimation of the above listed PK parameters. PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point.

2.6.5.3.E 総放射能に基づく推定薬物動態パラメータ – [^{3}H-PEG] をラットに投与 – 213395

Test Article: PEG

Duration of Dosing: single dose

Title: Nonclinical Cross-study Pharmacokinetic evaluation of [^{3}H PEG]	**Location in CTD:** 4.2.2.2 **Study ID:** 213395

Species	Han Wistar rats						
Gender (M/F) / Number of animals	Males only /see below for number of animals						
Feeding condition	Fed						
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted 0.9% sodium chloride						
Method of Administration	i.v.						
Dose (mg/kg)	See below						
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma						
Analyte	[^{3}H-PEG] (40 kDa PEG labelled in the PEG moiety)						
Assay	Liquid scintillation counting (LSC)						
PK parameters for nonacog beta pegol:	**Study type**	**Study ID**	**PEG dose (mg/kg)**	**Assay**	**$t_{½}$ (days)**	**V_{ss} (ml/kg)**	**CL (ml/h/kg)**
[^{3}H-PEG][1]	QWBA	212213	0.6	LSC	19	510	1.9
[^{3}H-PEG][2]	ADME	212115	1	LSC	24	450	1.1
[^{3}H-PEG][2]	ADME	212115	12	LSC	26	420	0.84
[^{3}H-PEG][2]	ADME	212115	100	LSC	59	940	0.78
[^{3}H-PEG][2]	ADME	212115	200	LSC	42	750	0.88

Additional Information:

[1]plasma sampling schedule: plasma sampling schedule: 1, 12, 24, 96 h and 7, 14, 35, 63 and 84 days post dose (n=1 per time point),

[2]plasma sampling schedule: 5, 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48, 168 h and 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 and 12 weeks post dose (n=6 per time point, same group of six rats every other time point).

Non-compartmental analysis (NCA) was used for estimation of the above listed PK parameters. PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point.

2.6.5.4 反復投与時の吸収

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.5.4.A Rowett Nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) ラットを用いる週 2 回、6 週間反復静脈内投与薬物動態及び免疫原性試験 – 212143

Test Article: Nonacog beta pegol

Date of First Dose: 22-June-2012

Duration of Dosing: 6 weeks

Title: Pharmacokinetic and Immunogenicity Study in Rowett Nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) Rats Following Twice weekly Intravenous Administration for 6 Weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2 **Study ID:** 212143

Species	Rowett Nude Rats (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})
Gender (M/F) / Number of animals	9M/9F per profile per group, 3M/3F per time point
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Nonacog beta pegol was formulated as a freeze dried product in sodium chloride 2.34 mg/mL, L-histidine 1.55 mg/mL, polysorbate 80 0.05 mg/mL, sucrose 10 mg/mL, mannitol 25 mg/mL, pH = 6.8. Batch numbers for the test article was: 001252741-01
Method of Administration	i.v.
Dose (IU/kg)	40, 1200
Sample	Plasma
Analyte	nonacog beta pegol
Assay	LOCI

PK parameters:			Week			
			1	6	1	6
			Dose(IU/kg)			
			40	40	1200	1200
			SD	SS	SD	SS
Parameter	**Unit**	**Sex**				
C_{max}	ng/ml	Male	2920	5090	105000	140000
		Female	2390	3460	162000	227000
$AUC_{(0\text{-}168hr)}$	ng*hr/ml	Male	75100	169000	2430000	4640000
		Female	54300	96000	3170000	6070000
$t_{½}$	hr	Male	28	38	30	38
		Female	27	32	26	32
Rac_{Obs}		Male	NA	2.26	NA	1.91
		Female	NA	1.77	NA	1.91

Additional Information: SD: single dose; SS: steady state. NA: not applicable. The accumulation ratio, Rac_{Obs} was calculated from AUC_{tau} (=$AUC_{(0\text{-}168hr)}$) Week 6/AUC_{tau} Week1

PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point

2.6.5.4.B Rowett Nude Rats (Crl:NIH-Foxn1rnu)を用いる 40K PEG-rFIX (ノナコグベータペゴル) の 26 週間反復静脈内投与毒性試験及び 26 週間回復性試験 – 212513

Test Article: Nonacog beta pegol

Date of First Dose: 04 June 2013

Duration of Dosing: 26 weeks

Title: 40K PEG-rFIX (nonacog beta pegol) 26 Week Toxicity Study by Intravenous Administration to Rowett Nude Rats (Crl:NIH-Foxn1rnu) Followed by a 26 Week treatment free Period	**Location in CTD:** 4.2.3.2 **Study ID:** 212513
Species	Rowett Nude Rats (Crl:NIH-Foxn1rnu)
Gender (M/F) / Number of animals	15M/15F sampled per profile per group, 3M/3F per time point. 18M/18F dosed per sex per group.
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Nonacog beta pegol was formulated as a freeze dried product in 2.34 mg/mL sodium chloride, 3.10 mg/mL L-histidine, 0.05 mg/mL polysorbate 80, 10 mg/mL sucrose, 25 mg/mL mannitol, pH=6.4, which was reconstituted in 4.2 mL histidine solution before dosing. Batch numbers for the test article were: CLDF008 and CLDF012
Method of Administration	i.v.
Dose (IU/kg)	40, 150, 600, 1200
Sample	Plasma
Analyte	nonacog beta pegol
Assay	LOCI

PK parameters:			Week							
			1				26			
			Dose (IU/kg)				Dose (IU/kg)			
			40	150	600	1200	40	150	600	1200
			SD	SD	SD	SD	SS	SS	SS	SS
Para-meter	**Unit**	**Sex**								
C_{max}	ng/ml	Male	3900	13700	47200	87000	3870	17200	55900	105000
		Female	3520	14300	37200	111000	3260	18300	43800	143000
		Mean	**3710**	**14000**	**42200**	**99300**	**3570**	**17800**	**49800**	**124000**
$AUC_{(0-96hr)}$	ng*hr/ml	Male	131000	411000	1400000	2710000	148000	536000	1720000	3340000
		Female	91000	290000	1110000	2700000	91200	401000	1390000	2910000
		Mean	**111000**	**351000**	**1260000**	**2700000**	**120000**	**468000**	**1560000**	**3120000**
AUC_{tau}	hr*ng/ml	Male	NR	NR	NR	NR	156000	573000	1830000	3600000
		Female	NR	NR	NR	NR	91600	419000	1460000	3040000
		Mean	**NC**	**NC**	**NC**	**NC**	**124000**	**496000**	**1650000**	**3320000**
Rac_{Obs}		Male					1.13	1.30	1.23	1.23
		Female					1.00	1.38	1.26	1.08
		Mean					**1.07**	**1.34**	**1.24**	**1.15**
$t_{½}$	hr	Male	26.0	27.3	27.3	NR	29.7	38.8	34.7	NR
		Female	26.2	26.5	NR	25.7	12.0	31.6	NR	28.5

Additional Information: SD: single dose; SS: steady state. NR: not reported/not reportable; NC: not calculable. The last sample following dosing was taken at 96 hours, which was above LLOQ for all profiles; t_{last} was 96 hours and $AUC_{(0-96hr)}=AUC_{last}$. The dosing interval, tau, was 120 hours ($AUC_{tau}=AUC_{(0-120hr)}$).

Systemic exposure above LLOQ to nonacog beta pegol in the dosed animals was confirmed. There was a small indication of sex differences in the exposure ($AUC_{(0-96hr)}$), with a generally lower $AUC_{(0-96hr)}$ in female rats, while no difference in C_{max} was seen. The mean (95% confidence interval, n=3/time point) female/male ratios for C_{max} and $AUC_{(0-96hr)}$ were 1.01 (0.823-1.19) and 0.780 (0.681-0.878). PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point.

2.6.5.4.C　雄性カニクイザルを用いる 13 週間反復静脈内投与免疫原性試験及び 5 週間回復性試験 – 208405

Test Article: Nonacog beta pegol

Date of First Dose: 13-Oct-2008

Duration of Dosing: 13 weeks

Title: 40K PEG-rFIX (nonacog beta pegol) 13 Week Intravenous Administration Immunogenicity Study in the Male Cynomolgus Monkey Followed by a 5 Week Treatment-free Period. Non-GLP	**Location in CTD:** 4.2.3.2 **Study ID:** 208405

Species	Cynomolgus monkey	
Gender (M/F) / Number of animals	8M	
Feeding condition	Fed	
Vehicle/Formulation	Nonacog beta pegol was formulated as a freeze dried product in sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), L-methionine (0.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and sterile water for injection (1 mL), pH = 6.8. Batch numbers for the test articles were: 433-08-078 and 433-08-079.	
Method of Administration	i.v.	
Dose (IU/kg)	200	
Sample	Plasma	
Analyte	nonacog beta pegol	
Assay	One-stage clotting assay	
PK parameters:	**Week 1**	**Week 13**
C_{first} (IU/ml)	6.70 (±2.78)	2.92 (±2.51)[a]
$AUC_{(0\text{-}24hr)}$ (IU*hr/ml)	102.28 (±25.29)	67.89 (±56.78)[b]
$AUC_{(0\text{-}168hr)}$ (IU*hr/ml)	379.84 (±45.27)	204.25 (±284.72)[c]
$t_{½}$ (hr)	Range: 42 to 127 (n=8 animals)	75; 79 (only reportable for 2 out of 8 animals)

Additional Information: Data are mean ± SD. C_{first}: plasma activity at the first sampling time point, 0.083hrs.
Week 13: a: determined from six out of eight animals. b: determined from three out of eight animals, of which one animal had activity levels slightly above LLOQ. c: determined from two out of eight animals, of which one animal had activity levels slightly above LLOQ. For other animals the individual parameters could not be calculated or reported as activity was not above LLOQ during the time interval, and/or not enough time points with values above LLOQ were available.

Title: 40K PEG-rFIX (nonacog beta pegol) 13 Week Intravenous Administration Immunogenicity Study in the Male Cynomolgus Monkey Followed by a 5 Week Treatment-free Period. Non-GLP	**Location in CTD:** 4.2.3.2 **Study ID:** 208405

Species	Cynomolgus monkey
Gender (M/F) / Number of animals	8M
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	Nonacog beta pegol was formulated as a freeze dried product in sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), L-methionine (0.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and sterile water for injection (1 mL), pH = 6.8. Batch numbers for the test articles were: 433-08-078 and 433-08-079.
Method of Administration	i.v.
Dose (IU/kg)	200
Sample	Plasma
Analyte	nonacog beta pegol
Assay	One-stage clotting assay

In general, systemic exposure to nonacog beta pegol declined to levels below LLOQ in most animals following once weekly repeated dosing with nonacog beta pegol for 13 weeks. Only two out of the eight animals showed exposure from 0.083 hours up to 96-168 hours following the last dose in week 13, in line with the detection of neutralising antibodies in 6/8 animals following once weekly intravenous administration.

2.6.5.4.D 雄性カニクイザルを用いる 40K PEG-rFIX (ノナコグベータペゴル)の 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び安全性薬理試験並びに 5 週間回復性試験 – 208260

Test Article: Nonacog beta pegol

Date of First Dose: Sept 8 2008

Duration of Dosing: 4 weeks

Title: 40K PEG-rFIX (nonacog beta pegol) 4 Week Intravenous Administration Toxicity and Safety Pharmacology Study in the Male Cynomolgus Monkey Followed by a 5 Week Treatment-Free Period	**Location in CTD:** 4.2.3.2 **Study ID:** 208260

Species	Cynomolgus Monkey
Gender (M/F) / Number of animals	Males only / 8 per dose group
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), L-methionine (0.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection (1 mL). pH = 6.8. Batch numbers for the test article were: 433-08-101, 433-08-078 and 433-08-079
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	350, 1300 and 3750 IU/kg
Sample (Whole blood, plasma, serum etc.)	Plasma
Analyte	nonacog beta pegol

Assay	**Clot (Activity assay)**	**ELISA (Concentration Assay)**
PK parameters:		
t_{max} (hr)	For i.v. first sampling point is highest	
Day 1 - C_{max}	IU/mL	ng/mL
350 IU/kg	7.37±1.66	37500±9963
1300 IU/kg	30.56±3.91	111902±17037
3750 IU/kg	84.93±3.34	286377±82345
Day 22 - C_{max}		
350 IU/kg	8.83±1.02	42284±3191
1300 IU/kg	34.77±2.83	173322±49543

Assay		Clot (Activity assay)	ELISA (Concentration Assay)
	3750 IU/kg	78.13±18.25	500767±119394
Day 29 - C_{max}			
	350 IU/kg	9.42±1.31	50558±6679
	1300 IU/kg	35.17±7.44	268099±79108
	3750 IU/kg	95.59±6.60	466043±250295
Day 1 - AUC_{last}		h*IU/mL	h*ng/mL
	350 IU/kg	379±69 (n=8) (t_{last}: 168 hr)	1953690±278120 (n=8) (t_{last}: 168 hr)
	1300 IU/kg	1365±197 (n=8) (t_{last}: 168 hr)	5811393±740474 (n=8) (t_{last}: 168 hr)
	3750 IU/kg	4424±275 (n=8) (t_{last} :168 hr)	15513230±1164557 (n=8) (t_{last} range: 96-168hr)
Day 22 - AUC_{last}			
	350 IU/kg	490±137 (n=8) (t_{last} range: 24-168hr)	2507156±775580 (n=8) (t_{last} range: 24-168hr)
	1300 IU/kg	1754±607 (n=8) (t_{last} range: 24-168hr)	7218768±1773257 (n=8) (t_{last} range: 24-168hr)
	3750 IU/kg	3119±2620 (n=8) (t_{last} range: 24-168hr)	19147278±17109277 (n=8) (t_{last} range: 24-168hr)
Day 29 - AUC_{last}			
	350 IU/kg	402±170 (n=8) (t_{last} range: 48-888)	1596444±624661 (n=8) (t_{last} range: 48-576 hr)
	1300 IU/kg	1747±968 (n=8) (t_{last} range:48-744 hr)	11606274±9848149 (n=8) (t_{last} range:48-744 hr)
	3750 IU/kg	3910±2351 (n=4) (t_{last} range: 48-168 hr)	21302058±10959600 (n=4) (t_{last} range:48-168 hr)
Day 1 – $AUC_{(0\text{-}168hr)}$			
	350 IU/kg	379±69 (n=8)	1950656±277471 (n=8)
	1300 IU/kg	1363±196 (n=8)	5778769±705564 (n=8)
	3750 IU/kg	4417±275 (n=8)	15416338±1234231 (n=7)
Day 22 - $AUC_{(0\text{-}168hr)}$			
	350 IU/kg	517±60 (n=7)	2650483±466860 (n=7)
	1300 IU/kg	1850±411(n=7)	7611873±1494526 (n=6)
	3750 IU/kg	5895±1517 (n=3)	37074221±12169922 (n=3)
Day 29 - $AUC_{(0\text{-}168hr)}$			

Assay		Clot (Activity assay)	ELISA (Concentration Assay)
	350 IU/kg	483±151 (n=2)	2332088±396762 (n=2)
	1300 IU/kg	2221±843 (n=3)	25045159±2214952 (n=2)
	3750 IU/kg	6985±NC (n=1)	28666832±6677363 (n=2)
Day 1 t ½ (hr)		hr	hr
	350 IU/kg	41-69	57-82
	1300 IU/kg	40-62	48-166
	3750 IU/kg	52-63	33-88
Day 22 t ½ (hr)			
	350 IU/kg	31-60	32-69
	1300 IU/kg	20-54	16-51
	3750 IU/kg	8-64	5-56
Day 29 t ½ (hr)			
	350 IU/kg	26-279	13-50
	1300 IU/kg	24-219	22-119
	3750 IU/kg	19-72	37-79

Additional Information: Data are presented here as taken from report, without rounding. Data are mean ±SD, except for t½ where a range is given. Clot (Activity assay): one-stage clotting assay; concentration assay: ELISA.

NC: not calculable. Last day of dosing: day 29**.** Main animals were taken down 48 hrs following the last dose at Day 29, and $AUC_{(0\text{-}168hr)}$ at Day 29 was determined from recovery animals only, therefore data from Day 22 are also shown where main and recovery animals had a 168 hr sample included. Sampling time points Day 1: pre-dose, 0.083, 2, 8, 24, 48, 96, 168 hrs; Day 22: pre-dose, 2, 24, 168 (=pre-dose following week) hrs; Day 29: pre-dose, 0.083, 2, 8, 24, 48 hrs (main animals) and additionally: 96, 168, 240, 408, 576, 744, 888 hrs (recovery animals). Some animals were euthanised before the last day of dosing as they had developed acquired haemophilia, due to the development of cross-reacting neutralising antibodies. $AUC_{(0\text{-}168hr)}$ Day 22 was based on n=7 for the low dose (350 U/kg), n=6-7 for the mid dose (1300 U/kg) and n=3 for the high dose (3750 U/kg). $AUC_{(0\text{-}168hr)}$ Day 29 was based on n=2-3 for the low dose (350 U/kg), n=2 for mid dose (1300 U/kg) and n= 1-2 for the high dose (3750 U/kg)

2.6.5.5 組織分布

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.5.5.A 定量的組織分布 (QWBA) - F9-KO マウスを用いる[^{3}H- 活性化ペプチド]-ノナコグベータペゴル

Title: [^{3}H]- activation peptide]-nonacog beta pegol: A study of distribution, by quantitative whole-body autoradiography, following intravenous administration to the haemophilic mouse		**Location in CTD:** 4.2.2.3.1 **Study ID:** 210169
Species	Mouse (F9-KO strain, B6.129P2-F9tmlDws/J)	
Gender (M/F) / Number of animals:	14 Male animals (7 for whole-body autoradiography and 7 for plasma production)	
Feeding condition:	Free access	
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in Water for Injection and pH corrected to 6.8.	
Method of Administration:	Intravenous	
Dose (mg/kg):	2.2 mg/kg [^{3}H-Activation peptide]-nonacog beta pegol (38 MBq/kg) corresponding to ~1.2 mg protein/kg or ~187 IU/kg, PEG load: 0.9 mg/kg[1]	
Radionuclide:	Tritium attached to a sialic acid moiety which again is bound to the activation peptide	
Specific Activity:	470 µCi/mg, equivalent to 17.4 MBq/mg)	
Sampling time:	1, 12, 24, 96, 168, 240 and 336 hours post-dose	
Analyte/Assay :	[^{3}H-Activation peptide]-nonacog beta pegol[2]/Tissue analysis by quantitative whole-body autoradiography, plasma analysis by liquid scintillation counting.	

Sampling times post dose	Mean µg equivalents of nonacog beta pegol/ gram of tissue						
	1 hour	12 hours	24 hours	96 hours	168 hours	240 hours	336 hours
Tissues/organs							
Plasma[a]	6.13	3.26	3.47	2.05	1.02	0.499	0.074
Adrenal cortex	15.1	4.81	11.3	6.73	3.40	1.29	1.34
Adrenal medulla	6.51	2.76	6.99	5.34	1.49	1.61	NS
Aortic wall	5.27	2.25	0.86	1.22	0.771	0.760	0.440
Blood	19.0	8.73	10.9	4.68	2.78	1.15	0.397
Bone marrow	5.86	1.76	3.77	3.92	1.79	0.779	0.561
Bone surface	0.326	0.581	0.412	0.255	0.357	0.143	0.080
Brain	0.131	0.057	0.077	0.096	0.072	0.071	0.054
Brown fat	0.852	0.323	0.448	0.643	0.209	0.257	0.125
Choroid plexus	5.68	0.376	0.326	0.330	0.276	0.233	0.129
Epididymis	0.341	0.576	0.753	1.08	0.787	0.269	0.427
Exorbital lachrymal gland	0.602	1.04	1.12	1.11	0.583	0.334	0.182
Gall bladder	20.2	BLQ	2.02	0.794	0.172	0.096	0.399
Harderian gland	0.483	0.447	0.362	0.788	0.585	0.174	0.204
Intra-orbital lachrymal gland	0.966	0.333	1.23	1.30	0.993	0.225	0.145
Kidney cortex	7.19	2.81	3.75	2.51	1.68	0.785	0.522
Kidney medulla	3.56	2.43	3.84	3.78	1.92	0.617	0.832
Liver	17.9	4.18	6.18	5.97	3.48	1.43	0.784
Lung	4.20	1.07	1.46	2.57	1.09	0.403	0.452
Mandibular lymph nodes	0.251	0.553	1.19	1.71	0.709	0.186	0.340
Meibomium glands	0.576	0.971	1.09	1.18	0.812	0.534	0.260
Muscle	0.208	0.204	0.245	0.332	0.156	0.095	0.075
Myocardium	2.57	1.34	1.27	1.35	0.685	0.655	0.273
Nasal mucosa	4.23	1.24	4.19	1.20	1.39	0.576	0.718
Pancreas	0.264	0.248	0.333	0.406	0.420	0.194	0.155
Pineal body	0.727	0.490	5.04	0.549	0.482	0.129	0.269
Pituitary	2.35	0.673	0.836	1.71	1.80	1.06	0.229
Preputial gland	2.11	0.072	0.100	0.943	0.107	0.065	BLQ
Prostate	0.545	0.550	0.631	0.949	0.396	0.826	0.216
Salivary glands	0.731	0.922	0.876	1.37	0.839	0.385	0.219
Seminal vesicles	0.103	BLQ	0.093	BLQ	0.114	0.189	0.095
Skin	0.372	0.451	0.694	0.578	0.550	0.268	0.180

Sampling times post dose	Mean µg equivalents of nonacog beta pegol/ gram of tissue						
	1 hour	12 hours	24 hours	96 hours	168 hours	240 hours	336 hours
Spinal cord	0.186	0.083	0.093	0.112	0.067	0.066	0.058
Spleen	7.73	2.93	5.90	2.85	3.17	1.62	0.875
Testis	0.429	0.257	0.363	0.325	0.304	0.218	0.114
Thymus	0.382	0.184	0.599	0.999	0.679	0.403	0.120
Thyroid	1.84	1.50	3.64	1.38	1.23	0.777	0.421
Tongue	2.66	0.895	2.97	2.18	1.67	0.669	0.743
Tooth pulp	6.22	1.41	3.50	1.82	0.848	0.322	0.481
Urinary bladder wall	1.68	0.897	0.073	0.951	0.215	0.547	0.179
Uveal tract/retina	1.17	0.877	0.235	0.282	0.238	0.257	0.263
White fat	0.056	BLQ	0.085	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Oesophageal wall	0.308	1.34	1.12	0.951	0.956	0.499	0.394
Stomach mucosa (fundus)	0.505	0.413	0.948	1.18	0.650	0.559	0.365
Stomach mucosa (non-fundic)	0.777	0.858	0.618	1.08	0.734	0.228	0.211
Small intestine mucosa	1.63	0.691	1.39	1.06	0.432	0.441	0.183
Caecum mucosa	0.741	0.475	0.992	NS	0.327	0.287	0.191
Large intestine mucosa	0.352	0.561	0.863	1.39	0.269	0.415	0.250
Rectum mucosa	0.331	0.522	1.61	0.556	0.786	0.235	0.215

[a] Radioactivity determined by liquid scintillation counting (limit of detection (LOD) = 0.0003 µg equivalents/g)

[b] The upper limit of quantification was 24.7 µg equivalents/g for all measurements and the lower limit of quantification was 0.052 µg equivalents/g for all measurements.

BLQ = Radioactivity concentration below lower limit of quantification.

NS = Tissue not sectioned

Additional information:

[1]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report

[2]The tracer was named [^{3}H]Sia-rFIX-40K-PEG in the report

2.6.5.5.B 定量的組織分布 (QWBA) 及びミクロオートラジオグラフィ (MARG) – マウスを用いる[^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴル

	Location in CTD: 4.2.2.3.3 **Study ID:** 212166
Species	Mouse (F9-KO strain, B6.129P2-F9tmlDws/J)
Gender (M/F) / Number of animals:	1 mouse per time point, 9M for QWBA and 3M for MARG
Feeding condition:	Free access
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in Water for Injection and pH corrected to 6.8.
Method of Administration:	Intravenous
Dose (mg/kg):	2.8 mg/kg [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol (68 MBq/kg) - corresponding to ~ 1.6 mg protein/kg or ~238 IU/kg, PEG-load: 1.2 mg/kg.[1]
Radionuclide:	[^{3}H] (positioned in the PEG moiety)
Specific Activity:	0.63Ci/mg (equivalent to 23 MBq/mg)
Sampling time:	1, 12, 24, 96, 168, 336, 840, 1512 and 2016 hours post dose
Analyte/Assay :	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/Tissue analysis by quantitative whole-body autoradiography, plasma analysis by liquid scintillation counting.

		µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
Tissue group	**Sample → Sampling time (hours)**	**1**	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Blood-vascular	Plasma[a]	27.0	12.6	10.2	3.51	3.37	1.05	0.311	0.101	0.109
	Reconstituted plasma[a]	27.2	12.0	10.0	2.60	2.12	1.07	0.273	0.100	0.116
	Aortic wall	2.44	4.44	3.10	1.25	1.90	1.24	0.785	BLQ	BLQ
	Blood	22.3	10.8	11.3	2.35	2.28	0.840	0.230	BLQ	0.130
Lymphatic	Bone marrow	7.17	7.22	9.09	2.62	4.99	5.27	0.577	0.267	0.358
	Lymph	7.67	5.50	2.71	2.02	4.80	2.90	1.80	0.698	3.49
	Mandibular lymph node	2.23	1.53	1.06	1.11	2.78	1.79	1.21	0.125	1.63
	Spleen	8.42	10.2	6.92	2.92	4.87	5.42	1.54	0.207	0.265
Excretory	Gall bladder	3.79	2.91	3.55	0.729	1.81	0.217	0.175	BLQ	0.054
	Kidney cortex	7.83	8.20	4.42	1.36	1.32	0.665	0.200	BLQ	0.083
	Kidney medulla	11.0	9.21	7.74	2.07	2.29	1.42	0.458	0.107	0.090

Tissue group	Sample → Sampling time (hours)	µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
	Liver	22.5	17.5	17.2	4.54	9.05	3.10	2.39	0.232	0.295
	Urinary bladder wall	4.45	1.46	0.580	0.409	0.743	0.273	0.469	0.109	0.078
	Urine	54.0	9.71	1.30	0.425	0.620	0.400	0.223	0.059	0.092
Respiratory	Lung	8.36	4.28	2.29	1.59	1.06	0.258	0.295	0.094	0.188
	Nasal mucosa	1.03	3.07	1.50	0.629	1.41	0.516	0.668	0.061	0.088
	Trachea	1.11	NS	0.747	NS	NS	1.04	0.368	NS	0.375
Reproductive	Bulbo-urethral gland	3.64	2.58	1.83	1.52	2.65	1.06	0.328	0.132	0.580
	Epididymis	0.798	0.435	0.355	0.411	0.237	0.304	0.256	BLQ	BLQ
	Preputial gland	1.560	1.26	0.440	0.546	0.589	1.10	0.795	0.301	0.215
	Prostate	0.900	0.585	0.390	0.710	0.671	0.543	0.285	0.072	0.233
	Seminal vesicles	0.194	0.135	0.466	0.265	0.049	0.090	0.060	BLQ	BLQ
	Testis	0.725	0.969	0.649	0.322	0.601	0.412	0.415	0.066	0.190
Endocrinal	Adrenal cortex	16.9	16.3	2.38	1.64	4.11	1.98	0.851	0.130	0.103
	Adrenal medulla	9.42	14.0	2.88	1.96	3.14	2.19	0.717	BLQ	BLQ
	Pancreas	0.804	0.761	0.714	0.565	0.598	1.30	0.942	0.305	0.519
	Pineal body	4.83	3.14	NS	0.690	1.93	0.746	0.239	0.106	0.260
	Pituitary gland	3.80	3.39	2.89	1.14	3.33	1.88	1.22	0.293	0.431
	Thymus	0.544	0.717	0.842	0.685	1.10	0.612	0.249	0.096	0.125
	Thyroid gland	3.44	2.91	4.30	1.40	3.35	2.21	1.64	0.619	0.329
Ocular	Exorbital lachrymal gland	0.587	2.16	1.56	1.08	2.00	2.09	1.39	0.146	0.475
	Harderian gland	0.524	0.782	0.518	0.540	1.31	0.871	0.787	0.099	0.543
	Intra-orbital lachrymal gland	1.11	1.77	1.60	0.952	1.45	1.51	1.21	0.202	0.459
	Lens	0.054	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Uveal tract/retina	1.610	1.58	1.64	0.736	2.49	0.633	0.896	0.320	0.912
Central nervous system	Brain	0.265	0.172	0.121	BLQ	0.057	0.042	BLQ	BLQ	BLQ
	Choroid plexus	0.276	0.458	0.512	0.358	0.533	0.479	0.265	0.129	0.126
	Meninges	1.15	0.645	0.678	0.360	1.09	0.287	0.242	0.073	BLQ
	Spinal cord	0.334	0.190	0.211	0.072	0.173	0.044	BLQ	BLQ	0.044
Gastrointestinal	Caecum mucosa	0.783	2.28	1.33	0.418	0.493	0.725	0.251	BLQ	BLQ
	Large intestine mucosa	0.506	1.72	0.941	0.603	1.24	0.647	0.229	0.059	0.103
	Oesophageal wall	0.631	0.809	1.27	0.492	1.55	0.303	0.262	0.108	0.420
	Rectum mucosa	0.647	0.923	1.14	0.539	0.952	0.984	0.340	0.292	0.400
	Small intestine mucosa	1.15	1.24	2.56	0.402	0.580	0.270	0.136	0.050	0.313

Tissue group	Sample → Sampling time (hours)	µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
	Stomach mucosa (fundic)	1.79	2.28	1.80	0.937	0.695	0.700	0.406	0.147	0.217
	Stomach mucosa (non-fundic)	0.480	1.14	1.93	0.874	0.710	0.735	0.161	0.057	0.224
Adipose	Brown fat	0.560	0.394	0.137	0.377	0.152	0.329	0.128	BLQ	0.147
	White fat	0.075	0.120	0.068	0.055	0.060	BLQ	0.084	BLQ	0.041
Oral	Periodontal membrane	3.73	1.83	2.12	1.50	0.966	1.14	BLQ	BLQ	BLQ
	Salivary glands	1.05	1.45	1.39	0.885	1.88	2.47	1.77	0.543	1.03
	Tongue	1.44	2.78	1.93	0.554	1.22	1.29	0.201	0.060	0.166
	Tooth pulp	3.26	1.48	2.40	1.71	1.96	0.410	BLQ	BLQ	BLQ
Unclassified	Bone surface	2.08	3.09	4.04	0.457	1.08	1.07	0.834	BLQ	BLQ
	Epimysium	1.07	0.685	0.760	0.523	0.619	0.857	0.835	BLQ	BLQ
	Fur	0.064	0.111	0.087	0.151	0.274	0.069	0.047	BLQ	0.063
	Muscle	0.329	0.231	0.180	0.178	0.294	0.203	0.129	0.049	BLQ
	Myocardium	2.87	4.36	3.10	1.17	1.48	1.24	0.746	0.125	0.328
	Skin	0.206	0.680	0.286	0.500	0.986	0.592	0.665	0.108	0.168
	Upper limit of quantification =	28.2 µg equiv/g for all measurements								
	Lower limit of quantification =	0.040 µg equiv/g for all measurements								

[a]Radioactivity determined by liquid scintillation counting (Limit of detection (LOD) for plasma and reconstituted plasma = 0.0005 µg equiv/g).
BLQ – Radioactivity concentration below lower limit of quantification
NS – Not sectioned

Additional Information:
[1]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report.
[2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report.
The concentration of radioactivity was investigated in plasma as well as in freeze dried plasma. This was done in order to asses the stability of the ^{3}H-tracer. The tracer was wound to be stable as very little or no difference between the two assessments were found (e.g. no or very small amounts of tritiated water was found in plasma).

A micro autoradiography part was also included in the study in order to assess distribution into selected tissue (liver, kidney, spleen, brain, testis, heart, adrenal, and bone marrow) at a microscopic level at three selected time points (1, 24 and 96 h). Overall the micro autoradiography study confirmed the results obtained in the QWBA study detecting radioactivity in the same organs. Furthermore, the study also demonstrated uptake of radioactivity in hepatocytes, kupffer cells and choroid plexus epithelial cells. Low levels of radioactivity, very close to background levels, were detected in the cerebrospinal fluid.

2.6.5.5.C 定量的組織分布 (QWBA) 及びミクロオートラジオグラフィ (MARG) – ラットを用いる[^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴル

Location in CTD: 4.2.2.3
Study ID: 214076

Species	Han Wistar rats
Gender (M/F) / Number of animals:	1 rat per time point, 9M for QWBA and 3M for MARG
Feeding condition:	Free access
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in water for injection and pH corrected to 6.8.
Method of Administration:	Intravenous
Dose (mg/kg):	1.5 mg/kg nonacog beta pegol (27 MBq/kg) corresponding to ~0.9 mg protein/kg or ~127 IU/kg, PEG-load ~ 0.6 mg/kg)[1]
Radionuclide:	[^{3}H] (positioned in the PEG moiety)
Specific Activity:	480 µCi/mg (equivalent to 17.8 MBq/mg)
Sampling time:	1, 12, 24, 96, 168, 336, 840, 1512 and 2016 hours post dose
Analyte/Assay :	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/Tissue analysis by quantitative whole-body autoradiography, plasma analysis by liquid scintillation counting.

		µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
Tissue group	**Sample → Sampling time (hours)**	**1**	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Blood-vascular	Plasma (freeze dried)[a]	14.3	13.5	7.96	2.39	1.73	0.764	0.125	0.041	0.012
	Plasma[a]	15.9	13.2	8.45	3.19	1.61	0.877	0.134	0.038	0.014
	Aortic wall	9.88	2.73	2.25	1.18	0.632	0.553	BLQ	BLQ	BLQ
	Blood LSC	12.3	9.29	5.79	2.44	1.40	0.581	0.093	0.027	0.010
	Blood WBA	14.5	7.13	8.01	2.21	0.965	0.653	0.072	BLQ	BLQ
Lymphatic	Bone marrow	3.20	2.79	3.14	1.63	1.22	1.75	0.184	0.086	0.277
	Lymph	2.86	2.27	4.99	4.31	5.14	13.7	9.64	6.15	BLQ
	Mandibular lymph node	1.19	1.46	2.41	1.21	0.79	4.05	1.25	0.150	0.059
	Spleen	5.47	5.54	6.39	3.98	5.38	5.74	2.97	0.366	0.101
Excretory	Bile ducts	18.5	14.9	17.8	5.00	7.15	4.77	BLQ	BLQ	BLQ
	Kidney cortex	4.80	3.93	3.01	1.45	1.05	0.643	0.198	0.093	BLQ
	Kidney medulla	5.97	6.47	4.54	1.64	1.14	0.860	0.266	0.093	0.082
	Liver	12.5	9.23	8.47	4.30	6.09	4.33	2.08	0.889	0.161
	Urinary bladder wall	6.73	0.825	1.92	0.633	0.682	0.401	0.051	BLQ	BLQ

Tissue group	Sample → Sampling time (hours)	µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
	Urine	10.6	0.573	0.202	0.535	0.520	0.351	0.146	BLQ	BLQ
Respiratory	Lung	8.05	5.24	5.31	1.45	1.15	0.700	0.104	BLQ	BLQ
	Nasal mucosa	0.771	0.839	1.19	1.06	0.294	0.791	0.139	0.141	0.051
	Trachea	1.26	2.11	1.54	0.890	0.378	0.573	0.056	BLQ	BLQ
Reproductive	Bulbo-urethral gland	0.813	4.02	5.05	2.20	1.93	1.58	0.162	BLQ	0.081
	Epididymis	0.220	0.395	0.520	0.752	0.094	0.203	0.086	BLQ	0.060
	Preputial gland	0.179	0.563	0.186	0.522	0.202	0.274	0.119	BLQ	BLQ
	Prostate	0.345	0.499	0.912	0.309	0.261	0.424	0.168	0.116	BLQ
	Seminal vesicles	0.184	0.091	0.137	0.170	0.104	BLQ	0.063	BLQ	BLQ
	Testis	0.689	1.04	0.857	0.461	0.441	0.616	0.119	0.085	0.057
Endocrinal	Adrenal cortex	14.5	8.02	12.0	2.46	3.01	2.80	0.151	2.62	0.709
	Adrenal medulla	12.0	6.08	11.1	3.91	5.01	2.40	0.219	2.64	0.170
	Pancreas	0.868	0.862	1.18	0.908	1.08	1.16	0.444	0.492	0.308
	Pineal body	0.832	2.16	1.03	1.71	0.562	2.05	1.57	1.35	0.873
	Pituitary	1.26	2.64	2.95	1.68	1.22	2.06	0.802	1.18	0.214
	Thymus	0.309	0.260	0.494	0.558	0.326	0.332	0.117	0.077	0.058
	Thyroid	1.90	3.08	3.15	1.46	1.11	1.72	0.346	0.167	0.136
Ocular	Exorbital lachrymal gland	0.586	1.03	0.831	1.16	1.64	1.42	1.17	0.945	0.334
	Harderian gland	0.138	0.289	0.651	0.417	2.15	1.46	0.227	0.135	0.068
	Intra-orbital lachrymal gland	0.393	0.614	1.15	0.724	1.04	1.05	0.340	0.445	0.167
	Lens of the eye	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Uveal tract/retina	0.470	1.07	1.69	1.03	0.856	0.532	0.174	0.118	BLQ
Central nervous system	Brain	0.276	0.130	0.262	0.069	BLQ	0.053	BLQ	BLQ	BLQ
	Choroid plexus	0.679	1.09	1.14	0.899	0.442	0.536	0.192	0.685	0.264
	Meninges	0.468	0.400	1.62	0.566	0.156	0.379	0.092	0.498	0.116
	Spinal cord	0.159	0.094	0.138	0.053	0.059	0.065	BLQ	BLQ	BLQ
Gastrointestinal	Caecum mucosa	1.01	4.30	2.38	1.25	0.805	1.22	0.434	0.534	0.054
	Large intestine mucosa	0.457	0.703	1.52	0.713	0.384	0.402	0.292	BLQ	BLQ
	Oesophageal wall	0.704	0.580	0.845	0.712	0.488	0.253	0.070	BLQ	BLQ
	Rectum mucosa	0.202	1.19	1.11	0.975	0.944	0.454	0.194	0.083	BLQ
	Small intestine mucosa	1.63	2.32	3.62	1.06	0.753	0.907	0.365	0.165	BLQ
	Stomach mucosa (fundus)	0.715	0.617	1.36	0.824	0.878	0.626	0.133	0.064	BLQ
	Stomach mucosa (non-fundic)	0.412	0.746	1.94	0.535	0.847	0.629	0.205	BLQ	BLQ

Tissue group	Sample → Sampling time (hours)	µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Adipose	Brown fat	0.786	0.252	0.571	0.318	0.185	0.239	0.070	BLQ	BLQ
	White fat	0.058	BLQ	0.085	BLQ	BLQ	0.106	BLQ	BLQ	BLQ
Oral	Periodontal membrane	0.239	2.49	1.02	0.660	0.475	0.453	0.312	0.181	0.202
	Salivary glands	0.875	0.689	1.30	1.04	1.58	0.977	0.280	0.073	0.073
	Tongue	0.614	1.21	1.33	0.774	0.407	0.466	0.077	BLQ	BLQ
	Tooth pulp	1.10	3.00	2.38	2.77	1.86	3.99	0.062	0.278	0.728
Unclassified	Bone surface	0.053	0.116	0.103	BLQ	BLQ	0.070	BLQ	BLQ	BLQ
	Epimysium	0.280	0.438	0.522	0.459	0.498	0.346	0.216	BLQ	BLQ
	Fur	0.186	0.236	0.084	0.118	0.066	0.111	0.078	BLQ	BLQ
	Muscle	0.223	0.135	0.110	0.128	0.093	0.135	0.051	BLQ	BLQ
	Myocardium	2.47	2.84	3.58	0.950	0.669	0.444	0.069	BLQ	BLQ
	Skin	0.195	0.394	0.508	0.987	0.523	0.730	0.118	0.060	0.054
	Upper limit of quantification =	34.5 µg equiv/g for all measurements								
	Lower limit of quantification =	0.049 µg equiv/g for all measurements								

[a]Radioactivity determined by liquid scintillation counting (LOD for plasma and reconstituted plasma = 0.00006 µg equiv/g)
BLQ – Radioactivity concentration below lower limit of quantification

Additional Information:

[1]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report

The concentration of radioactivity was investigated in plasma as well as in freeze dried plasma. This was done in order to asses the stability of the ^{3}H-tracer. The tracer was wound to be stable as very little or no difference between the two assessments were found (e.g. no or very small amounts of tritiated water was found in plasma).

A micro autoradiography part was also included in the study in order to assess distribution into selected tissue (liver, kidney, spleen, brain, testis, heart, adrenal, and bone marrow) at a microscopic level at three selected time points (1, 24 and 96 h). Overall the micro autoradiography work complemented the results obtained in the QWBA study detecting radioactivity in the same organs. Furthermore, the study also demonstrated uptake of radioactivity in hepatocytes, kupffer cells and choroid plexus epithelial cells. Low levels of radioactivity (at background level) were detected in the cerebrospinal fluid.

2.6.5.5.D 定量的組織分布 (QWBA) 及びミクロオートラジオグラフィ (MARG) – ラットを用いる[^{3}H-PEG]

Location in CTD: 4.2.2.3
Study ID: 212213

Species	Han Wistar rats
Gender (M/F) / Number of animals:	1 rat per time point, 9M for QWBA and 3M for MARG
Feeding condition:	Free access
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride
Method of Administration:	Intravenous
Dose (mg/kg):	0.6 mg/kg (37MBq/kg)
Radionuclide:	[^{3}H] (positioned in the PEG moiety)
Specific Activity:	1.5 mCi/mg (equivalent to 55.5 MBq/mg)
Sampling time:	1, 12, 24, 96, 168, 336, 840, 1512 and 2016 hours post dose
Analyte/Assay :	[^{3}H-PEG][1]/Tissue analysis by quantitative whole-body autoradiography, plasma analysis by liquid scintillation counting.

Tissue group	**Sample → Sampling time (hours)**	**µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue**								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Blood-vascular	Plasma (freeze dried)[a]	4.88	2.53	2.02	0.749	0.306	0.189	0.039	0.012	0.007
	Plasma[a]	4.63	2.56	2.06	0.741	0.327	0.188	0.041	0.012	0.007
	Aortic wall	0.423	0.294	0.261	0.152	0.147	0.026	BLQ	BLQ	BLQ
	Blood	5.39	2.67	0.937	0.356	0.239	0.105	BLQ	BLQ	BLQ
Lymphatic	Bone marrow	0.840	0.537	0.204	0.227	0.254	0.056	0.023	BLQ	BLQ
	Lymph	0.906	1.58	0.976	3.27	3.08	1.26	1.39	2.81	0.616
	Mandibular lymph node	0.430	1.22	0.156	0.097	0.852	0.104	1.03	0.458	0.388
	Spleen	0.428	0.656	0.549	1.06	0.705	0.668	0.362	0.156	0.056
Excretory	Bile ducts	2.99	3.28	1.42	0.472	0.019	BLQ	0.140	BLQ	BLQ
	Kidney cortex	1.47	0.917	0.418	0.366	0.225	0.099	0.032	0.021	BLQ
	Kidney medulla	1.82	1.45	0.504	0.471	0.194	0.174	0.052	0.022	0.019
	Liver	1.05	0.637	0.326	0.248	0.339	0.123	0.092	0.046	0.018
	Urinary bladder wall	1.38	0.338	0.257	0.444	0.226	0.058	0.104	0.055	BLQ
	Urine	17.2	1.85	1.06	0.252	0.166	0.101	0.030	0.028	BLQ
Respiratory	Lung	3.64	1.57	0.791	0.445	0.202	0.064	0.029	0.020	BLQ
	Nasal mucosa	0.625	0.690	0.087	0.099	0.196	0.085	0.052	0.034	BLQ

Tissue group	Sample → Sampling time (hours)	µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
	Trachea	NS	0.134	NS	0.266	NS	0.071	0.032	BLQ	BLQ
Reproductive	Bulbo-urethral gland	0.742	1.86	0.503	0.285	0.232	0.221	0.080	0.043	BLQ
	Epididymis	0.444	0.152	0.145	0.081	0.165	0.036	0.056	0.105	0.046
	Preputial gland	0.104	0.030	0.076	0.048	0.051	0.018	BLQ	BLQ	BLQ
	Prostate	0.383	0.225	0.170	0.158	0.113	0.126	0.043	0.034	BLQ
	Seminal vesicles	0.445	0.107	0.120	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Testis	0.398	0.268	0.140	0.065	0.089	0.075	0.030	0.025	BLQ
Endocrinal	Adrenal cortex	1.21	0.322	0.167	0.088	0.111	0.032	0.096	0.023	BLQ
	Adrenal medulla	2.34	0.906	0.318	0.313	0.411	0.253	0.158	BLQ	0.035
	Pancreas	0.699	0.700	0.409	0.512	0.279	0.278	0.093	0.075	0.065
	Pineal body	0.378	0.600	0.254	0.623	0.364	0.358	0.377	0.484	0.180
	Pituitary	0.569	0.696	0.279	0.173	0.061	0.199	0.130	0.273	0.047
	Thymus	0.135	0.146	0.114	0.118	0.109	0.057	0.041	0.040	BLQ
	Thyroid	1.25	1.31	0.713	0.421	0.410	0.185	0.074	0.044	BLQ
Ocular	Exorbital lachrymal gland	0.440	0.466	0.338	0.254	0.194	0.046	0.153	0.202	0.089
	Harderian gland	0.225	0.293	0.069	0.170	0.169	0.073	0.083	0.031	0.023
	Intra-orbital lachrymal gland	0.274	0.433	0.176	0.187	0.159	0.165	0.164	0.128	BLQ
	Lens of the eye	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Uveal tract/retina	0.508	0.425	0.246	0.313	0.075	0.035	0.023	BLQ	BLQ
Central nervous system	Brain	0.043	0.031	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Choroid plexus	0.379	0.221	0.168	0.147	0.169	0.213	0.167	0.276	0.066
	Meninges	0.560	0.251	0.145	0.278	0.150	0.038	0.076	BLQ	BLQ
	Spinal cord	0.036	0.024	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Gastrointestinal	Caecum mucosa	0.483	0.267	0.366	0.135	0.220	0.305	0.057	0.038	0.039
	Large intestine mucosa	0.250	0.383	0.186	0.120	0.055	0.099	0.076	0.044	BLQ
	Oesophageal wall	0.149	0.300	0.133	0.211	0.107	0.085	0.034	BLQ	BLQ
	Rectum mucosa	0.232	0.722	0.168	0.126	0.123	0.183	0.036	0.039	BLQ
	Small intestine mucosa	0.596	0.213	0.161	0.230	0.103	0.039	0.038	0.055	BLQ
	Stomach mucosa (fundus)	0.763	0.575	0.284	0.227	0.182	0.226	0.023	0.048	BLQ
	Stomach mucosa (non-fundic)	0.136	0.261	0.086	0.079	0.039	0.048	BLQ	0.020	BLQ
Adipose	Brown fat	0.233	0.085	0.079	0.115	BLQ	0.071	BLQ	0.026	BLQ
	White fat	BLQ	0.069	BLQ	0.029	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

Tissue group	Sample → Sampling time (hours)	µg equivalents nonacog beta pegol/g of tissue								
		1	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Oral	Periodontal membrane	2.51	0.838	0.643	0.252	0.209	0.102	0.031	BLQ	BLQ
	Salivary glands	0.878	0.822	0.355	0.416	0.389	0.227	0.071	0.090	0.017
	Tongue	0.476	0.567	0.142	0.158	0.264	0.086	0.042	BLQ	BLQ
	Tooth pulp	0.857	2.11	0.742	0.706	0.361	0.207	0.472	BLQ	BLQ
Unclassified	Bone surface	0.122	0.127	0.065	0.079	0.028	0.023	BLQ	BLQ	BLQ
	Epimysium	0.224	0.390	0.381	0.149	0.204	0.091	0.050	BLQ	BLQ
	Fur	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.026	BLQ	BLQ
	Muscle	0.099	0.127	0.049	0.047	0.037	0.022	BLQ	BLQ	BLQ
	Myocardium	0.916	0.614	0.207	0.148	0.072	0.046	0.023	BLQ	BLQ
	Skin	0.176	0.231	0.154	0.148	0.175	0.092	0.048	0.033	BLQ
	Upper limit of quantification =	12.0 µg equiv/g for all measurements								
	Lower limit of quantification =	0.017 µg equiv/g for all measurements								

[a]Radioactivity determined by liquid scintillation counting (LOD for plasma and reconstituted plasma = 0.00016 µg equiv/g)
BLQ – Radioactivity concentration below lower limit of quantification
NS – not sectioned

Additional Information:
[1]The tracer was named [^{3}H]-PEG in the report.
The concentration of radioactivity was investigated in plasma as well as in freeze dried plasma. This was done in order to asses the stability of the ^{3}H-tracer. The tracer was wound to be stable as very little or no difference between the two assessments were found (e.g. no or very small amounts of tritiated water was found in plasma).

A micro autoradiography part was also included in the study in order to assess distribution into selected tissue (liver, kidney, spleen, brain, testis, heart, adrenal, and bone marrow) at a microscopic level at three selected time points (1, 24 and 96 h). Overall the micro autoradiography work complemented the results obtained in the QWBA study detecting radioactivity in the same organs. Furthermore, the study also demonstrated uptake of radioactivity in hepatocytes, kupffer cells and choroid plexus epithelial cells. Low levels of radioactivity were detected in the cerebrospinal fluid.

2.6.5.6 血漿蛋白結合

Test Article: Nonacog beta pegol

Nonacog beta pegol is not expected to interact with plasma proteins (albumin & alfa 1-acid glyco protein) and therefore no investigations have been performed in relation to plasma protein binding.

2.6.5.7 妊娠中又は授乳期の動物での試験

Test Article: Nonacog beta pegol

No studies performed.

2.6.5.8 その他の分布試験－組織分布

Test Article: Nonacog beta pegol

Title: Immunohistochemistry of selected tissue after a single dose of [^{3}H- activation peptide]-nonacog beta pegol intravenous to F9-KO mice.	**Location in CTD:** 4.2.2.3 **Study ID:** 210167

Species	Mouse (F9-KO strain, B6.129S4-F8t-m1Kaz, E16)
Gender (M/F) / Number of animals:	6 Male animals
Feeding condition:	Free access
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in water for injection and pH corrected to 6.8.
Method of Administration:	Intravenous
Dose (mg/kg):	2.2 mg/kg nonacog beta pegol (~1.2 mg protein/kg or ~187 IU/kg, PEG load: 0.9 mg/kg)[1]
Radionuclide:	Tritium attached to a sialic acid moiety which again is bound to the activation peptide
Specific Activity:	42.17 Ci/mmol (equivalent to 470 µCi/mg or 17.4 MBq/mg)
Sampling time:	1, 24 and 168 hours post-dose
Analyte/Assay :	[^{3}H- activation peptide]-nonacog beta pegol[2]/Immunohistochemical staining

Tissue	**1 hour post dose**		**24 hour post dose**		**168 hour post dose**	
	PEG	**rFIX**	**PEG**	**rFIX**	**PEG**	**rFIX**
Liver	+/+	(+)/(+)	+/+	+/-	-/-	-/-
Kidney	+/+	(+)/-	+/(+)	-/-	-/-	-/-
Testis	+/+	+/+	+/(+)	(+)/(+)	-/-	(+)/-
Brain (Choroid plexus)	+/+	-/-	(+)/(+)	(+)/(+)	(+)/-	(+)/-

+ = positive staining; (+) = weak positive staining; - = negative staining

[1]The values for mg protein/ kg, IU/kg and PEG load are not listed in report. [2]The tracers is named [^{3}H]Sia-rFIX-40K-PEG in the report.

2.6.5.9 *In Vivo* 代謝

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.5.9.A F9-KO マウスにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後の HPLC を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング – 214438

Species	Mouse (F9-KO strain, B6.129P2-F9tmlDws/J)
Gender (M/F) / Number of animals	Plasma: pool of 2M per time point. Urine and faeces: pool of 4M per time point.
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection. pH = 6.8.
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	2.8 mg/kg [^{3}H]PEG-nonacog beta pegol (68.4 MBq/kg) - corresponding to ~ 1.6 mg protein/kg or ~238 IU/kg, PEG-load: 1.2 mg/kg.
Samples	Plasma, urine and faeces[1]
Radionuclide	[^{3}H] positioned in the PEG moiety
Analyte/Assay	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/HPLC combined with radioactivity detection (Topcounter or Liquid scintillation counting (LSC))
Study ID	214438
Location in CTD	4.2.2.4
Results	Selected plasma (15 min, 1, 8, 24 h and 1, 2, 4, 5 weeks post dose), urine (0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 168-192 h (day 7) and day 22) and faeces (0-24, 24-48 and 48-72 h) sample were profiled using HPLC, fraction collection and subsequently off-line radioactivity detection. The results were evaluated qualitatively and revealed that [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol was degraded to [^{3}H-PEG] in plasma. Radiolabelled 40 kDa PEG and smaller PEGs were excreted both in urine and faeces over time. The *in vivo* stability of the [^{3}H-PEG] tracer was investigated as a part of another study where the amount of tritiated water was assessed (Table 2.6.5.5.B) and no or very small amounts of tritiated water was found in plasma. Tritiated water was detected in both urine and faeces as well as smaller sized PEGs suggesting that some degradation of PEG takes place in kidney and liver and/or in urine and faeces.

Additional information:
[1]Plasma and urine samples were collected in study 212160. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report.

2.6.5.9.B F9-KO マウスにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のゲル電気泳動を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング - 214456

Species	Mouse (F9-KO strain, B6.129P2-F9tmlDws/J)
Gender (M/F) / Number of animals	Plasma: pool of 2M per time point. Urine: pool of 4M per time point.
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection. pH = 6.8.
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	2.8 mg/kg [^{3}H]PEG-nonacog beta pegol (68.4 MBq/kg) - corresponding to ~ 1.6 mg protein/kg or ~238 IU/kg, PEG-load: 1.2 mg/kg.
Samples	Plasma and urine[1]
Radionuclide	[^{3}H] positioned in the PEG moiety
Analyte/Assay	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/gel electrophoresis combined with radioactivity detection (Liquid scintillation counting (LSC))
Study ID	214456
Location in CTD	4.2.2.4
Results	Selected plasma (15 min, 1, 8, 24 h and 1, 2, 4, 5 weeks post dose) and urine (0-24 and 72-96 h post dose) samples were profiled by gel electrophoresis and subsequently the gel lanes where sectioned and the radioactivity was measured by off-line radioactivity detection. The results were evaluated qualitatively and revealed that [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol was circulating in plasma and was degraded over time to [^{3}H-PEG] and detected in urine together with smaller [^{3}H-PEG] related components.

Additional information:
[1]Plasma and urine samples were collected in study 212160. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report

2.6.5.9.C ラットにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後の HPLC を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング – 215080

Species	Han Wistar rats
Gender (M/F) / Number of animals	Plasma: pools from 6M. Urine and faeces: pools from 3M
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection. pH = 6.8.
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	1.5 mg/kg [^{3}H]PEG-nonacog beta pegol (27 MBq/kg) - corresponding to ~ 0.8 mg protein/kg or ~120 IU/kg, PEG-load: 0.6 mg/kg.
Samples	Plasma, urine and faeces[1]
Radionuclide	[^{3}H] positioned in the PEG moiety
Analyte/Assay	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/HPLC combined with radioactivity detection (either via Topcounter or Liquid scintillation counting (LSC))
Study ID	215080
Location in CTD	4.2.2.4
Results	Selected plasma (5 min, 8 h, 24 h, 1 week, 2 weeks and 4 weeks), urine (0-24 h, 24-48 h and 48-72 h) and faeces (0-24 h, 24-48 h and 48-72 h) sample were profiled using HPLC, fraction collection and subsequently off-line radioactivity detection. The results were evaluated qualitatively and revealed that [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol circulating in plasma was degraded over time to [^{3}H-PEG]. Radiolabelled 40 kDa PEG and smaller PEGs were excreted both in urine and faeces over time. The *in vivo* stability of the [^{3}H-PEG] tracer was investigated as a part of another study where the amount of tritiated water was assessed (Table 2.6.5.5.C) and no or very small amounts of tritiated water was found in plasma. Tritiated water was detected in both urine and faeces as well as smaller sized PEGs suggesting that degradation of PEG takes place in kidney and liver and/or in urine and faeces.

Additional information:
[1]Plasma and urine samples were collected in study 214077. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report.

2.6.5.9.D ラットにノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のゲル電気泳動を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング - 215081

Species	Han Wistar rats
Gender (M/F) / Number of animals	Plasma: pool of 6M per time point. Urine: pools from 3M
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection. pH = 6.8.
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	1.5 mg/kg [^{3}H]PEG-nonacog beta pegol (27 MBq/kg) - corresponding to ~ 0.8 mg protein/kg or ~120 IU/kg, PEG-load: 0.6 mg/kg.
Samples	Plasma and urine[1]
Radionuclide	[^{3}H] positioned in the PEG moiety
Analyte/Assay	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/gel electrophoresis combined with radioactivity detection (Liquid scintillation counting (LSC))
Study ID	215081
Location in CTD	4.2.2.4
Results	Selected plasma (5 min, 24 h, 1 week and 3 weeks post dose) and urine (0-24, 24-48, 48-72) samples were profiled by gel electrophoresis and subsequently the gel lanes where sectioned and the radioactivity was measured by off-line radioactivity detection. The relative content of compounds in plasma changed over time from primarily containing [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol to primarily containing [^{3}H]PEG. Only [^{3}H]PEG was observed in the 0-24 h urine sample, indicating that [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol was not excreted in the urine. The amount of radioactivity in urine samples taken at later time points were found to be too low for analysis. Therefore, it was not feasible to elucidate the content in urine at later time points than up to 24 h post dosing.

Additional information:
[1]Plasma and urine samples were collected in study 214077. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report.

2.6.5.9.E　　ラットに 40KDa PEG を単回静脈内投与後の HPLC を用いる血漿中、尿中、糞中代謝プロファイリング　– 215078

Species	Han Wistar rats
Gender (M/F) / Number of animals	Plasma: pools from 6M. Urine and faeces: pools from 3M
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	0.9% sodium chloride
Method of Administration	i.v.
Dose (mg/kg)	1 mg/kg (29MBq/kg)
Samples	Plasma, urine and faeces[1]
Radionuclide	[^{3}H] positioned in the PEG moiety
Analyte/Assay	40 kDa [^{3}H-PEG][2]/ HPLC combined with radioactivity detection (Topcounter or Liquid scintillation counting (LSC))
Study ID	215078
Location in CTD	4.2.2.4
Results	Selected plasma (5 min, 1h, 8 h, 24 h, 1 week, 2 weeks, 4 weeks and 5 weeks), urine (0-24 h, 24-48 h, 48-72 h, 72-96 h, day 7 and day 21) and faeces (0-24 h, 24-48 h and 48-72 h) sample were profiled using HPLC, fraction collection and subsequently off-line radioactivity detection. The results were evaluated qualitatively and revealed that 40 kDa [^{3}H]PEG was found to be present in plasma up to the last analysed sample (5 weeks post dose). The 40 kDa [^{3}H]PEG was eliminated over time as 40 kDa PEG and smaller sized PEGs in both urine (analysed up to 3 weeks post dose) and faeces (analysed up to 72 h post dose). Volatile components (expected to be predominantly tritiated water) was observed in plasma, urine and faeces. The amount was not quantified, but was estimated to be relatively small in plasma, and larger in urine and faeces. The presence of smaller sized PEGs and volatile components in urine and faeces suggest degradation of the 40 kDa [^{3}H]PEG tracer in kidneys and liver and/or in urine and faeces.

Additional information:
[1]Plasma and urine samples were collected in study 212115. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG in the report.

2.6.5.10 *In Vitro* 代謝

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.5.10.A *In vitro* ラット血球分配 – 214152

Matrix	Pool of fresh blood from at least three Han Wistar rats
Vehicle/Formulation	The vehicle consisted of sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) and Water for Injection (1 mL). pH = 6.8.
Test concentration	4 and 100 µg/ml, 0.224 and 5.71 MBq/ml
Analyte	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol$_{1}$
Specific activity	0.82 mCi/mg (corresponding to 30.3 MBq/mg)
Assay	Liquid scintillation counting (LSC)
Method	Separate blood samples were collected into tubes coated with K_2EDTA, 3.8% citrate or lithium heparin, and pooled by anticoagulant. Blood cell partitioning was determined following incubation of blood samples fortified with the test compound at nominal concentrations of 4 and 100 µg/mL. Duplicate rat blood samples fortified with the test compound were incubated at 37^{o}C for 0, 15, 30, 60 and 120 minutes. Prior to incubations, an aliquot of each blood sample was analysed to calculate the haematocrit (packed cell volume). Duplicate blood samples were then fortified with [3H]PEG-N9-GP at 2 concentrations (4 and 100 µg/mL) and incubated at ca. 37°C for 0, 15, 30, 60 and 120 minutes on a rotary mixer. After incubation, an additional packed cell volume determination was made and aliquots of blood analysed for radioactivity following solubilisation and liquid scintillation counting. The remainder of each blood sample was centrifuged and aliquots of plasma analysed for radioactivity using liquid scintillation counting
Results	No notable uptake of [^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol into red blood cells was observed over the concentration range 4 to 100 µg/mL and the anticoagulant used did not affect uptake at the test concentrations investigated
Study ID	214152
Location in CTD	4.2.2.4

Additional information:

[1] The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report

2.6.5.11 推定代謝経路

Test Article: Nonacog beta pegol

The metabolism studies reveal that the 40 kDa PEG moiety is circulating in plasma for a longer time ($t_{½}$~15-18 days) than nonacog beta pegol ($t_{½}$~up to 2 days). The protein part of nonacog beta pegol is expected to be metabolised via proteases to minor components (peptides and/or amino acids) which is either endogenously reused or excreted in urine and faeces. The PEG related radioactivity was shown to be eliminated from plasma to urine and faeces in a biphasic manner, with first phase having an estimated half-life of approximately 2-3 days and a second phase with an estimated half-life of 15-18 days. The slow second phase elimination of PEG most likely represents PEG alone or PEG attached to the linker, after the protein part has been metabolised. PEG related components (40 kDa PEG and smaller sized PEG molecules) were found to be excreted both via urine and faeces in F9 KO mice with the majority excreted in the first fast phase.

2.6.5.12 薬物代謝酵素の誘導及び阻害

Test Article: Nonacog beta pegol

No non-clinical drug interaction studies were performed because no specific pharmacokinetic interactions with human coagulation factor IX are known or expected as nonacog beta pegol is not expected to be metabolised by the drug metabolising CYP450 enzymes nor bind to plasma proteins such as albumin or alfa-1-acid glycoprotein.

2.6.5.13 排泄

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.5.13.A [^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後の雄性血友病 B マウスにおける排泄 – 212160

Species:	Mouse (F9-KO strain, B6.129P2-F9tmlDws/J)	
Gender (M/F) / Number of animals:	4M	
Feeding condition:	Fed	
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in Water for Injection and pH corrected to 6.8.	
Method of Administration:	Intravenous	
Dose for group B1 (mg/kg):	2.8 mg/kg [^{3}H]PEG-nonacog beta pegol (68.4 MBq/kg) - corresponding to ~ 1.6 mg protein/kg or ~238 IU/kg, PEG-load: 1.2 mg/kg[1].	
Radionuclide:	[^{3}H] positioned in the PEG moiety	
Analyte/Assay	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/Liquid Scintillation Counting	
Excretion (% mean±SD) and time		
Urine 0-24 h	4.26 ±4.50	
Urine 0-8 days	7.75 ± 5.65	
Urine 0-85 days (12 weeks)	21.0 ± 6.58	
Faeces 0-24 h	7.63 ± 4.91	
Faeces 0-8 days	28.3 ± 5.56	
Faeces 0-85 days (12 weeks)	50.4 ± 5.85	
Cage wash 0-85 days[3]	19.4 ± 4.94	
Final cage wash 0-85 days	0.496 ± 0.098	
Cage debri	0.519 ± 0.548	
Carcass	10.8 ± 1.54	
Total (0-12 weeks)	**103 ± 13.1**	
Study ID	212160	
Location in CTD	4.2.2.5	

Additional Information: [1]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report. [3]Mouse urine is viscos, sticky and low in volume. The amount of radioactivity detected in cage wash is expected to originate from sticky urine so the values for urine and cage wash should be summed up in order to evaluate the total amount excreted in urine. The mice were kept in metabolism cages continuously for the first eight days of the study period and thereafter for 24-hour intervals on a weekly basis up to 85 days (~12 weeks) and the excretion recoveries are therefore interpolated values. An excretion balance study has not been performed in humans; so no human data are available for comparison.

2.6.5.13.B [^{3}H-PEG]-ノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のラットにおける排泄 – 214077

Species:	Han Wistar rats	
Gender (M/F) / Number of animals:	3M	
Feeding condition:	Fed	
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in Water for Injection and pH corrected to 6.8.	
Method of Administration:	Intravenous	
Dose (mg/kg):	1.5 mg/kg [^{3}H]PEG-nonacog beta pegol (27 MBq/kg) - corresponding to ~ 0.8 mg protein/kg or ~120 IU/kg, PEG-load: 0.6 mg/kg[1].	
Radionuclide:	[^{3}H] (positioned in the PEG moiety)	
Specific activity	0.48 mCi/mg (equivalent to 17.8 MBq/mg)	
Analyte/Assay	[^{3}H-PEG]-nonacog beta pegol[2]/Liquid Scintillation Counting	
Excretion (% mean) and time		
Urine 0-24 h	3.27 ± 0.546	
Urine 0-7 days	9.18 ± 0.528	
Urine 0-84 days (12 weeks)	35.8 ± 3.21	
Faeces 0-24 h	1.72 ± 0.833	
Faeces 0-7 days	11.1 ± 1.54	
Faeces 0-84 days (12 weeks)	27.6 ± 3.99	
Cage wash (0-84 days)[3]	8.38 ± 1.1	
Cage debri	0.011 ± 0.003	
Carcass	4.86 ± 1.9	
Total (0-12 weeks)	76.6 ± 4.44	
Study ID	214077	
Location in CTD	4.2.2.5	

Additional Information:

[1]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report. [2]The tracer was named [^{3}H]PEG-N9-GP in the report.[3]The amount of radioactivity detected in cage wash is expected to originate from urine sticking to the inner-surface of the metabolism cage so the values for urine and cage wash should be summed up in order to evaluate the total amount excreted in urine. The rats were kept in metabolism cages continuously for the first seven days of the study period and thereafter for 24-hour intervals on a weekly basis up to 12 weeks and the excretion recoveries are therefore interpolated values. An excretion balance study has not been performed in humans; so no human data are available for comparison.

2.6.5.13.C [^{14}C-linker]-ノナコグベータペゴルを単回静脈内投与後のラットにおける排泄 – 213466

Species:	Han Wistar rats	
Gender (M/F) / Number of animals:	3M	
Feeding condition:	Fed	
Vehicle/Formulation:	Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (1.55 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL) dissolved in Water for Injection and pH corrected to 6.8.	
Method of Administration:	Intravenous	
Dose (mg/kg):	0.30 mg/kg [^{14}C-linker]-nonacog beta pegol (0.16 MBq/kg) corresponding to ~0.16 mg protein/kg or ~25 IU/kg, PEG-load: 0.1 mg/kg[2]	
Radionuclide:	[^{14}C] positioned in the linker between the protein and the PEG moiety	
Specific activity	0.0014 mCi/mg (0.052 MBq/mg)	
Analyte/Assay	[^{14}C-linker]-nonacog beta pegol[2]/Liquid Scintillation Counting and Accelerated Mass Spectrometry	
Excretion (% mean) and time		
Urine 0-24 h	2.40 ± 0.323	
Urine 0-7 days	6.31 ± 0.811	
Urine 0-85 days (~12 weeks)	49.0 ± 10.1	
Faeces 0-24 h	0.724 ± 0.086	
Faeces 0-7 days	12.7 ± 0.445	
Faeces 0-85 days (12 weeks)	49.2 ± 3.75	
Cage wash (0-85 days)[1]	6.79 ± 1.09	
Carcass	7.34 ± 3.59	
Total (0-12 weeks)	112 ± 12.0	
Study ID	213466	
Location in CTD	4.2.2.5	

Additional Information:

[1]The corresponding protein and PEG doses are not listed in the report. [2]The tracer was named [^{14}C]PEG-N9-GP in the report.

[1]The amount of radioactivity detected in cage wash is expected to originate from urine sticking to the inner-surface of the metabolism cage so the values for urine and cage wash should be summed up in order to evaluate the total amount excreted in urine. Amount in cage debri has not been determined in this study. The rats were kept in metabolism cages continuously for the first seven days of the study period and thereafter for 24-hour intervals on a weekly basis up to 85 days (~12 weeks) and the excretion recoveries are therefore interpolated values. An excretion balance study has not been performed in humans; so no human data are available for comparison.

2.6.5.13.D [^{3}H-PEG]を単回静脈内投与後のラットにおける排泄 – 212115

Species:	Han Wistar rats			
Gender (M/F) / Number of animals:	3M per dose group			
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	0.9% sodium chloride			
Method of Administration:	Intravenous			
Dose (mg/kg):	1 mg/kg (29MBq/kg), 12 mg/kg (39 MBq/kg), 100 mg/kg (31 MBq/kg) and 200 mg/kg (37 MBq/kg)			
Radionuclide:	[^{3}H] (positioned in the PEG moiety)			
Assay	[^{3}H-PEG][1]/Liquid Scintillation Counting			
Excretion route (% mean) and time	**1 mg/kg**	**12 mg/kg**	**100 mg/kg**	**200 mg/kg**
Urine 0-24 h	46.9 ± 3.74	43.5 ±3.75	32.1 ± 4.92	37.5 ± 4.23
Urine 0-8 days	53.5 ± 3.23	52.0 ± 2.99	39.8 ± 4.88	44.6 ± 5.30
Urine 0-85 days (12 weeks)	68.7 ± 2.74	68.2 ± 1.08	52.0 ± 3.63	58.0 ± 6.12
Faeces 0-24 h	4.68 ± 1.14	2.98 ± 0.515	4.40 ± 3.87	1.97 ±0.548
Faeces 0-8 days	8.35 ± 0.858	8.43 ± 1.35	8.64 ± 3.71	7.40 ± 1.35
Faeces 0-85 days (12 weeks)	12.6 ± 1.49	13.4 ± 1.54	12.4 ± 4.23	12.0 ± 2.36
Cage wash (0-85 days)[2]	6.15 ± 2.77	5.12 ± 0.902	3.48 ± 1.62	4.39 ± 0.923
Cage debri	0.007 ± 0.012	ND	0.003 ± 0.004	0.007 ± 0.007
Carcass	5.43 ± 3.30	6.11 ± 4.14	20.3 ± 1.11	18.2 ±4.40
Total	92.8 ± 1.71	92.9 ± 3.23	88.2 ±3.20	92.6 ± 4.34
Study ID	212115			
Location in CTD	4.2.2.5			

Additional Information:

[1] The tracer was named [^{3}H]-PEG in the report

ND = not determined

[2]The amount of radioactivity detected in cage wash is expected to originate from urine sticking to the inner-surface of the metabolism cage so the values for urine and cage wash should be summed up in order to evaluate the total amount excreted in urine. The rats were kept in metabolism cages continuously for the first three days of the study period and thereafter for 24-hour intervals on a weekly basis up to day 85 (~ 12 weeks) and the excretion recoveries are therefore interpolated values. An excretion balance study has not been performed in humans; so no human data are available for comparison.

2.6.5.14 胆汁中排泄

Test Article: Nonacog beta pegol

This study type has not been performed for nonacog beta pegol.

2.6.5.15 薬物相互作用

Test Article: Nonacog beta pegol

No non-clinical drug-drug interaction studies were performed, since no known interactions between FIX and concomitant medications are known or have been reported.

2.6.5.16 その他の薬物動態試験：3 バッチのノナコグベータペゴルの薬物動態比較 - LEEH130101

Test Article: Nonacog beta pegol

Location in CTD: 4.2.2.7

Study ID: LEEH130101

Species	**F9-KO mice**	**F9-KO mice**	**F9-KO mice**
Gender (M/F) / Number of animals	15F per profile, 15 time points per profile, n=3 per time point	15F per profile, 15 time points per profile, n=3 per time point	3M/12F per profile, 15 time points per profile, n=3 per time point
Feeding condition	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	Final dosing solution concentration : 0.3 mg/mL nonacog beta pegol. Batch: NNC0156-0000-0009, CLDP010. 2000U/vial. One vial was reconstituted in 4.2 mL of histidine solvent (10 mM histidine), giving 4.3 mL of a 3.0 mg/mL solution Hereof 0.7 mL was further diluted in 6.3 mL vehicle buffer (CR40085; 2.34 mg/mL NaCl, 3.10 mg/mL histidine, 0.05 mg/mL polysorbate 80, 10 mg/mL sucrose, 25 mg/mL mannitol, pH 6.4), giving 7 mL of an	Final dosing solution concentration : 0.3 mg/mL nonacog beta pegol. Batch: NNC0156-0000-0009, CR40375. 500U/vial. One vial was reconstituted in 4.2 mL of histidine solvent (10 mM histidine) giving 4.3 mL of a 0.75 mg/mL solution. Hereof 2.8 mL was further diluted in 4.2 mL N9-GP vehicle buffer (CR40085; 2.34 mg/mL NaCl, 3.10 mg/mL histidine, 0.05 mg/mL polysorbate 80, 10 mg/mL sucrose, 25 mg/mL mannitol, pH 6.4), giving 7 mL of an	Final dosing solution concentration : 0.3 mg/mL nonacog beta pegol. Batch: NNC0156-0000-0009, DLDP001. 2000U/vial. One vial was reconstituted in 4.2 mL of histidine solvent (10 mM histidine), giving 4.3 mL of a 3.0 mg/mL solution. Hereof 0.7 mL was further diluted in 6.3 mL vehicle buffer (CR40085; 2.34 mg/mL NaCl, 3.10 mg/mL histidine, 0.05 mg/mL polysorbate 80, 10 mg/mL sucrose, 25

	0.3 mg/mL solution for dosing.	0.3 mg/mL solution for dosing.	mg/mL mannitol, pH 6.4), giving 7 mL of an 0.3 mg/mL solution for dosing.
Method of Administration	i.v.	i.v.	i.v.
Dose (mg/kg)	1.5 (27 nmol/kg or 240.3 IU/kg	1.5 (27 nmol/kg or 229.5 IU/kg)	1.5 (27 nmol/kg or 229.5 IU/kg)
Sample	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	FIX	FIX	FIX
Assay	LOCI and COA	LOCI and COA	LOCI and COA
PK parameters:			
LOCI:			
C_{max} (µg/L)	10247	11067	9913
$AUC_{(0\text{-}inf)}$ (µg*hr/L)	325302	362301	343125
$t_{1/2}$ (hr)	40.4	44.7	42.2
CL (ml/hr/kg)	4.6	4.1	4.4
COA:			
C_{max} (IU/L)	2054	1797	1709
$AUC_{(0\text{-}inf)}$ (IU*hr/L)	60435	52937	52937
$t_{1/2}$ (hr)	37.8	41.9	37.6
CL (ml/hr/kg)	4.0	4.7	4.3

Additional Information: LOCI: luminescent oxygen channeling assay. COA: two-stage chromogenic assay. Final dose solutions at similar concentration were made for the three batches to ensure similar dose volumes. Dose volume: 5 mL/kg**.** Animals were dosed in mg/kg. Dose values in IU/kg were calculated from the specific activity of the individual batches, which ranged 8.5-9.3 mIU/pmol). Conclusion: The pharmacokinetics of three batches of nonacog beta pegol were comparable. PK parameters were calculated based on composite or pooled mean plasma concentration per time point.