ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 4
表目次 4
略語一覧 5
2.6.6.1 まとめ 8
2.6.6.2 毒性試験のための動物種選択（Module 2.6.7.5、試験番号 HeBa080802） 12
2.6.6.3 単回投与毒性試験 13
2.6.6.3.1 ラットにおける N9-GP の単回静脈内（ボーラス）投与による比較試験（Module 2.6.7.5、試験番号 210259） 13
2.6.6.4 反復投与毒性試験 14
2.6.6.4.1 反復投与毒性試験－重要でない試験（GLP 非適用） 14
2.6.6.4.1.1 Rowett ヌードラット（Crl:NIH-Foxn1rnu）における週 2 回投与による 6 週間静脈内投与 PK 及び免疫原性試験（Module 2.6.7.6、試験番号 212143） 14
2.6.6.4.1.2 ノナコグ ベータ ペゴルの雄性カニクイザルにおける 13 週間投与免疫原性試験及び 5 週間回復試験（Module 2.6.7.6、試験番号 208405） 15
2.6.6.4.2 反復投与毒性試験－重要な試験（GLP 適用） 17
2.6.6.4.2.1 Rowett ヌード（Crl:NIH-Foxn1rnu）ラットにおける 5 日に 1 回静脈内投与による 26 週間試験（Module 2.6.7.7.A、試験番号 212513） 17
2.6.6.4.2.2 雄性カニクイザルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの 4 週間静脈内投与による毒性及び安全性薬理試験及び 5 週間回復試験（Module 2.6.7.7.B、試験番号 208260） 20
2.6.6.5 遺伝毒性試験 27
2.6.6.5.1 遺伝毒性試験 in vitro 27
2.6.6.5.2 遺伝毒性試験 *in vivo* 27
2.6.6.6 がん原性試験 27
2.6.6.7 生殖発生毒性試験 27
2.6.6.8 幼若動物を用いた試験 27
2.6.6.9 局所刺激性試験 28
2.6.6.9.1 ウサギにおける静脈周囲、静脈内及び動脈内投与による局所刺激性試験（Module 2.6.7.15、試験番号 210439） 28
2.6.6.9.2 Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与後の局所刺激性（Module 2.6.7.7.15、試験番号 212513） 29

2.6.6.9.3 カニクイザルにおける 4 週間反復投与後の局所刺激性（Module 2.6.7.7.15、試験番号 208260） 29
2.6.6.9.4 局所刺激性の結論 29
2.6.6.10 その他の毒性試験 30
2.6.6.10.1 比較免疫原性試験 30
2.6.6.10.1.1 ラットにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の静脈内投与による免疫原性試験（Module 2.6.7.16、試験番号 209353） 30
2.6.6.10.2 40 kDa PEG の毒性試験 31
2.6.6.10.2.1 Wistar Hannover ラットにおける 40 kDa PEG の 2 日に 1 回静脈内（ボーラス）投与による 2 及び 6 週間探索的毒性試験（Module 2.6.7.16、試験番号 209294） 31
2.6.6.10.2.2 カニクイザルにおける 40 kDa PEG の静脈内（ボーラス）投与による 2、6 及び 13 週間投与毒性試験（Module 2.6.7.16、試験番号 209215） 33
2.6.6.11 考察及び結論 34
2.6.6.11.1 免疫原性 34
2.6.6.11.2 PT 延長 35
2.6.6.11.3 全身の震え 37
2.6.6.11.4 PEG 化タンパク質に関連する PEG の組織分布 37
2.6.6.11.5 PEG 及び脈絡叢 38
2.6.6.11.6 結論 39
参考文献 40

図目次

ページ

図 2.6.6-1　ヒトの正常血漿に漸増濃度のノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を添加したときの PT 延長の濃度依存性 36
図 2.6.6-2　ヒトの正常血漿及び FIX 欠乏血漿へ低濃度の FIX（ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®：0～1 μmol/L）を添加したときの PT 延長 37
図 2.6.6-3　40 kDa PEG 単独又はノナコグ ベータ ペゴル投与後の血漿中及び脈絡叢上皮細胞内放射能活性 39

表目次

ページ

表 2.6.6-1　毒性試験の概略 9
表 2.6.6-2　試験デザイン－試験番号 210259 13
表 2.6.6-3　試験デザイン－試験番号 212143 15
表 2.6.6-4　試験デザイン－試験番号 208405 15
表 2.6.6-5　試験デザイン－試験番号 212513 17
表 2.6.6-6　死亡例及び死因 18
表 2.6.6-7　PT（秒）：対照群に対する変化量（%） 19
表 2.6.6-8　脳脈絡叢における PEG の IHC 染色－PEG 陽性動物数 19
表 2.6.6-9　試験デザイン－試験番号 208260 20
表 2.6.6-10 CNS に及ぼす影響の評価及び一般状態観察中にみられた全身の震えの要約 21
表 2.6.6-11 PT 及び投与後 24 時間値に対する%変化量 22
表 2.6.6-12 aPTT の群平均及び投与後 24 時間値に対する%変化量 22
表 2.6.6-13 次回の投与前に背景データの範囲（38.1 秒）を超える aPTT が測定された動物数 23
表 2.6.6-14 抗薬物抗体：陽性動物数/検査動物数 23
表 2.6.6-15 後天性血友病様の変化を示唆する一般状態観察、剖検及び顕微鏡的観察における兆候 25
表 2.6.6-16 試験デザイン－試験番号 210439 28
表 2.6.6-17 試験デザイン－試験番号 209353 30
表 2.6.6-18 ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を投与されたラットにおける抗体力価及び抗体形成日 31
表 2.6.6-19 試験デザイン－試験番号 209294 32
表 2.6.6-20 試験デザイン－試験番号 209215 33

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（申請有効期間内）
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（宿主細胞タンパク質）
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）

2.6.6.1 まとめ

ノナコグ ベータ ペゴルの非臨床安全性プログラムは、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）の、ICH S6 (R1) ガイドライン[1]、ICH M3 (R2) ガイドライン[2]、欧州医薬品庁（EMA）のヒト用医薬品委員会（CHMP）- Safety Working Party（SWP）の”recommendation to the Paediatric Committee (PDCO) for use of PEGylated drugs in children”[3] に従って策定した。重要な *in vivo* 安全性試験は、ラットにおいて 26 週間まで、カニクイザルにおいて 4 週間まで実施した。遺伝毒性試験及びがん原性試験は、ノナコグ ベータ ペゴル分子の特質を考慮すると意味のあるものとは考えられなかったため実施しなかった。適用患者集団は主として男性であることから生殖発生毒性試験は実施しなかった。局所刺激性試験はサル及びラットにおける反復毒性試験の一部として評価した。適用投与経路に従い、非臨床試験における投与経路は静脈内とした。重要な安全性試験は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）に準拠して実施した。EMA の勧告 [3] に従い、脳脈絡叢におけるポリエチレングリコール（PEG）を特異的に検出する免疫組織化学（IHC）を反復毒性試験に含め、脈絡叢に対する PEG の生体内分布を検討した。

実施した毒性試験の概略を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1　　毒性試験の概略

Type of study and duration	Route of administration	Species (*strain*)	Study ID	GLP (Yes/No)
Species selection	*NA* *(In vitro)*	Mouse (*C57/BL*), F9-KO mouse, rat (*Sprague Dawley*), rabbit (*New Zealand White*), monkey (*Macaca Fascicularis*)	HeBa080802	No
Single dose toxicity	i.v.	Rat (*Crl: WI (Han*))	210259	Yes
Repeat dose studies– non-pivotal				
6 weeks	i.v.	Rowett nude rat (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	212143	No
13 weeks	i.v.	Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*)	208405	No
Repeat dose toxicity studies -Pivotal				
26 weeks	i.v.	Rowett nude rat (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	212513	Yes
4 weeks	i.v.	Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*)	208260	Yes
Genotoxicity	Not performed, justification provided in 2.4.4.3			
Carcinogenicity	Not performed, justification provided in 2.4.4.4			
Reproductive and developmental toxicity studies	Not performed, justification provided in 2.4.4.5			
Juvenile toxicity	Not performed, justification provided in 2.4.4.6			
Local tolerance				
Local tolerance – rabbit ear	i.v.; i.a.; perivenous	Rabbit (*New Zealand White*)	210439	Yes
26 weeks repeat dose toxicity	i.v.	Rowett nude rat (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	212513	Yes
4 weeks repeat dose toxicity	i.v.	Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*)	208260	Yes

Type of study and duration	Route of administration	Species (*strain*)	Study ID	GLP (Yes/No)
Other toxicity				
Comparative immunogenicity	i.v.	Rat (*HsdHan™:WIST*)	209353	Yes
2 and 6 wk repeat dose toxicity study 40 kDa PEG	i.v.	Rat (*HsdHan™:WIST*)	209294	No
2, 6 and 13 wk repeat dose toxicity study 40 kDa PEG	i.v.	Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*)	209215	No

NA: not applicable

概して、ノナコグ ベータ ペゴルは、Wistar ラットにおける 2000 IU/kg までの単回投与、Rowett ヌードラットにおける 1200 IU/kg/5 日 26 週間の反復投与及びカニクイザルにおける 1300 IU/kg/週までの 4 週間反復投与において、良好な忍容性が認められた。無毒性量（NOAEL）は各試験の最高用量であった。

カニクイザルにおいて、高用量（3750 IU/kg/週）で軽度かつ一過性に全身の震え（body tremor）が認められた。全身の震えの意義は不明であるが、一過性であり、1 又は 2 回のみみられた変化であること、臨床推奨用量である 40 IU/kg の 75 倍の曝露量でのみみられた変化であることから、臨床の投与計画において安全性上の懸念要因にはならないと考えられた。

ヒト FIX はカニクイザルでは外来異物であることから、重要な試験である 4 週間反復投与毒性試験において、内因性 FIX と交叉反応する中和抗体の用量依存的な増加が中用量（1300 IU/kg/週）及び高用量（3750 IU/kg/週）群でみられ、後天性血友病様変化を生じた。引き続き、低用量（200 IU/kg/週）で実施した 13 週間投与による免疫原性試験では、内因性 FIX と交叉反応する中和抗体がみられた。その結果、後天性血友病様変化をもたらし、5～6 回投与後の体内曝露に影響が認められたことから、この動物種では意義のある長期投与による毒性評価は不可能であると考えられた。そこで、ノナコグ ベータ ペゴルの慢性毒性を評価可能とするため、Rowett ヌードラットを導入して免疫系を回避した。Rowett ヌードラットは胸腺が欠損しており、抗薬物抗体が形成されない。

Rowett ヌードラット及びカニクイザルともに、用量依存的なプロトロンビン時間（PT）の延長が認められた。投与に続く休薬期間中に採取した試料では、完全にベースライン値に戻っていることが確認された。*In vitro* 試験で高濃度の FIX は PT に影響を与えることが裏付けられており、Rowett ヌードラット及びカニクイザルでみられた PT 延長は、血漿中 FIX が極端に高濃度に到達したことによる測定法上のアーチファクトであると考えられた。生理的濃度の FIX で PT が影響を受けることは考えにくい。

標準的な病理組織学的検査に加えて、脳組織におけるノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分の存在について、IHC 染色（Rowett ヌードラット及びカニクイザル）を施して、また脳組織の透過型電子顕微鏡

観察（Rowett ヌードラット）により検討した。IHC 染色により、カニクイザル及び Rowett ヌードラットともに、脳血管の血液中ならびに脈絡叢の結合組織及び上皮細胞の細胞質に PEG が確認された。その他の脳構造において PEG の存在は認められなかった。PEG の存在と、細胞の空胞形成又は機能障害の顕微鏡的変化との関連性はみられなかった。Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験の高用量群動物の透過型電子顕微鏡観察では、脳脈絡叢上皮細胞の小胞（lysosomes）に PEG が認められた。粗面小胞体及びポリソーム（polysome）を含む細胞の微細構造全体の観察結果から、lysosome に貯留した PEG は正常な上皮細胞の機能に影響を及ぼさないと判断した。

局所刺激性は Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験及びウサギにおける局所刺激性試験から評価した。局所反応は主に投与操作に関連するものであった。ウサギでは、ノナコグ ベータ ペゴルの動脈内投与後に、溶媒対照と比較して軽微かつ明らかな局所反応が認められたが、Rowett ヌードラット及びカニクイザルの静脈内投与では局所反応は認められなかった。局所刺激性は臨床使用において許容可能と考えられた。

同用量の反復曝露によりノナコグ ベータ ペゴルと市販の rFIX 製剤 BeneFIX®の免疫原性を比較するため、ノナコグ ベータ ペゴルの 25 又は 200 IU/kg/週及び BeneFIX®の 25 IU/kg/日の用量でラットを用いて試験を実施した。ノナコグ ベータ ペゴルの週 1 回投与又は BeneFIX®の連日投与により 8 週間投与されたラットにおいて免疫原性の差異は認められなかった。

40 kDa PEG の反復投与毒性試験として、ラットでは 2 及び 6 週間投与により、カニクイザルでは 2、6 及び 13 週間投与による試験を実施した。40 kDa PEG は、ラットでは 117 mg/kg/週（2.925 µmol/kg/週）まで、カニクイザルでは 45 mg/kg/週（1.125 µmol/kg/週）まで忍容性が認められた。これらの試験では、他の 40 kDa PEG 化製剤でも報告されている所見、すなわち、マクロファージの空胞形成（ラット）、脳脈絡叢上皮細胞の空胞形成（カニクイザル 45 mg/kg/週の 6 週間投与後、最低用量 7 mg/kg/週の 13 週間投与では変化なし）が確認された。

2.6.6.2 毒性試験のための動物種選択（Module 2.6.7.5、試験番号 HeBa080802）

薬力学試験、薬物動態試験及び毒性試験に種々の動物モデルを使用した。毒性試験では、カニクイザルはヒトとの血液凝固系及び線溶系の類似性及び FIX アミノ酸配列の高い相同性を有すること[4,5,6]から、非臨床安全性評価に最も適した動物種としてカニクイザルを選択した。ラットはげっ歯類動物種として、活性化 rFIX（rFIXa）、全長分子及び PEG の毒性学的検討のために選択した。

非臨床試験の動物種としての薬理学的妥当性を検討するため、ヒト FIX の作用について、正常マウス、FIX ノックアウトマウス（F9-KO マウス）、ラット、ウサギ、カニクイザルから得られた血漿を用いてトロンビン生成測定法（TGA）により検討し、正常ヒト血漿における作用と比較した（Module 2.6.7.5、試験番号 HeBa080802）。市販の rFIX（BeneFIX®）及びノナコグ ベータ ペゴルの作用について、ラット及びカニクイザルの血漿を用いて検討した。マウス、F9-KO マウス及びウサギ血漿を用いて、代表的な遺伝子組換えヒト FIX 製剤である BeneFIX®の作用を検討した。BeneFIX®（カニクイザル、マウス、F9-KO マウス及びウサギ）及びノナコグ ベータ ペゴル（サル）は用量依存的にトロンビン生成を増加させたことから、各動物種におけるヒト FIX に対する交叉反応性が確認され、薬理学的反応性を有することが明らかにされた。正常マウスに比較して F9-KO マウスでは活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）及び凝固時間が延長した。ラットの血漿では BeneFIX®及びノナコグ ベータ ペゴルともにトロンビン生成が認められなかった。しかしながら、ラットの血漿では rFIXa を増量すると、用量依存的なトロンビン生成が認められた。このことは、ラット血漿中でノナコグ ベータ ペゴルは活性化されないものの、活性化 rFIX（rFIXa）はラットにおいて血液凝固促進作用を発揮することを示している。以上より、ラットは主として、ノナコグ ベータ ペゴル製剤に存在する活性化 FIX の毒性評価ならびに全長分子及びノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分の慢性毒性評価のためのげっ歯類動物種として選択された。マウスについては、rFIX の反復投与に対する感受性が高く広範囲に血栓症がみられた BeneFIX®のデータ[7,8,9]に基づき、毒性試験の動物種としての使用には適さないと判断した。イヌについては、2 週間曝露後、抗 FIX 抗体発生が認められた BeneFIX®のデータ[7,8,9]に基づき、毒性試験の動物種としての使用には適さないと判断した。

ノナコグ ベータ ペゴルは出血時のみに活性化すると考えられ、正常な血液凝固能を有する動物を毒性試験に使用することは妥当であると考えられた。

当初、一種類の動物・片性を用いることを考え、雄性カニクイザルのみを用いて安全性評価を進めた。その後、rFIXa の申請有効期間内（EOSL）規格の安全性評価のためにラットを含めることにし、さらに開発の後期には慢性毒性評価及び PEG の安全性上の懸念要因に対処するため雌雄 Rowett ヌードラットを導入した。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており、T 細胞依存性の抗体反応を起こさないことから、抗薬物抗体の干渉を受けることなくノナコグ ベータ ペゴルの慢性的投与が可能である。

2.6.6.3 単回投与毒性試験

第 1 相から第 3 相臨床試験の間に行われたノナコグ ベータ ペゴルの製法変更及び目的物質関連不純物である rFIXa の規格限度値を支持するために、ラット単回投与毒性試験を実施した。rFIXa の消失半減期（$t_{1/2}$）は短いこと（0.5～1 時間）[10]から、rFIXa の毒性は単回投与試験で十分に評価可能と考えた。

2.6.6.3.1 ラットにおける N9-GP の単回静脈内（ボーラス）投与による比較試験（Module 2.6.7.5、試験番号 210259）

雌雄各 5 匹のラットに、0.03%の rFIXa を含有するノナコグ ベータ ペゴル（第 1 相臨床試験用ロット）又は 0.12%の rFIXa を含有するノナコグ ベータ ペゴル（第 3 相臨床試験用ロット）の 200、1000 及び 2000 IU/kg を静脈内に単回投与した。試験デザインを表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2 試験デザイン－試験番号 210259

Group	Description	Dose level	No of animals (Males)	No of animals (females)
1	Control	0	5	5
2	Low (phase 3 batch)	200	5	5
3	Intermediate (Phase 3 batch)	1000	5	5
4	High (Phase 3 batch)	2000	5	5
5	Low (Phase 1 batch)	200	5	5
6	Intermediate (Phase 1 batch)	1000	5	5
7	High (Phase 1 batch)	2000	5	5

投与 24 時間後に動物を安楽死処置した。観察期間終了前に、血液学的検査、血液生化学的検査及び血液凝固検査のための血液試料を採取した。剖検及び病理組織学的検査を行った。

動物の一般状態観察において変化はみられず、肉眼的及び顕微鏡による観察でも所見は認められなかった。いずれの用量においても、またロット間においても、血液学的、血液生化学的又は病理組織学的検査で差異は認められなかった。

これらの所見に基づくと、第 1 相臨床試験用ロット（rFIXa 含量 0.03%）及び第 3 相臨床試験用ロット（rFIXa 含量 0.12%）の NOAEL は 2000 IU/kg であった。

2.6.6.4 反復投与毒性試験

2.6.6.4.1 反復投与毒性試験－重要でない試験（GLP 非適用）

rFIX は分子量が大きく、動物における中和抗体形成が予見されたことから、2 種の反復投与毒性試験（GLP 非適用）を実施し、中和抗体形成に関連して、試験実施の可能性、中和抗体形成の時期及び用量依存性について評価した。

慢性毒性評価に Rowett ヌードラットが利用可能か検討するため、6 週間薬物動態（PK）及び免疫原性予備試験を実施した。

カニクイザルについては、GLP 非適用の 13 週間反復投与免疫原性試験を実施し、最適な反復投与毒性期間を求めるため、中和抗体形成時期について評価した。その結果、内因性 FIX と交叉反応する中和抗薬物抗体の発現が高頻度にみられ、5～6 回投与後には後天性血友病様変化が生じたことから、カニクイザルにおける長期投与毒性試験は実施しなかった。

2.6.6.4.1.1 Rowett ヌードラット（Crl:NIH-Foxn1rnu）における週 2 回投与による 6 週間静脈内投与 PK 及び免疫原性試験（Module 2.6.7.6、試験番号 212143）

Rowett ヌードラット（Crl:NIH-Foxn1rnu）における週 2 回静脈内投与による 6 週間投与 PK 及び免疫原性試験を実施し、ノナコグ ベータ ペゴルの成分である PEG の長期投与による有害作用を評価可能か検討した。

雌雄各 13 匹／群からなる 2 群に、ノナコグ ベータ ペゴルの 40 又は 1200 IU/kg（PEG 投与量として 0.23 及び 6.79 mg/kg）を週 2 回静脈内投与した（表 2.6.6-3）。

表 2.6.6-3　　試験デザイン－試験番号 212143

Group	Treatment	Dose (IUnits/kg)	PEG mg/kg (µmol/kg)	No. of animals	
				Male	Female
1	Control	0	0 (0)	5	5
2	Nonacog beta pegol	40	0.23 (0.0057)	13	13
3	Nonacog beta pegol	1200	6.79 (0.1697)	13	13

一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、器官重量測定及び剖検で投与に関連する影響は認められず、被験物質に起因すると考えられる病理組織学的所見もみられなかった。

PK の分析により、投与動物は全身性のノナコグ ベータ ペゴルの曝露を受けていることが確認された。いずれの投与動物にも抗薬物抗体形成は認められなかった。$t_{1/2}$ は 26～38 時間であった。C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}168h)}$ は、雄では用量比例性が認められたが、雌では用量比例性を上回った。投与期間中、軽微な累積性が認められた。

PEG の存在を検出するため、脈絡叢を含む脳組織、脾臓及び筋組織に IHC 染色を施した。どの用量でも脾臓又は筋組織に PEG の存在は認められなかった。1200 IU/kg の用量において、すべての雄と 11/13 匹の雌の脈絡叢上皮細胞内に PEG が検出された。4/12 匹の雄では脈絡叢の結合組織に弱い PEG 染色性が認められた。他の脳構造では PEG 染色性は認められず、40 IU/kg の用量では PEG は検出されなかった。本試験により、Rowett ヌードラットはノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分の慢性毒性評価に利用可能であることが確認された。

2.6.6.4.1.2　ノナコグ ベータ ペゴルの雄性カニクイザルにおける 13 週間投与免疫原性試験及び 5 週間回復試験（Module 2.6.7.6、試験番号 208405）

本試験の目的は、カニクイザルにノナコグ ベータ ペゴルの 200 IU/kg の週 1 回静脈内投与による 13 週間投与における抗薬物抗体形成の時間経過と、それが曝露に及ぼす影響を検討することであった。投与期間中にみられた変化の回復性を検討するため、5 週間の休薬期間を設けた。試験デザインを表 2.6.6-4 に示す。

表 2.6.6-4　　試験デザイン－試験番号 208405

Group number	Dose level Nonacog beta pegol (IU/kg/dose)	PEG mg/kg (µmol/kg)	Number of animals in group Male
1	200	1.13 (0.0283)	8

毒性評価は、死亡数、一般状態の観察、体重、摂餌量（定性的評価）、臨床病理学的検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に基づいて行った。さらに、曝露評価及び抗体測定のため血液試料も採取した。

試験期間中、死亡はみられなかった。薬理作用マーカーとして、また、交叉反応性抗薬物抗体の指標として、aPTT を用いた。すべての投与時点で、投与前及び投与後に aPTT を測定した。予見される薬理学的反応は aPTT の短縮であるが、中和抗体の交叉反応性により投与後の aPTT 短縮は消失、もしくは、投与直前の aPTT が試験開始前の aPTT 値を超える延長を示すと考えられる。抗体形成が曝露に影響を及ぼすことを検討するため、各時点の投与 2 及び 24 時間後に、曝露検査用試料を採取した。抗体測定における循環血中の薬物による干渉を回避するため、抗体は 5 週間休薬後に評価した。

休薬期間終了時、rFIX に対する抗薬物抗体の結合が 6/8 頭で認められた。これは、ヒト FIX がカニクイザルでは異種タンパク質であることと一致するものであった。さらに、凝固一段法による評価から、6 頭すべてにみられた抗体は中和抗体であることが明らかにされた。抗体陽性動物では投与 5 回以降、曝露は低下又は認められなくなった。これらの動物では、曝露の低下がみられるほぼ同時期に、投与前の aPTT 延長が認められ、投与後の aPTT 短縮はほとんど、あるいは全く認められなかった。

抗体が認められなかった 2 頭では、13 週間の投与期間中曝露されており、予見された薬理作用通り、投与後の aPTT 短縮が認められた。

抗体が認められた 3 頭では、頭部及び眼部周囲に損傷及び腫脹がノナコグ ベータ ペゴルの投与 6～10 週目にみられ、他の抗体陽性動物では同様の所見が休薬 5 週目に認められた。これらの所見は、後天性血友病様変化の兆候、すなわち、中和抗体が内因性 FIX に対して交叉反応を起こしたものと考えられた。抗体がみられなかった動物では、血友病様の臨床的症状はみられなかった。

体重、摂餌量、血液学的検査（aPTT を除く）、血液生化学的検査及び器官重量には毒性学的意義を有する所見は認められなかった。

PEG を定性的に検出するため、脈絡叢を含む脳組織の IHC 染色を実施した。これらの検査データは主要試験報告書とは別に報告されている（Module 4.2.3.2、試験番号 209200）。ノナコグ ベータ ペゴルの 200 IU/kg（PEG 投与量として 1.13 mg/kg/週又は 0.0283 μmol/kg/週)の 13 週間投与後及び 5 週間休薬後では、脳のどの構造物にも PEG は検出されなかった。

結論として、カニクイザルへのノナコグ ベータ ペゴルの長期投与により、曝露の消失／減少及び後天性血友病様変化を伴う抗体形成が起こることが明らかとなった。ノナコグ ベータ ペゴルに 13 週間曝露された動物では、投与に関連する有害所見は認められなかった。PEG は、脈絡叢を含む脳には検

出されなかった。曝露に影響を及ぼす中和抗体の発現頻度が高いこと、後天性血友病様変化をもたらすことから、カニクイザルにおいて 4 週間を超える反復投与毒性試験を実施することの科学的意義はないものと考えられる。

2.6.6.4.2 反復投与毒性試験－重要な試験（GLP 適用）

2.6.6.4.2.1 Rowett ヌード（Crl:NIH-Foxn1rnu）ラットにおける 5 日に 1 回静脈内投与による 26 週間試験（Module 2.6.7.7.A、試験番号 212513）

本試験の目的は、Rowett ヌードラットに 5 日に 1 回の静脈内投与により 26 週間投与したときのノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分の全身性毒性誘発性について評価することであった。ノナコグ ベータ ペゴルの 40、150、600 及び 1200 IU/kg を Rowett ヌードラットに 5 日に 1 回の静脈内投与により 26 週間投与した。このうち PEG 投与量はそれぞれ 0.23、0.85、3.39 及び 6.79 mg/kg に相当した。認められた影響の回復性について、対照動物及び高用量動物を 26 週間休薬して評価した（表 2.6.6-5）。

表 2.6.6-5 試験デザイン－試験番号 212513

Group	Treatment	Dose (IU/kg/fifth day)	PEG mg/kg (µmol/kg)	Number of animals			
				Main study		Recovery phase	
				Male	Female	Male	Female
1	Control	0	0	18	18	9	9
2	Nonacog beta pegol	40	0.23 (0.0057)	18	18	0	0
3	Nonacog beta pegol	150	0.85 (0.0212)	18	18	0	0
4	Nonacog beta pegol	600	3.39 (0.0848)	18	18	0	0
5	Nonacog beta pegol	1200	6.79 (0.1697)	18	18	9	10*

*A spare animal was added to Group 5 after the death of a recovery animal on day 5

試験期間中、トキシコキネティクス、抗体分析、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、眼科学的検査、血液学的検査（末梢血）、血液生化学的検査、尿検査、器官重量測定及び剖検ならびに病理組織学的検査を行った。

ノナコグ ベータ ペゴルは良好な忍容性を示した。本試験において、一般状態の観察、死亡数、体重、摂餌量、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び病理組織学的検査に及ぼす影響はなく、明らかな毒性反応の兆候はみられなかった。

試験期間中 14 匹の死亡がみられ、内訳は対照群の 6/54 匹、低用量（40 IU/kg）群の 2/36 匹、中間高用量（600 IU/kg）群の 3/36 匹及び最高用量（1200 IU/kg）の 3/55 匹であった。死因を表 2.6.6-6 に示す。これらの死亡動物における病理組織学的検査所見は、主に尿生殖系及び皮膚における非特異的な感染

に関連するものであり、用量との関連性はみられなかった。これらの死亡に関し、投与との関連性はみられなかったことから、ノナコグ ベータ ペゴル投与に関連するものではないと考えられた。散発性の感染症は免疫不全モデル動物で想定される所見である。

表 2.6.6-6　　死亡例及び死因

Sex	Time of death (week)	Found dead	Euthanasia due to welfare reasons	Major factors contributing to death
Control				
M	13	X		No factors contributing to death identified
M	R20		X	Urogenital lesions
F	13		X	No factors contributing to death identified
F	17	X		Urogenital lesions
F	18		X	No factors contributing to death identified
F	21		X	Urogenital lesions
40 IU/kg				
M	12		X	Urogenital lesions
M	17		X	Skin lesions due to fighting
600 IU/kg				
M	23	X		Animal died during anesthesia. No factors contributing to death identified
M	25		X	Urogenital lesions
F	14		X	No factors contributing to death identified
1200 IU/kg				
M	R17	X		No factors contributing to death identified
F	21		X	Urogenital lesions
F	1		X	Stomach lesions

M: Male, F: Female, R: Recovery phase

本試験において、投与後 26 週間休薬した動物も含め、ノナコグ ベータ ペゴルに対する抗薬物抗体を形成する動物はみられなかった。

トキシコキネティクスの評価から、全用量群の動物の投与期間中における全身性のノナコグ ベータ ペゴル曝露が確認された。$t_{1/2}$ は、概ね単回投与後では 26～27 時間であり、反復投与後では 12～39 時間の範囲にあった。C_{max} 及び $AUC_{(0\text{-}96h)}$は、雌雄動物とも用量とともに増大し、およそ用量に比例して増大した。概して雌性ラットにおける AUC_{last} は低く、曝露（AUC_{last}）に性差が示唆されたが、C_{max} に性差は認められなかった。C_{max} 及び AUC_{last} の雌雄比の平均は、それぞれ 1.01 及び 0.780 であった。

用量相関的なプロトロンビン時間（PT）の延長が、5 日に 1 回投与の 150、600 又は 1200 IU/kg 群の雄及び 1200 IU/kg 群の雌で投与 13 及び 26 週目に、600 IU/kg 群の雌では投与 13 週目に認められた（表

2.6.6-7）。PT は完全な回復性を示したことから、測定法における高濃度 rFIX の干渉によるアーチファクトであると考えられ、毒性との関連性はないものと考えられた。測定法上の干渉について、正常ヒト血漿に BeneFIX®又はノナコグ ベータ ペゴルを添加して PT を測定した *in vitro* の検討で確認した。この検討から、ノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®はともに、正常ヒト血漿又は FIX 欠乏血漿に添加したとき濃度依存的に PT を延長することが示された（Module 2.6.6.11.2、Module 4.2.3.2 ”Effect of nonacog beta pegol and BeneFIX® on prothrombin time (PT) in normal human plasma and FIX-depleted human plasma”）。

表 2.6.6-7　　PT（秒）：対照群に対する変化量（%）

	Control		**40 IU/kg**		**150 IU/kg**		**600 IU/kg**		**1200 IU/kg**	
	M	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Week 13	23.8	24.7	+1	-2	+12**	+3	+18**	+8**	+21**	+15**
Week 26	25.6	23.5	+1	0	+6**	+1	+12**	0	+19**	+6*
End of Recovery	22.7	24.9	-	-	-	-	-	-	+7	+3

*p<0.05, ** p<0.01, - Not applicable

ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分が脳及び脈絡叢で検出されるか詳細に調べるため、側脳室周囲から採取した組織試料を IHC 染色し、定性的に PEG を検出した。26 週間投与後、全用量群において脳の血管内及び脈絡叢の結合組織及び上皮細胞の細胞質内で PEG が検出された。5 日に 1 回投与の 1200 IU/kg の 26 週間投与に続く 26 週間休薬後でも、脈絡叢上皮細胞の細胞質内に PEG が検出された。しかしながら、26 週間投与後又は 26 週間休薬後の病理組織学的検査では、脈絡叢上皮細胞に空胞形成は認められなかった。その他の脳構造には陽性を示す PEG 染色性は認められなかった（表 2.6.6-8）。PEG は、腸間膜リンパ節のマクロファージでも検出されたが、空胞との関連性は有さなかった。リンパ節におけるその他の種類の細胞又は組織構造では、陽性を示す PEG 染色性は認められなかった。

表 2.6.6-8　　脳脈絡叢における PEG の IHC 染色－PEG 陽性動物数

Dose – NNC0156-0000-0009		**0 IU/kg**		**40 IU/kg**		**150 IU/kg**		**600 IU/kg**		**1200 IU/kg**	
Number of animals	Main	M: 18	F: 18	M: 18	F: 18	M: 18	F: 18	M: 18	F: 18	M: 18	F: 18
	Recovery	M: 4	F: 4	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 0	F: 0	M: 9	F: 8
IHC staining (no. PEG positive)											
Brain parenchymal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Blood in blood vessels		0	0	9	8	17	17	18	17	18	18
Connective tissue		0	0	9	0	17	15	18	18	18	18
Epithelial cells (detected in small vesicles)		0	0	9	9	17	11	18	18	18	18
Recovery animals											
Brain parenchymal		0	0	-	-	-	-	-	-	0	0
Blood in blood vessels		0	0	-	-	-	-	-	-	0	0

Dose – NNC0156-0000-0009	0 IU/kg		40 IU/kg		150 IU/kg		600 IU/kg		1200 IU/kg	
Connective tissue	0	0	-	-	-	-	-	-	0	0
Epithelial cells (detected in small vesicles)	0	0	-	-	-	-	-	-	9	8

- not applicable as there were no animals

26 週間投与後、最高用量（1200 IU/kg）群の透過型電子顕微鏡による観察結果の評価では、PEG は脈絡叢上皮細胞の小胞（lysosome）に認められた。粗面小胞体（rough endoplasmatic reticulum）及びポリソーム（polysomes）を含む細胞の超微構造を総合的に判定したが、PEG の存在が正常な上皮細胞の超微構造に影響を与えていることは認められず、細胞機能障害の兆候はみられなかった。この検査結果は主試験の報告書とは別に報告されている（Module 4.2.3.2、試験番号 214495）。

IHC 染色及び透過型電子顕微鏡観察で脈絡叢に PEG が検出されたものの、標準的な顕微鏡観察でいずれの用量群でも細胞内空胞形成又は細胞機能障害の兆候は認められなかったことから、PEG の存在そのものに有害性はないと考えられた。本試験において有害所見はみられなかったことから、NOAEL は 5 日に 1 回投与の 1200 IU/kg であると考えられた。

2.6.6.4.2.2 雄性カニクイザルにおけるノナコグ ベータ ペゴルの 4 週間静脈内投与による毒性及び安全性薬理試験及び 5 週間回復試験（Module 2.6.7.7.B、試験番号 208260）

本試験の目的は、カニクイザルにノナコグ ベータ ペゴルを週 1 回静脈内投与により 4 週間に計 5 回投与し、毒性、トキシコキネティクス及び安全性薬理を究明することであった。投与期間中みられた兆候について、5 週間休薬期間を設け、その回復性を評価した。臨床では主に男性患者に投与されることを考慮し、本試験は雄性動物のみを用いて実施し、動物数は主要試験では 5 頭/群、回復試験では 3 頭/群とした。試験デザインを表 2.6.6-9 に示す。

表 2.6.6-9　　試験デザイン－試験番号 208260

Group number	Description	Dose level (IU/kg/dose/week)	PEG mg/kg/week (µmol/kg/week)	Number of animals in group	
				Main study group Male	Recovery group Male
1	Control	0	0 (0)	5	-
2	Low	350	1.67 (0.0419)	5	3
3	Intermediate	1300	6.22 (0.1555)	5	3
4	High	3750	17.94 (0.4486)	5	3

血液生化学的検査、体重、摂餌量（定性的評価）、眼科学的検査、血圧、心電図、呼吸数／深度、直腸温、尿検査及び器官重量には投与に関連する所見はみられなかった。

5 頭の高用量（3750 IU/kg）投与動物では、後天性血友病様の変化が発現し、3 頭（主試験の 2 頭及び回復試験の 1 頭）では 5 回目の投与前（試験 24 日）に、1 頭（主要試験）では 5 回目の投与前（試験 28 日）に、1 頭（回復試験）では休薬 1 週目（試験 36 日）に試験を終了した。残り 2 頭の主試験動物は試験計画どおり試験 31 日目に安楽死処置した。試験動物は群飼育するとの倫理規定に従い、高用量の回復試験動物は、残り 1 頭となった試験 36 日目に安楽死処置した。

トキシコキネティクスにより、試験を通してノナコグ ベータ ペゴルの曝露が確認された。$t_{1/2}$ は 41～69 時間（凝固活性測定法）及び 33～166 時間〔ELISA（酵素結合免疫吸着測定法）〕の範囲にあった。$AUC_{(0\text{-}168h)}$は用量に比例して増大した。試験 1 日及び 22 日の AUC に基づく累積の比は、用いた測定法に応じて 0.87～3.15 の範囲にあった。高用量群における生存動物が少なくなったことから、試験 29 日のトキシコキネティクスの群間比較は部分的であった。

試験 2 日及び 12 日の中枢神経系（CNS）に及ぼす影響の評価において、高用量（3750 IU/kg）投与動物の 7/8 頭に軽度の全身の震えが 1 回認められた（表 2.6.6-10 参照）。試験 2 日に全身の震えがみられた 2 頭の動物では、試験 15 日の一般状態の観察でも全身の震えが認められた。全身の震えは投与後 3 時間にみられ、1 時間以内に減弱した。低用量（350 IU/kg）及び中用量（1300 IU/kg）投与動物では全身の震えは認められなかった。概して、全身の震えは軽度かつ一過性であった。

表 2.6.6-10　CNS に及ぼす影響の評価及び一般状態観察中にみられた全身の震えの要約

	Control	**350 IU/kg**	**1300 IU/kg**	**3750 IU/kg**
CNS assessment tremor present				
Day 2[1]	0/5	0/8	0/8	6/8
Day 12[2]	-	-	-	1/8
Clinical observation of tremors				
Day 15[3]	-	-	-	2/8

[1]animal no 22, 23, 24, 27, 28, 29, [2]animal no 25; [3]animal no 28 and 29

さらに、後天性血友病様変化の発症が原因となる一般状態の不良（歯茎出血、動作緩慢及びほとんど無反応）により試験 28 日に安楽死処置した高用量投与動物（3750 IU/kg、動物番号 26）でも軽度の全身の震えがみられた。当該動物の一般状態の悪化及び震えが投与直後ではなく、遅れて発現したこと（投与 5～6 日後）から、この全身の震えは投与に関連した全身の震えとは異なる所見と考えられた。

ノナコグ ベータ ペゴル投与後、1.4～1.7 倍の PT 延長が用量依存的に認められた。休薬期間中に採取した血液試料では、PT は確実にベースライン値に回復していた（表 2.6.6-11）。PT の変化は、測定法における高濃度 FIX の干渉によるアーチファクトであることが示された（Module 2.6.6.11.2、Module

4.2.3.2 ”Effect of nonacog beta pegol and BeneFIX® on prothrombin time (PT) in normal human plasma and FIX-depleted human plasma”）。

表 2.6.6-11　　PT 及び投与後 24 時間値に対する%変化量

Day	Control	350 IU/kg	1300 IU/kg	3750 IU/kg
Pre-Treatment PT (S)	13.0	13.5	12.8	12.5
24 h post dose				
Day 2	-2.3	+5.2	+21.1**	+53.4***
Day 9	-3.8	+5.2**	+22.7***	+55.8***
Day 16	-3.6	+1.5	+25.8***	+51.0***
Day 23	-5.4	+3.7**	+25.0**	+42.2**
Day 30	-5.4	+1.5	+18.0**	+63.9***
Recovery				
Day 60	-	-7.4	+1.6	-

*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, - not applicable

試験期間中に測定したフィブリノゲン濃度は正常であった。概して、血管内凝固マーカー（トロンビンーアンチトロンビン複合体及び D-ダイマー）が影響を受けることはなかったが、1300 又は 3750 IU/kg 投与動物の剖検時に採取した血液試料では D-ダイマーの上昇がみられた。

全用量のすべての投与時点で、ノナコグ ベータ ペゴル投与後 24 時間の aPTT は短縮しており、これは想定される薬理作用に一致するものであった。詳細は表 2.6.6-12 に示す。

表 2.6.6-12　　aPTT の群平均及び投与後 24 時間値に対する%変化量

	Control	350 IU/kg	1300 IU/kg	3750 IU/kg
Mean aPTT pre-treatment (s)	30.0	29.9	29.5	29
Day 2	-15.7	-43.8**	-47.8**	-38.3
Day 9	-19.7	-43.8***	-47.8***	-37.2***
Day 16	+6.7	-40.1***	-41.4***	-29.7***
Day 23	+2.0	-35.1**	-37.6**	-13.5*
Day 30	-4.7	-23.7	-21.0	-31.2

*p<0.05、** p<0.01、***p<0.001

想定される薬理作用は aPTT の短縮であるが、交叉反応性中和抗体の形成により aPTT 短縮の欠失又は試験前（投与開始直前）の aPTT 値を超える延長がみられた。投与前に aPTT 延長が認められた動物数を表 2.6.6-13 に示す。参考値として試験実施施設におけるカニクイザルの背景データ（95%信頼区間）を用いると、27～182 週齢の雄性カニクイザルの aPTT の範囲は 22.8～38.1 秒であり、38.1 秒を超える

aPTT を延長と判定した。試験 15 日以降、投与前の aPTT が 38.1 秒を超える動物数の増加が経時的かつ用量依存的に認められ、交叉反応性中和抗体の形成が示唆された。

表 2.6.6-13　　次回の投与前に背景データの範囲（38.1 秒）を超える aPTT が測定された動物数

	Control	**350 IU/kg**	**1300 IU/kg**	**3750 IU/kg**
Mean aPTT pre-treatment (s)	30.0	29.9	29.5	29
Day 8	0/5	0/8	0/8	0/8
Day 15	0/5	0/8	0/8	2/8
Day 22	0/5	1/8	3/8	5/8
Day 29	0/5	2/8	3/8	2/4
Day 60	-	3/3	3/3	-

- not applicable

ノナコグ ベータ ペゴルの $t_{1/2}$ が長いことから、投与期間中に採取した血漿試料中の抗薬物抗体は、薬物干渉によりマスクされる可能性が考えられる。このことは、抗薬物抗体陽性を示した試料の多くが休薬期間中の動物から採取したものであることと一致する（表 2.6.6-14）。試験 22 日に aPTT 延長がみられた高用量投与動物で抗薬物抗体が示唆され、曝露の低下を示す個体もみられた。

表 2.6.6-14　　抗薬物抗体：陽性動物数/検査動物数

	Control	**350 IU/kg**	**1300 IU/kg**	**3750 IU/kg**
Pre-dose Day -7	0/5	0/8	0/8	0/8
Day 24	-	-	-	0/3
Day 28	-	-	-	1/1
Day 31	0/5	0/5	0/5	0/2
Day 36	-	-	-	1/2
Day 60	-	2/3	3/3	-

Antibody response may have been interfered by the presence of remaining nonacog beta pegol.

カニクイザルにおける後天性血友病様変化の発生は、aPTT の延長及び一般状態観察における出血兆候又は剖検及び顕微鏡的観察で確認される出血から診断される。

対照群及び低用量（350 IU/kg）群では、一般状態観察、剖検及び顕微鏡的観察で変化はみられなかった。

中用量（1300 IU/kg）群では、1/8 頭は、38.1 秒を超える aPTT は認められなかったものの、剖検及び顕微鏡的観察で筋肉に出血がみられた。中用量の回復試験群の 1/3 頭は、休薬期間中の一般状態観察で

顔面及び頸部に損傷が認められ、同時に 38.1 秒を超える aPTT も伴っていた。剖検及び顕微鏡的観察で出血は認められなかった（表 2.6.6-15）。このことから、前述の定義に基づき、中用量（1300 IU/kg）群の 1/8 頭は後天性血友病様変化の兆候を来していると判定した。

高用量（3750 IU/kg）群における 6/8 頭は、一般状態観察、剖検及び顕微鏡的観察において後天性血友病様の変化を示唆する兆候を示した。詳細は（表 2.6.6-15）に示す。

表 2.6.6-15　後天性血友病様の変化を示唆する一般状態観察、剖検及び顕微鏡的観察における兆候

Observation	Control	350 IU/kg	1300 IU/kg	3750 IU/kg
No of animals (main)	5	5	5	5
No of animals (recovery)	-	3	3	3
Clinical signs				
Bruishing swelling head/leg – treat period	0/5	0/8	0/8	3/8
Bruising/swelling inguinal/paw – recovery period	-	0/3	0/3	1/2
Bruising face/neck – recovery period	-	0/3	1/3	0/2
Scheduled terminal sacrifice				
Day 31 (main)	5	5	5	2
Day 36 (recovery)[1]	-	-	-	1
Day 66 (recovery)	-	3	3	-
Early termination due to acquired haemophilia				
Day 24 (2 main, 1 recovery)	-	-	-	3
Day 28 (main)	-	-	-	1
Day 36 (recovery)	-	-	-	1
Macroscopic pathology				
Thick red skin/subcutis head/leg/inguinal	0/5	0/8	0/8	4/8
Red area muscles	0/5	0/8	1/8	0/8
Microscopic pathology - haemorrhages				
Skin/ subcutis head/leg/inguinal	0/5	0/8	0/8	4/8
Sub-meningeal -brain	0/5	0/8	0/8	3/8
Spinal cord	0/5	0/8	0/8	1/8
Muscles	0/5	0/8	1/8	0/0

[1]High dose recovery animal terminated day 36 for ethical reason as animal were group housed and this was the only surviving animal.

脳実質及び脈絡叢を含む脳組織について、PEG の定性的検出用の IHC 染色を実施し、顕微鏡で観察した。IHC 染色結果は、別報告書としてまとめた（Module 4.2.3.2、試験番号 209200）。顕微鏡的観察で脳及び脈絡叢に変化は認められなかった。1300 IU/kg 又は 3750 IU/kg 投与動物では、脈絡叢において結合組織及び少数の上皮細胞に PEG が見出された。3 用量で、脳血管内の血液中に PEG がみられた。その他の脳組織では陽性を示す PEG 染色性は認められなかった。

週 1 回 350 IU/kg 及び 1300 IU/kg を投与後 5 週間休薬された動物では、脈絡叢又はその他の脳構造に PEG は見出されなかった。週 1 回 3750 IU/kg 投与後の休薬 1 週間の動物では、脈絡叢における結合組

織及び少数の上皮細胞の細胞質内ならびに脳血管内に PEG が見出された。その他の脳組織では陽性を示す PEG 染色性は認められなかった。

IHC 染色で脈絡叢に PEG が見出されたものの、いずれの用量群でも明らかな脈絡叢の細胞内空胞形成又は細胞機能障害はみられなかったことから、IHC 染色で見いだされた軽微な PEG の存在は有害性を示すものではないと考えられる。臨床病理学的検査及び病理学的検査の所見に基づき、免疫原性関連性の影響（外来異種タンパク質に対する抗体形成と後天性血友病様変化の招来）に関する NOAEL は 350 IU/kg であると考えられた。3750 IU/kg 投与動物で全身の震えがみられたことから、免疫原性の影響に関連しない NOAEL は 1300 IU/kg と考えられた。

2.6.6.5 遺伝毒性試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.3 に示した。

2.6.6.5.1 遺伝毒性試験 in vitro

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.3 に示した。

2.6.6.5.2 遺伝毒性試験 *in vivo*

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.3 に示した。

2.6.6.6 がん原性試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.4 に示した。

2.6.6.7 生殖発生毒性試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.5 に示した。性成熟した雌雄 Rowett ヌードラットを用いた反復投与毒性試験において、生殖器官に対する病理組織学的評価を実施したが、授受胎能に対する懸念要因は示唆されなかった。

2.6.6.8 幼若動物を用いた試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.6 に示した。

2.6.6.9 局所刺激性試験

意図しない経路（すなわち、静脈周囲及び動脈内）へ投与後の投与部位反応を検討するため、ウサギを用いた局所刺激性試験を実施して局所刺激性を評価した。

さらに、Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験及びカニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験において、投与部位の剖検及び病理組織学的検査を行い、ノナコグ ベータ ペゴルの局所刺激性を評価した。

2.6.6.9.1 ウサギにおける静脈周囲、静脈内及び動脈内投与による局所刺激性試験（Module 2.6.7.15、試験番号 210439）

本試験の目的は、ノナコグ ベータ ペゴルを意図する経路（静脈内）及び意図しない経路（静脈周囲及び動脈内）へ投与後の局所刺激性を評価することである。各経路当たり 4 匹の白色ウサギ（ニュージーランド白色種）を用い、ノナコグ ベータ ペゴルの 0.23 mL（約 40 IU/kg）を右側耳及び溶媒を左側耳の、静脈内周囲、静脈内又は動脈内に投与した。試験デザインを表 2.6.6-16 に示す。

表 2.6.6-16 試験デザイン－試験番号 210439

Group	No of animal (Male)	Route of treatment	Dose concentration (IU/mL)	Dose (mL)
1	4	Perivenous, right ear	500	0.23
		Perivenous, left ear	0	0.23
2	4	Intravenous, right ear	500	0.23
		Intravenous, left ear	0	0.23
3	4	Intraarterial, right ear	500	0.23
		Intraarterial, left ear	0	0.23

投与部位は、投与前及び投与後 3 時間±15 分に、出血、損傷、発赤及び腫脹の評点を記録した。その後、投与部位を毎日観察した。試験 5 日目に動物を安楽死処置し、剖検を行った。投与部位を保存し、病理組織学的に検査した。

投与に関連する全身性の毒性兆候はなく、摂餌量及び体重に投与による影響はみられなかった。

生存期間中の第 1 群（静脈周囲への投与）及び第 2 群（静脈内投与）で認められた主要な局所反応は、軽度までの出血及び損傷であった。第 2 群における反応はあまり明確でなく、両群における局所反応は試験 5 日目にかけて減弱した。被験物質と溶媒の投与部位に差異は認められなかった。第 3 群（動脈内投与）では、強度までの出血及び損傷ならびに軽微な腫脹が認められ、試験 5 日目にかけてわずかに減弱した。第 3 群では、ノナコグ ベータ ペゴルを投与した動物における局所刺激性の評点は溶媒投与動物よりも高い傾向を示した。

剖検では、肉眼的な変化は認められなかった。

病理組織学的検査において、静脈周囲への投与後 5 日目では反応はみられなかった。静脈内投与後の局所刺激性は、ノナコグ ベータ ペゴルの投与では溶媒投与に比較してわずかではあるがより強い注射針刺入部の反応が認められた。注射針刺入部の反応は顕微鏡観察で認められる狭い領域の反応であり、肉眼的変化のない軽度の変化であった。動脈内投与では、溶媒投与に比較してノナコグ ベータ ペゴル投与後では重症度がより高い局所組織反応が認められた。ノナコグ ベータ ペゴルの動脈内投与によるわずかに高い局所反応の程度は、他のタンパク質でみられる範囲内のものであった。

結論として、ノナコグ ベータ ペゴルの 0.23 mL/動物（40 IU/kg の用量に相当）又は同量の溶媒を雄性ウサギの静脈周囲、静脈内又は動脈内のいずれかに単回投与したとき、局所性の肉眼的反応（すなわち、出血／損傷及び腫脹）及びそれに関係する病理組織学的変化が認められた。これらの局所性反応は動脈内投与でより強く、ノナコグ ベータ ペゴル投与後の評点は溶媒よりもわずかに高い傾向を示した。

2.6.6.9.2 Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与後の局所刺激性（Module 2.6.7.7.15、試験番号 212513）

尾静脈内投与で認められた所見は、対照群とノナコグ ベータ ペゴル群で同様の頻度及び重症度を示した。すべての所見の発現頻度は低く、重症度は軽微～軽度であり、投与操作に関連するものと考えられ、ノナコグ ベータ ペゴル投与によるものではなかった。

2.6.6.9.3 カニクイザルにおける 4 週間反復投与後の局所刺激性（Module 2.6.7.7.15、試験番号 208260）

重要な試験であるカニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験において、投与部位の剖検及び病理組織学的検査を行い、局所刺激性を評価した。投与に関連する局所性反応はみられなかった。病理組織学的検査で、投与操作による軽微な投与部位反応（軽微な静脈炎／静脈周囲炎、筋膜炎／線維化）が、対照群を含む全群でみられた。投与期間終了後に安楽死処置した動物で認められた投与に関連する局所反応は、休薬期間終了後に検査した動物では回復していた。

2.6.6.9.4 局所刺激性の結論

局所刺激性は、主として投与操作に関連しており、ウサギにおける動脈内投与後では溶媒対照に比較してノナコグ ベータ ペゴルでわずかに強かったが、どの動物種においても静脈内投与では認められなかった。この局所反応は臨床使用において許容されるものと考えられる。臨床試験では、弱い投与部位反応が認められている（Module 2.7.4 臨床的安全性の概要を参照）

2.6.6.10　その他の毒性試験

2.6.6.10.1　比較免疫原性試験

非臨床免疫原性試験は、臨床における免疫原性を予測できる試験ではないが、非臨床で市販の rFIX 製剤である BeneFIX®とノナコグ ベータ ペゴルの相対的な免疫原性を評価した。本試験は FDA が推奨するプログラムと一致するものである。

2.6.6.10.1.1　ラットにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の静脈内投与による免疫原性試験（Module 2.6.7.16、試験番号 209353）

本試験の目的は、同用量の投与により BeneFIX®及びノナコグ ベータ ペゴルの免疫原性を比較することである。このことから、14 日間の試験期間で BeneFIX®は連日投与とし、ノナコグ ベータ ペゴルは週 1 回投与とした。2 週間の曝露期間後、動物を 1 週間休薬して抗体検査用試料を採取した。この投与に続けて休薬後に試料を採取するサイクルを 4 回繰り返した。したがって、有効投与期間は 8 週間であり、試験期間は 12 週間であった。試験群及び動物数を表 2.6.6-17 に示す。

表 2.6.6-17　試験デザイン－試験番号 209353

Group	Compound	Dose	No of animals (F)	No of animals (M)
1	Nonacog beta pegol	25 IU/kg/week	10	10
2	Nonacog beta pegol	200 IU/kg/week	10	10
3	BeneFIX®	25 IU/kg/day	10	10
4	BeneFIX®	200 IU/kg/day	10	10

血液凝固分析用の被験物質曝露試料は、曝露時間経過における抗薬物抗体の影響を確実に評価するため、各サイクルの 2 週間投与において、BeneFIX®は 10 回投与後、ノナコグ ベータ ペゴルは 2 回投与後の 72 時間に採取した。

ノナコグ ベータ ペゴルの 25 IU/kg/週を投与された 3 匹及び BeneFIX®の 25 IU/kg/日を投与された 3 匹に抗薬物抗体の形成が認められた。各被験物質について、抗体力価、性別ごとの発生頻度及び形成時期に明らかな抗体形成の差異は認められなかった。時間経過に伴う抗体形成の概要を表 2.6.6-18 に示す。

表 2.6.6-18　　ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を投与されたラットにおける抗体力価及び抗体形成日

			Titer				
Rat ID	**Dose**	**Sex**	**Week -2**	**Day 22**	**Day 43**	**Day 64**	**Day 85**
5	25 IU/kg/week nonacog beta pegol	Male	<1	<1	3.16	99.7	99.7
27	25 IU/kg/day BeneFIX®	Male	<1	<1	10	31.6	99.7
41	25 IU/kg/week nonacog beta pegol	Female	<1	<1	31.6	316	9986
48	25 IU/kg/week nonacog beta pegol	Female	<1	<1	<1	<1	31.6
66	25 IU/kg/day BeneFIX®	Female	<1	<1	<1	<1	3.16
70	25 IU/kg/day BeneFIX®	Female	<1	<1	31.6	1000	1000

曝露に影響する抗薬物抗体を評価するために採取した試料の大部分は、凝固一段法による測定法で評価したことから、定量下限値（LLOQ：938 mIU/mL）以下であった。LLOQ が高かった要因は凝固一段法において高濃度の内因性 FIX の干渉によるものであった。LLOQ が高いため、ノナコグ ベータ ペゴルの 200 IU/kg 投与動物のみで FIX 活性を測定可能であった。一方、25 IU/kg 群の抗薬物抗体陽性動物においては、本測定では曝露変化を評価することはできなかった。

結論として、ラットを用いた試験では、市販の BeneFIX®とノナコグ ベータ ペゴルの免疫原性に差異は認められなかった。

2.6.6.10.2　40 kDa PEG の毒性試験

開発段階の早期、すなわち、慢性毒性を評価するために Rowett ヌードラットを導入前の段階で、ラット及びサルにおける 40 kDa PEG の毒性試験に基づき高用量 PEG の毒性の特性を明らかにすることとした。利用可能な公開情報から、PEG 化製剤に関して、マクロファージ、腎尿細管上皮及び脳脈絡叢上皮細胞を含む種々の組織における空胞形成が記述されている[11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25]。空胞形成はターンオーバーの低い細胞における PEG 蓄積に対する適応反応であると説明されている[25,26]。

2.6.6.10.2.1　Wistar Hannover ラットにおける 40 kDa PEG の 2 日に 1 回静脈内（ボーラス）投与による 2 及び 6 週間探索的毒性試験（Module 2.6.7.16、試験番号 209294）

Wistar Hannover ラットにおける 40 kDa PEG の静脈内（ボーラス）投与による全身毒性誘発性について、2 又は 6 週間投与により評価した（表 2.6.6-19）。

表 2.6.6-19　　試験デザイン－試験番号 209294

Group	Treatment	Dose mg/kg/week[a] (umol/kg/week)	Duration weeks	No. of animals	
				Male	Female
1	Control	0 (0)	2 and 6	3 and 3	3 and 3
2	40 kDa PEG	45 (1.125)	2	3	3
3	40 kDA PEG	45 (1.125)	6	3	3
4	40 kDA PEG	117 (2.925)	6	3	3

[a] The weekly dose was applied as 12.8 or 33.4 mg/kg every second day corresponding to 45 or 117 mg/kg/week of 40 kDa PEG

試験期間中、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施して評価した。血漿中 40kDa PEG を特異的に定量する適用可能な測定法がなかったことから、トキシコキネティクスによる評価は実施しなかった。

投与による死亡はなく、また、ラットの外見及び行動に及ぼす影響はみられなかった。117 mg/kg/週投与の雄性ラットでは 6 週間を通して、45 mg/kg/週投与の雄性ラットでは投与 3 週以降、体重増加量及び摂餌量は明らかに低かった。雌性ラットの体重増加量及び摂餌量には投与による影響はみられなかった。

毒性学的意義を有する血液学的及び血液生化学的変化はみられなかった。aPTT のわずかな延長が 45 mg/kg/週の 2 週間投与後、45 及び 117 mg/kg/週の 6 週間投与後にそれぞれみられた。しかしながら、変化の程度はわずかであり、背景データの範囲内であることから、本変化が毒性学的意義を有するとは考えられなかった。2 又は 6 週間投与後の器官重量及び剖検では、投与に関連した変化は認められなかった。

投与に関連する所見は、脳の脈絡叢の間質、赤脾髄であり、変化の程度はそれほどのものではないが下顎及び腸間膜リンパ節のマクロファージの空胞形成もみられた。この所見は両用量で 6 週間投与後のみみられた。その他の所見の特性及び出現頻度は通常みられる病理組織学的変化の背景データの範囲内であった。

結論として、40 kDa PEG は雄性ラットにおいて摂餌量及び体重に及ぼす影響がみられたものの、忍容性は概ね良好であった。病理組織学的検査では、脳脈絡叢及び脾臓、変化の程度はそれほどのものではないが下顎及び腸間膜リンパ節において、公表されている他の PEG 化化合物の動物データと一致するマクロファージ内空胞形成がみられた。

ノナコグ ベータ ペゴルの臨床推奨用量 40 IU/kg/週での PEG 投与量は 0.23 mg/kg/週（0.0057 µmol/kg/週）となる。ラットの 2 及び 6 週間投与毒性試験で検討された用量は、臨床推奨用量で投与される PEG 量よりも 200～500 倍高い用量であった。

2.6.6.10.2.2 カニクイザルにおける 40 kDa PEG の静脈内（ボーラス）投与による 2、6 及び 13 週間投与毒性試験（Module 2.6.7.16、試験番号 209215）

カニクイザルへの 40 kDa PEG 静脈内（ボーラス）投与による全身性毒性誘発性について、2、6 及び 13 週間にわたり評価した（表 2.6.6-20）。

表 2.6.6-20 試験デザイン－試験番号 209215

Group	Treatment	Duration (weeks)	Dose mg/kg/week[a] (µmol/kg/week)	No. of animals (Males only)
1	40 kDa PEG	2	45 (1.125)	3
2	40 kDaPEG	6	45 (1.125)	3
3	40 kDa PEG	13	7 (0.175)	3

[a] The weekly dose was applied as 2 or 12.8 mg/kg every second day corresponding to 7 or 45 mg/kg/week of 40 kDa PEG

試験期間中、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査血液生化学的検査、尿検査、器官重量測定、剖検及び病理組織学的検査を実施して評価した。適用可能な測定法がなかったことから、トキシコキネティクスによる評価は実施しなかった。

一般状態の観察、体重、摂餌行動、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量及び剖検で投与に関連する所見はみられなかった。

脳の脈絡叢上皮細胞における軽微な空胞形成が 45 mg/kg/週の 6 週間投与後の 2/3 頭に認められた。同用量の 2 週間投与又は 7 mg/kg/週の 13 週間投与で同様な所見は認められなかった。本試験ではその他に意味のある所見及び検査した他の器官における細胞内空胞形成はみられなかった。

結論として、45 mg/kg/週の 40 kDa PEG の 6 週間静脈内（ボーラス）投与は概ね良好な忍容性を示し、脳の脈絡叢上皮細胞に空胞形成が認められた。このことは、他の PEG 化化合物の動物における公表データと一致するものであった。

ノナコグ ベータ ペゴルの臨床推奨用量 40 IU/kg/週での PEG の投与量は 0.23 mg/kg/週（0.0057 µmol/kg/週）となる。カニクイザルの 2、6 及び 13 週間反復投与毒性試験で検討した用量は、臨床推奨用量で投与される PEG 量よりも 30～200 倍高かった。

2.6.6.11　考察及び結論

概して、ノナコグ ベータ ペゴルは、Rowett ヌードラットにおける 1200 IU/kg までの用量の 5 日に 1 回投与による 26 週間反復投与毒性試験及びカニクイザルにおける 1300 IU/kg までの用量の週 1 回投与による 4 週間反復投与毒性試験で良好な忍容性が認められた。

2.6.6.11.1　免疫原性

ヒト FIX はカニクイザルでは外来種異物であることから、カニクイザルでは交叉反応性を有する中和抗体の用量依存的な増加が認められた。このことから、4 週間反復投与毒性では、中用量（1300 IU/kg）投与の 1/8 頭及び高用量（3750 IU/kg）投与の 6/8 頭に後天性血友病様の一般状態観察所見（aPTT 延長及び出血）が認められた。

aPTT の短縮は薬効に関する薬力学マーカーと理解され、aPTT の延長又は短縮の消失は内因性 FIX との交叉反応により形成される中和抗体のサロゲートマーカーとして利用可能である。健康な雄性カニクイザルへのノナコグ ベータ ペゴル投与により、予想された通り、初期に投与後の aPTT 短縮を伴う薬理学的作用が認められた。4 週間反復投与毒性試験では、経時的かつ用量依存的に aPTT の延長を示す動物数の増加が認められた。引き続き、低用量（200 IU/kg/週）で実施した 13 週間投与免疫原性試験では、6/8 頭に内因性 FIX と交叉反応する中和抗体が認められ、そのうち 4/8 頭は後天性血友病様の変化を来し、5～6 回の投与後、体内曝露に影響が認められた。4 週間反復投与毒性試験及び 13 週間反復投与免疫原性試験で抗体形成がみられた動物では、曝露の低下と aPTT の延長は相関していた。このことから、カニクイザルにおいてノナコグ ベータ ペゴルのより長期投与による毒性試験（4 週間以上）を実施しても、その意義は低いと結論した。

非臨床試験でみられる免疫原性に関して、ヒトにおける予見性はないが、FDA の助言に従い、市販の rFIX（BeneFIX®）とノナコグ ベータ ペゴルの免疫原性について相対比較評価を行った。ラットにおけるノナコグ ベータ ペゴル及び BeneFIX®の週 1 回曝露では免疫原性に差異は認められなかった。免疫原性に関する非臨床試験及び臨床試験の結果から、市販されている FIX 血漿製剤及び rFIX 製剤と比較してノナコグ ベータ ペゴルの免疫原性リスクが変化したとは考えられなかった（Module 5.3.5.3 “Integrated Summary of Immunogenicity”）。

Rowett ヌードラットは、免疫原性による干渉を起こさずノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分の慢性毒性を評価するための動物モデルとして導入した。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損していることから、T 細胞依存性の抗体反応は起こらないと考えられる。この動物を用いた 6 及び 26 週間反復投与毒性試験では、抗薬物抗体形成は認められず、また試験期間中被験物質による曝露が確認されたことから、本動物モデルの適切性が確認された。

2.6.6.11.2　PT 延長

Rowett ヌードラット及びカニクイザルともに用量に関連する PT 延長がみられた。休薬期間中に採取した試料では完全にベースライン値に回復した。FX による TF/FVIIa 複合体の活性化に関して rFIX は基質として競合的に作用することから、PT 延長は高濃度の FIX により生じると考えられる。この仮説を、ヒトの正常血漿又は FIX 欠乏血漿に BeneFIX®又はノナコグ ベータ ペゴルを添加して PT を測定する *in vitro* 試験により確認した（Module 4.2.3.2, ”Effect of nonacog beta pegol and BeneFIX® on prothrombin time (PT) in normal human plasma and FIX-depleted human plasma”）。その結果、BeneFIX®又はノナコグ ベータ ペゴルは、正常なヒト血漿又は FIX 欠乏血漿に添加すると、濃度依存的に PT を延長することが示された（図 2.6.6-1）。本結果は他の参考文献でも認められている[27,28]。

Rowett ヌードラット及びカニクイザルでみられた投与に関連する PT 延長は、血漿中の FIX が極端な高濃度に達したことにより生じたものと結論された。したがって、この所見は、高濃度の rFIX による測定法への干渉に関連するものであり、臨床試験の用量範囲ではおそらく生じないものと考えられる（図 2.6.6-2 参照）。臨床試験では、PT 延長が少数の症例で報告されたが、一般的な傾向を示すものではなかった（詳細は Module 2.7.4 臨床的安全性の概要を参照）。

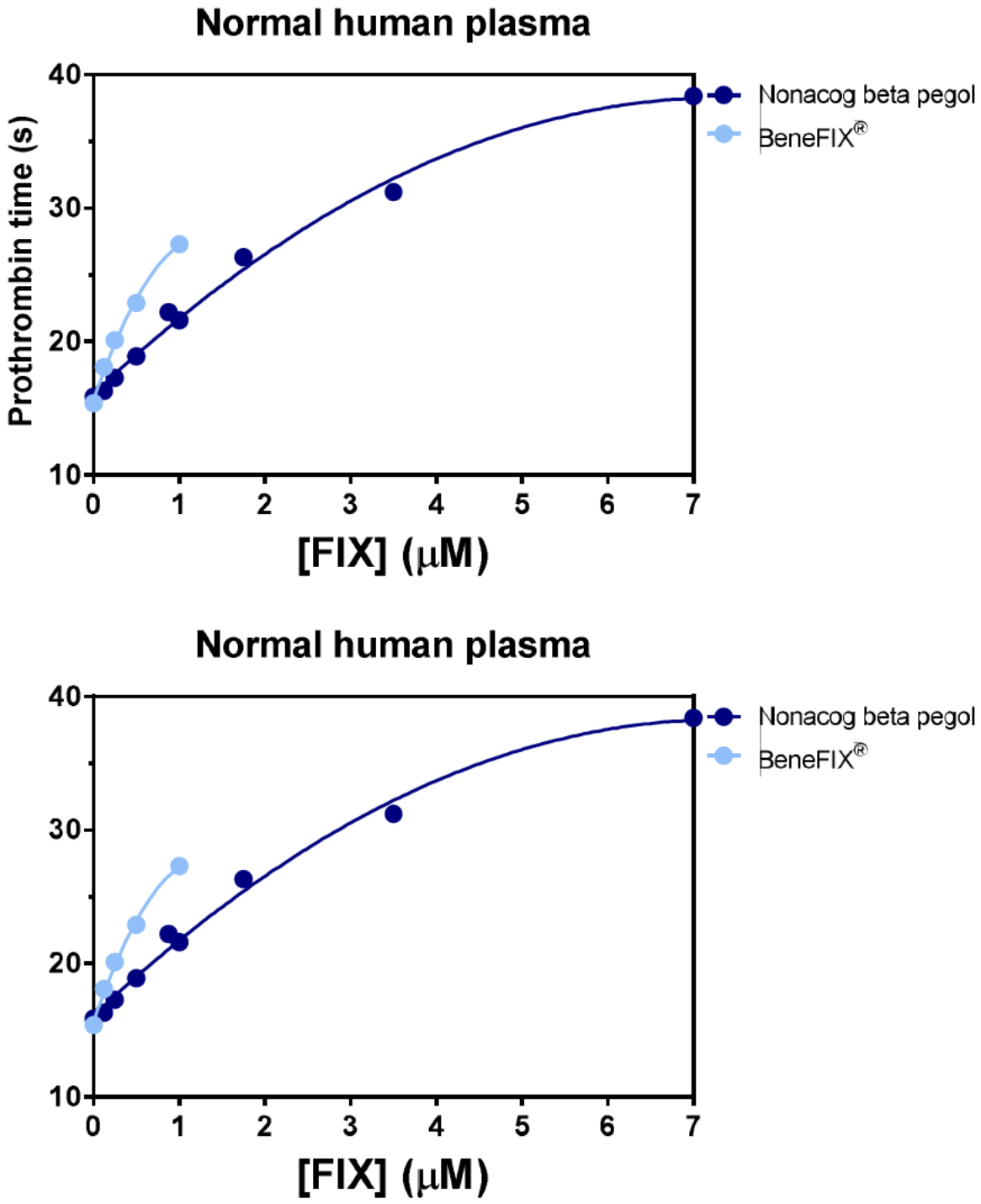


図 2.6.6-1　　ヒトの正常血漿に漸増濃度のノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®を添加したときの PT 延長の濃度依存性

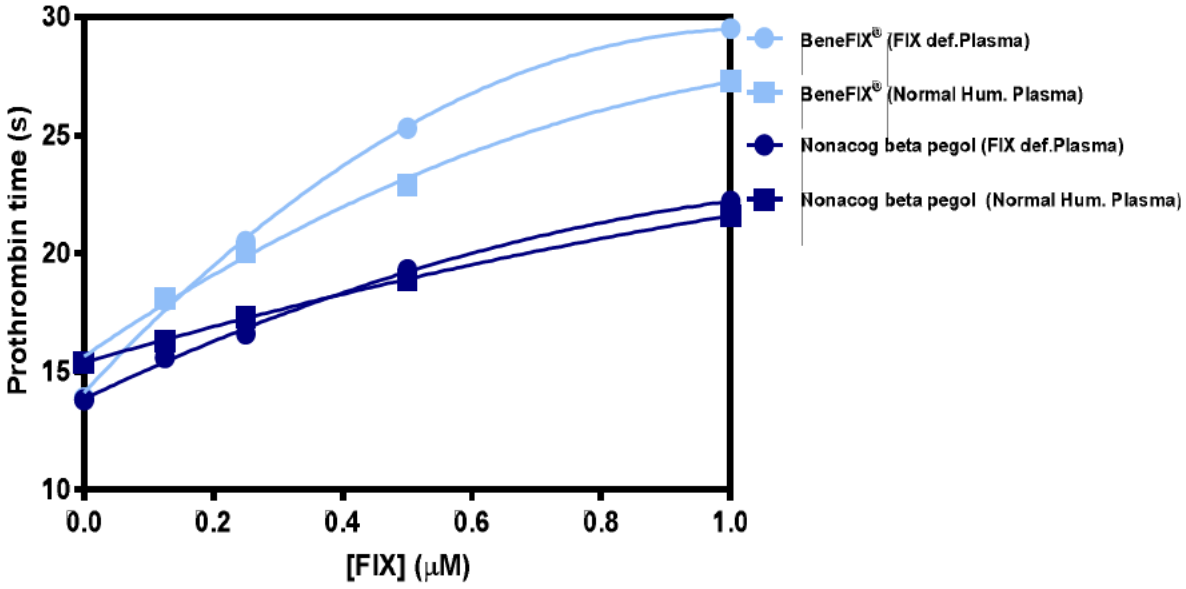


図 2.6.6-2　　ヒトの正常血漿及び FIX 欠乏血漿へ低濃度の FIX（ノナコグ ベータ ペゴル又は BeneFIX®：0～1 μmol/L）を添加したときの PT 延長

The reference level of FIX in healthy humans is approximately 90 nmol/L (0.09 μmol or 5μg/mL).

2.6.6.11.3　全身の震え

カニクイザルの反復投与毒性試験において、高用量（3750 IU/kg/週）群で軽度かつ一過性に全身の震えがみられた。全身の震えは 1 ないし 2 回目の投与にのみ認められ、3 回目以降の投与では認められなかった。これを説明しうる明らかな環境条件の相違はみられなかった。高用量投与動物の一部で髄膜下のうっ血／出血が認められたが、全身の震えとの相関性は認められなかった。全身の震えの背景にあるメカニズムは特定できなかった。全身の震えは、臨床用量の 75 倍を超える曝露でのみみられたものであること、試験の初期に 1 ないし 2 回みられたのみであること、中用量（1300 IU/kg/週）群では認められなかったことから、ヒトにおける 40～80 IU/kg の投与計画との関係において臨床的関連性を有さないと考えられた。臨床試験では全身の震えは報告されていない（Module 2.7.4 臨床的安全性の概要を参照）。

2.6.6.11.4　PEG 化タンパク質に関連する PEG の組織分布

動物への非経口的経路での PEG 化タンパク質及び PEG 単独投与により、種々の器官におけるマクロファージ及び組織球、腎尿細管上皮細胞及び側脳室の脈絡叢上皮細胞に空胞形成が認められる[3,11,12,13,14,15,16, 17,18,19,20,21,22,23,24,25,29]。Rudman ら[29]は、非共有結合高分子 PEG をラットの静脈内に 100

mg/kg の 10 日間投与、20 mg/kg の 2 日に 1 回投与又は 40 mg/kg の週 2 回投与による 3 ヵ月間投与を行って細胞内分布及び細胞に及ぼす毒性について検査したところ、PEG の分子サイズに依存する PEG の分布及び病理組織学的変化がみられた。PEG 単独又はタンパク質に結合した PEG に関する報告の大多数では、空胞に関連した炎症、変性又は壊死は報告されていない。著しい空胞形成が認められた試験においても、臨床病理学的変化又は機能性マーカー変化との関連性はみられなかった [11,29]。このことから、マクロファージ、脳の脈絡叢及び腎における空胞形成は、細胞内 PEG の蓄積とそれらの細胞のターンオーバーが低いことによる適応性反応であると記されている [25,26]。

40 kDa PEG 単独の試験では、マクロファージ（ラット）及び脈絡叢上皮細胞（サル）に空胞がみられ、この結果は他の 40 kDa PEG 化タンパク質の観察と 40 kDa PEG 単独投与時の観察結果と一致していた。空胞形成に関係する PEG の用量は臨床推奨用量 40 IU/kg/週よりも 200～550 倍高い用量であった。

2.6.6.11.5　PEG 及び脈絡叢

EMA[3]、The Society of Toxicological Pathology[30]及び BioSafe[25] は、PEG 化製剤が非臨床試験動物モデルの脈絡叢上皮細胞における空胞形成を示した場合の追加的な安全性評価に関する勧告を公表している。特に懸念すべき事項は、広範囲な空胞形成が細胞機能及び脳脊髄液（CSF）の生成に影響を及ぼす可能性があるかである。脳脈絡叢上皮細胞は CSF の主要な分泌源であり、血液 - CSF 関門を形成している[31]。現在のところ、脈絡叢の機能を評価する臨床バイオマーカーはない。

ノナコグ ベータ ペゴルでは、予定臨床用量を超える用量を用いたカニクイザル及び Rowett ヌードラットの試験において脈絡叢上皮細胞に空胞形成は認められなかった。動物において、ノナコグ ベータ ペゴルの PEG 成分は脈絡叢上皮細胞に分布するが、空胞形成又は細胞機能障害を示す病理組織学的兆候は認められなかった。Rowett ヌードラット 26 週間試験動物の脈絡叢の透過型電子顕微鏡観察では、ノナコグ ベータ ペゴル投与動物の脈絡叢上皮細胞の lysosome 内に PEG の存在が認められた。細胞の超微構造の観察を実施したが、lysosome 内の PEG が上皮細胞の正常機能に影響を及ぼす兆候は認められなかったことから、PEG の存在が有害であるとは考えられなかった。

タンパク質部分（活性化ペプチド）、リンカー（グリシン）又は PEG のいずれかを放射能標識したノナコグ ベータ ペゴルを用いて、数種類の体内分布試験を実施した。詳細は Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文に示す。

文献的に、CSF 関門を通過する FIX 又は PEG の能動輸送は知られていない。このことと一致して、体内分布試験では、ノナコグ ベータ ペゴルは 40 kDa PEG 単体と同様に脳脈絡叢上皮細胞に分布することが示されている。すなわち、タンパク質が脈絡叢へのノナコグ ベータ ペゴル輸送を増強すること

を示唆するデータは得られていない〔（図 2.6.6-3）。この試験成績は、Module 2.6.5.5C 及び D、試験番号 212213 及び 214076 を参照）〕。

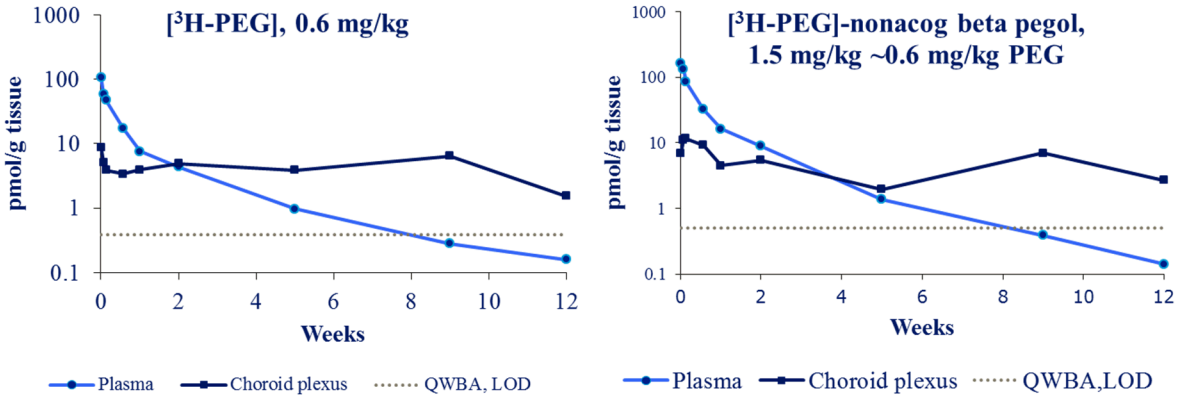


図 2.6.6-3　　40 kDa PEG 単独又はノナコグ ベータ ペゴル投与後の血漿中及び脈絡叢上皮細胞内放射能活性

PEG 単独又はタンパク質に結合した PEG に関する報告の大多数では、PEG の存在又は PEG が含まれた空胞に関連して炎症、変性又は壊死はみられていない。むしろ、マクロファージ、脈絡叢及び腎における空胞形成は、細胞内 PEG の蓄積とそれらの細胞のターンオーバーが低いことによる適応性反応であると記されている [25,26]。ノナコグ ベータ ペゴルでは、脈絡叢における PEG の体内分布がみられるのみであり、空胞形成は認められなかった。

2.6.6.11.6　　結論

反復投与毒性試験において、カニクイザルでは週 1 回投与の 1300 IU/kg の用量までならびにラットでは 5 日に 1 回投与の 1200 IU/kg の用量まで、ノナコグ ベータ ペゴルの良好な忍容性が認められた。ノナコグ ベータ ペゴル投与群では、投与に関連した毒性は認められず、他の PEG 化製剤で報告されている脈絡叢上皮細胞又は腎における空胞形成も認められなかった。局所刺激性は臨床投与において許容されるものと考えられた。

ノボ ノルディスク社は、非臨床毒性試験プログラムからノナコグ ベータ ペゴルの安全性の特性は明らかにされたものと考える。

参考文献

1 ICH S6: Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, July 1997.
2 ICH M3: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2), June 2009.
3 EMA. CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediactric population. EMA/CHMP/SWP/647258/2012. November 2012.
4 Seaman AJ, Malinow MR. Blood clotting in nonhuman primates. Lab Anim Care. 1968; 18(1): 80-84.
5 Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. Arzneimittelforschung. 1994; 44(6):793-797.
6 Ravanat C, Freund M, Dol F, Cadroy Y, Roussi J, Incardona F, et al. Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animal species. Blood Coagul Fibrinolysis. 1995; 6: 446-455.
7 FDA. BeneFIX: Summary of basis for approval. Reference number 96-1048. 1997.
8 EMEA. BeneFIX: Scientific discussion. 2005.
9 Schaub R, Garzone P, Bouchard P, Rup B, Keith J, Brinkhous K, et al. Preclinical Studies of Recombinant Factor IX. Sem in Haemtol. 1998; 35(2):28-32.
10 Hultin MB. Studies of factor IX concentrate therapy in hemophilia. Blood. 1983;62(3):677-684.
11 Bendele A, Seely J, Richey C, Sennello G, Shopp G. Short communication: renal tubular vacuolation in animals treated with polyethylene-glycol-conjugated proteins. Toxicol Sci. 1998;42(2):152-157.
12 EMEA. NeupoPEG: EPAR - Scientific Discussion. 2004.
13 FDA. Neulasta: Pharmacology Reviews. Application number 125031/0. 17 December 2001.
14 EMEA. Somavert: EPAR - Scientific discussion. 2004.
15 FDA. Somavert: Pharmacology reviews, Application number 21-106. 27 November 2002.
16 EMEA. PEGasys: EPAR - Scientific Discussion. 2005.
17 FDA. PEGasys: Summary pharmacology/toxicology review of PEGASYS® for hepatitis C. RMS BLA 103964. 19 Feb 2001.
18 EMEA. PEGintron: EPAR - Scientific Discussion. 2005.
19 FDA. PEG-INTRON: Toxicologist's Review. BLA#99-1488. 19 December 2000.
20 EMEA. Macugen: EPAR - Scientific Discussion. 2006.
21 FDA. Macugen: Pharmacology reviews. Application number 21-756. 17 March 2004.
22 FDA. Cimzia: Pharmacology Reviews. BLA 125160/0. 18 April 2008.
23 EMEA. Cimzia: Assessment report. EMEA/664021/2009.
24 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.
25 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.
26 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.
27 Osterud B, Kasper CK, Lavine KK, Prodanos C, Rapaport SI. Purification and properties of an abnormal blood coagulation factor IX (Factor IXBm)/kinetics of its inhibition of factor X activation by faxtor VII and bovine tissue factor. Thrombos Haemostas. 1981;45(1):55-59.
28 Lefkowitz JB, Monroe DM, Kasper CK, Roberts HR. Comparison of the behavior of normal factor IX and the factor IX BM variant hilo in the prothrombin time test using tissue factors from bovine, human, and rabbit sources. Am J Hematol. 1993;43(3):177-182.
29 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.

30 Morrison JP, Sharma AK, Rao D, Pardo ID, Garman RH, Kaufman W, et al. STP 2014 continuous education course #3: fundamentals of translational neuroscience in toxicologic pathology: optimizing the value of animal data for human risk assessment. Toxicol Pathol. 2015;43(1):132-139.
31 Redzic ZB, Segal MB. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. Adv Drug Delev Rev. 2004;56(12):1695-1716.

ノナコグ ベータ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.7 毒性試験概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.7.1 毒性試験 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 8
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 9
2.6.7.4 毒性試験：使用バッチ 10
2.6.7.4.1 非臨床試験で使用された各バッチの概括 10
2.6.7.4.2 原薬及び製剤の有効期限時における規格及び非臨床試験で使用された各バッチにおける含有量 11
2.6.7.5 単回投与毒性試験 13
2.6.7.6 重要な試験以外の反復投与毒性試験 15
2.6.7.7 重要な反復投与毒性試験 17
2.6.7.7.1 Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性試験：212513 17
2.6.7.7.2 カニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び安全性薬理試験：208260 19
2.6.7.8 遺伝毒性試験： in vitro 28
2.6.7.9 遺伝毒性試験： in vivo 28
2.6.7.10 がん原性試験 28
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 28
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験：重要な試験 28
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 28
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 28
2.6.7.15 局所刺激性試験 29
2.6.7.16 その他の毒性試験 30

2.6.7.1 毒性試験

Test Article: Nonacog beta pegol

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg))	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Species qualification								
In vitro thrombin generation assay in plasma	Plasma from: Human, Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis*), Rat (*Sprague Dawley*), mouse (*C57/bl*), Rabbit (*New Zealand White*), F9-KO mouse (*B6.129P2-F9tm1Dws*)	*In vitro*	NA	Various concentrations: 0, 22.5, 45, 90, 180, 360 and 450 nM nonacog beta pegol or BeneFIX®	No	Novo Nordisk A/S	HeBa080802	4.2.3.1
Single-Dose Toxicity								
Single-dose study	Male and female rats (*Crl: WI (Han)*)	i.v.	Single dose	200, 1000, 2000	Yes	Covance, Harrogate, UK	210259	4.2.3.1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg))	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity - Non-pivotal								
6-weeks repeat dose study	Rowett Nude Rats (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	i.v.	6 weeks	0, 40, 1200 twice weekly	No	Huntingdon Life Science UK	212143	4.2.3.2
13-week repeat dose study	Male cynomolgus monkeys, (*Macaca Fascicularis)*	i.v.	13 weeks	200 weekly	No	Covance, Harrogate, UK	208405	4.2.3.2
Repeat-Dose Toxicity - Pivotal								
26-week repeat-dose toxicity	Rowett Nude Rats (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	i.v.	26 weeks	0, 40, 150, 600, 1200 every fifth day	Yes	Huntingdon Life Science UK	212513	4.2.3.2
Transmission electron microscopic investigation of epithelial choroid plexus cells from Rowett Nude Rats dosed NNC0156-0000-0009 for 26 weeks (Study ID 212513)	Rowett Nude Rats (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	NA	NA	NA	No	Novo Nordisk A/S - Maaloev	214495	4.2.3.2

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg))	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
4-week repeat-dose toxicity	Male cynomolgus monkeys, (*Macaca Fascicularis)*	i.v	4 weeks	0, 350, 1300, 3750 weekly	Yes	Covance, Harrogate, UK	208260	4.2.3.2
An immunohistochemical investigation of cynomolgus monkey brain tissues from two intravenous studies with 40K PEG-rFIX (study id 208260, 208405)	Male cynomolgus monkeys, (*Macaca Fascicularis)*	NA	NA	NA	No	Novo Nordisk A/S - Maaloev	209200	4.2.3.2
Effect of nonacog beta pegol and BeneFIX on prothrombin time (PT) in normal human plasma and FIX-depleted human plasma	human	NA	NA	NA	No	Novo Nordisk A/S - Maaloev	Memo	4.2.3.2
Genotoxicity	No studies performed; scientific justification provided in 2.4.4.3.						-	
Carcinogenicity	No studies performed; scientific justification provided in 2.4.4.4.							
Reproductive and Developmental Toxicity	No studies performed; scientific justification provided in 2.4.4.5.							
Juvenile Toxicity	No studies performed; scientific justification provided in 2.4.4.6.							

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg))	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
Local Tolerance	Rabbit, (*New Zealand White*)	i.v.; i.a.; perivenous	Single dose	0 and 40	Yes	Scantox LAB Research, Denmark	210439	4.2.3.6
	Rowett Nude Rats (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	i.v.	6 weeks	0, 40, 1200 twice weekly	No	Huntingdon Life Science UK	212143	4.2.3.2
	Male cynomolgus monkeys, (*Macaca Fascicularis*	i.v.	4 weeks	0, 350, 1300, 3750 weekly	Yes	Covance, Harrogate, UK	208260	4.2.3.2
Other Toxicity Studies								
Comparative immunogenicity study nonacog beta pegol and BeneFIX	Male and female/ *HsdHan™:WIST*	i.v.	8 weeks (4 cycles of 2 weeks dosing 1 week off dosing)	25 and 200 daily BeneFIX® or 25 and 200 weekly nonacog beta pegol/	Yes	Covance, Harrogate, UK	209353	4.2.3.7.1

Type of Study	Species and Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg))	GLP Compliance	Testing Facility	Study ID	Location in CTD
40 kDa PEG toxicity studies								
2 or 6 week study	Male and female/ *HsdHan™:WIST*	i.v.	2 and 6 weeks	45 mg 40 kDa PEG/kg/week for 2 and 6 weeks 117 mg 40 kDa PEG/kg/week for 6 weeks	Yes	Huntingdon Life Science UK	209294	4.2.3.7.7
2, 6 or 13 weeks	Male cynomolgus monkeys (*Macaca Fascicularis)*	i.v.	2, 6 and 13 weeks	45 mg 40 kDa PEG/kg/week for 2 and 6 weeks. 7 mg 40 kDa PEG/kg/week for 13 weeks	Yes	Huntingdon Life Science UK	209215	4.2.3.7.7

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: Nonacog beta pegol

Type of Study	Test System	Method of Administration	Doses (IU/kg)	GLP Compliance	Study ID	Location in CTD
Repeat-dose toxicity study – Pivotal	Rowett Nude Rats (*Crl:NIH-Foxn1rnu*)	i.v,	0, 40, 150, 600, 1200	Yes	212513	4.2.3.2
	Male cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis)*	i.v.	0, 350, 1300, 3750	Yes	208260	4.2.3.2

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test Article: Nonacog beta pegol

Species	Assay	Sex	Dose (IU/kg)	C_{max} (IU/mL)	C_{max} ratio[2]	AUC_{0-t} (hr*IU/mL)	AUC ratio[4]	0-t (hr)	Study ID
Human SD	Clot	M	25	0.35	-	33.04	-	0-inf	NN7999-3639
	Clot	M	50	0.70	-	73.28	-	0-inf	
	Clot	M	100	1.28	-	158.75	-	0-inf	
Human SS	Clot	M	10	NR	-	26.48	-	0-168	NN7999-3747
	Clot	M	40	NR	-	93.19	-	0-168	
Rat	LOCI	M	40	0.59[1]	0.5	22.50[3]	0.2	0-96	212513
Rowett Nude	LOCI	F	40	0.50[1]	0.4	13.86[3]	0.2	0-96	
SS Week 26[7]	LOCI	M	150	2.61[1]	2.0	81.47[3]	0.9	0-96	
	LOCI	F	150	2.78[1]	2.2	60.95[3]	0.7	0-96	
	LOCI	M	600	8.50[1]	6.6	261.44[3]	2.8	0-96	
	LOCI	F	600	6.66[1]	5.2	211.28[3]	2.3	0-96	
	LOCI	M	1200	15.96[1]	12.5	507.68[3]	5.4	0-96	
	LOCI	F	1200	21.74[1]	17.0	442.32[3]	4.7	0-96	
Monkey	Clot	M	350	8.83	6.9	517	5.5	0-168	208260
SS Day 22[8]	Clot	M	1300	34.77	27	1850	19.9	0-168	
	Clot	M	3750	78.13	61	5895	63.3	0-168	
Monkey	Clot	M	350	9.42	7.4	483[5]	5.2	0-168	
SS Day 29[8]	Clot	M	1300	35.17	27	2221[5]	23.8	0-168	
	Clot	M	3750	95.59	75	6985[6]	75.0	0-168	

NR: not reported. SS: Steady state data. SD: Single dose. LOCI: Luminescent Oxygen Channelling Immunoassay. Clot: one stage clotting assay. – no data

1: C_{max} was measured as ng/mL by LOCI; ng/mL was converted to IU/mL by multiplying the C_{max} in ng/mL with; 152 IU/mg=0.000152 IU/ng

2: C_{max} ratio was calculate by dividing C_{max} (IU/ mL) in animal species with C_{max} (IU/mL) at 100 IU/kg from human SD

3:AUC_{0-t} was measured as hr*ng/mL in rat this was converted to h*IU/mL by multiplying AUC_{last} with 0.000152 IU/mL

4: AUC ratio was calculated by dividing AUC_{0-t} in animal species with AUC_{0-t} at 40 IU/kg in human Steady State (SS)

5: Mean of two to three animals

6: One animal

7: The dosing interval tau in rats was 5 days (120 hours). However, the last sample was taken 96 hours after dosing and therefore AUC_{0-96hr} is used in table

8: The dosing interval on monkey was one week (168 hours). Monkey data: AUC_{0-168} following dosing on Day 22: mean of eight animals

2.6.7.4 毒性試験：使用バッチ

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.7.4.1 非臨床試験で使用された各バッチの概括

Batch No.	Study ID	Type of Study
[redacted] (phase 1)	210259	Single-Dose Toxicity
	209353	Comparative immunogenicity study nonacog beta pegol and BeneFIX
[redacted] (phase 3)	210259	Single-Dose Toxicity
[redacted]	212143	6 wk repeat dose study Rowett Nude Rats
[redacted]	208260	4 weeks repeat dose toxicity study cynomolgus monkey
[redacted]	208260	4 weeks repeat dose toxicity study cynomolgus monkey
	208405	13 week repeat dose study cynomolgus monkey
[redacted]	208260	4 weeks repeat dose toxicity study cynomolgus monkey
	208405	13 week repeat dose study cynomolgus monkey
[redacted]	212513	26 wk Repeat dose Toxicity in Rowett Nude Rats
[redacted]	212513	26 wk Repeat dose Toxicity in Rowett Nude Rats
[redacted]	210439	Local Tolerance

2.6.7.4.2　原薬及び製剤の有効期限時における規格及び非臨床試験で使用された各バッチにおける含有量

				Study ID 208260 4 wk repeat dose toxicity in cynomolgus monkey (NOAEL 1300 IU/kg/week)	Study ID 210259 Single dose toxicity in rat, comparison phase 1 and phase 3 batch (NOAEL 2000 IU/kg)	Study ID 212513 26 wk repeat dose toxicity in Rowett nude rats (NOAEL 1200 IU/kg/5'th days)
Batch No					(Phase 1) (Phase 3)	
DS batch No				[1]	[1]	
Profile of nonacog beta pegol (method [redacted])		**DS EOSL spec**	**DP EOSL spec**	**Content in non-clinical batch**		
Mono-PEG rFIX (%)						
[redacted][2]-PEG rFIX (%)						
rFIX %						
Total impurities (%)						
Impurity	**Analytical Method**	**DS EOSL spec**	**DP EOSL spec**			
Drug Product (DP)						
*不純物4 (%) *不純物6 (%)						
*不純物3	(%)					
*不純物2-1	(%)					
*不純物2-2-1	(%)					

*新薬承認情報提供時に置き換え

				Study ID 208260 **4 wk repeat dose toxicity in cynomolgus monkey (NOAEL 1300 IU/kg/week)**			**Study ID 210259** **Single dose toxicity in rat, comparison phase 1 and phase 3 batch (NOAEL 2000 IU/kg)**			**Study ID 212513** **26 wk repeat dose toxicity in Rowett nude rats (NOAEL 1200 IU/kg/5'th days)**		
Drug Substance(DS)												
*不純物2-2-2 (%)												
HCP ppm												
*不純物7 (ppm)												
*不純物10 (ppm)												
*不純物11 (ppm)												

NA not applicable, [1]PEG profile measured as additional test parameter, not included in batch analysis documentation, [2]Content of [redacted] forms are approximately [redacted]%

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Article: Nonacog beta pegol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
Species qualification							
Human, Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis)*, Rabbit (*New Zealand White*) Rat (*sprague dawley*), Mouse (*C57/BL*), F9-KO mouse (*B6.129P2-F9tm1Dws*)	*In vitro* in plasma	NA	Nonacog beta pegol or BeneFIX® concentrations 0, 22.5, 45, 90, 180, 360 and 450 nM on top of endogenous FIX levels in plasma used.	NA	NA	Data showed that BeneFIX® and nonacog beta pegol have similar effect in a thrombin generation assay in normal human plasma and in plasma from cynomolgus monkeys thus demonstrating species cross-reactivity of human recombinant factor IX (rFIX) to the cynomolgus monkey coagulation system. The effect of BeneFIX®, and nonacog beta pegol were carefully studied in rat plasma both in platelet poor plasma and in fresh platelet rich plasma. BeneFIX® and nonacog beta pegol were not activated in rat plasma under a variety of experimental conditions in the thrombin generation assay, however pre-activated human FIX (rFIXa) was capable to elicit dose dependent thrombin generation in rat plasma. The effect of BeneFIX®	HeBa080802

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
						(representing rFIX) was studied in plasma from rabbit, normal mouse and FIX-knock out (F9-KO) mouse. Data showed that the activated partial thromboplastin time (aPTT) clotting time was prolonged in F9-KO mouse compared with normal mouse. Further more, data show that BeneFIX® was activated in rabbit and mouse plasma and that pre-activated (rFIXa) increased thrombin generation.	
Single-dose toxicity							
Rat (*Crl: WI (Han)*)	i.v. (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 / 0, 50, 250 and 500 IU/mL nonacog beta pegol in vehicle formulation)	Single dose	0, Phase 1 batch (0.03% rFIXa): 200, 1000, 2000 Phase 3 batch (0.12% rFIXa): 200, 1000, 2000	M: 5 F: 5	2000 for the Phase 1 and Phase 3 batch	Nonacog beta pegol up to 2000 IU/kg was well tolerated. There were no clinical signs in any of the animals and no macroscopic or microscopic findings. No difference in haematology, clinical chemistry or histopathology was observed at any of the dose levels or between batches.	210259

a - No Observed Adverse-Effect Level.

2.6.7.6 重要な試験以外の反復投与毒性試験

Test Article: Nonacog beta pegol

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
Rowett nude Rats (*Crl:NIH-Foxn1^{rnu})*	i.v. (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 / 0, 50 and 500 IU/mL nonacog beta pegol in vehicle formulation)	6 weeks	0, 40, 1200 twice weekly	M:5, F:5 (control), M:13; F:13 (treatment groups)	NA	No treatment related macroscopic- or histopathological findings. PEG was detected present by IHC staining in small vesicles in choroid plexus epithelial cells in all male rats and in 11 out of 13 female rats dosed 1200 IU/kg. No PEG was detected in choroid plexus of 40 IU/kg dose group. All animals were exposed to nonacog beta pegol, terminal half-life was 26 – 38 hours. C_{max} and AUC_{0-168} increased proportional to dose in males but increased greater than proportional to dose in females. There was slight accumulation during the treatment period. No anti-drug-antibody developed. The study confirmed the feasibility of the model for chronic toxicity assessment.	212143

Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/ Formulation	Duration of Dosing	Doses (IU/kg)	Gender and No. per Group	NOAEL[a] (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study ID
Cynomolgus monkey (*Macaca Fascicularis)*	i.v. (333 IU/mL 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 WFI (1 mL), pH = 6.8)	13 weeks	200 once weekly	M:8	NA	Six out of eight animals developed neutralising antibodies with effect on exposure after 5-6 dosing occasions. Signs of acquired haemophilia was seen in 4 out of 6 antibody positive animals i.e. increase in aPTT, bruising, swelling and rash were noted during the dosing and in the treatment-free period in antibody positive animals. In the two antibody negative animals, systemic exposure was documented throughout the study. No other treatment related macroscopic or microscopic findings. Brain tissue sections, including choroid plexus, were IHC stained for qualitative detection of PEG. These data were reported separately outside of the main study report (Module 4.2.3.2, 209200). After administration of 200 IU/kg nonacog beta pegol (for 13 weeks followed by a 5 week of recovery period), PEG could not be detected in in any brain structures.	208405

NA: not applicable, WFI: Water for injection, [a]NOAEL: No-Observed-Adverse-Effect-Level

2.6.7.7 重要な反復投与毒性試験

Test Article: Nonacog beta pegol

2.6.7.7.1 Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復皮下投与毒性試験：212513

<table>
<tr><td colspan="2">Report Title: 26 Week Toxicity Study by Intravenous Administration to Rowett Nude Rats (Crl:NIH-Foxn1^{rnu}) Followed by a 26 Week Treatment Free Period (GLP)</td><td>Study ID: 212513</td></tr>
<tr><td>Species/Strain: Rat/Crl:NIH-Foxn1^{rnu}</td><td>Duration of Dosing: 26 Weeks</td><td>Location in CTD: 4.2.3.2</td></tr>
<tr><td>Initial Age: Approximately 10 to 14 weeks</td><td>Duration of Postdose: 26 Weeks</td><td rowspan="3">GLP Compliance: Yes</td></tr>
<tr><td>Date of First Dose: 4 June 2013 (males); 13 June 2013 (females)</td><td>Method of Administration: Intravenous (bolus)</td></tr>
<tr><td colspan="2">Vehicle/Formulation: Sodium chloride (2.34 mg/mL), L-histidine (3.10 mg/mL), sucrose (10 mg/mL), mannitol (25 mg/mL), polysorbate 80 (0.05 mg/mL), pH 6.4 ± 0.1/ 0, 50, 50, 125, 250 IU/mL nonacog beta pegol in vehicle formulation</td></tr>
<tr><td colspan="3">Parameters collected: Body Weight, Clinical Observations, food consumption, Ophthalmoscopy, Haematology, Blood chemistry, Antibody Analysis, Toxicokinetics, Urinalysis, Organ Weights, Gross Pathology, Histopathology.</td></tr>
<tr><td colspan="3">Special Features: Immunohistochemistry (IHC) staining for the presence of PEG of the brain, spleen and skeletal muscle. Transmission electron microscopy of brain reported outside main study report (Module 4.2.3.2, 214495)</td></tr>
<tr><td colspan="3">No Observed Adverse-Effect Level: 1200 IU/kg every fifth day</td></tr>
<tr><td colspan="3">Brief summary: Nonacog beta pegol was well tolerated at doses ranging from 40-1200 IU/kg every fifth day. There were fourteen unscheduled deaths during the study including 6 of the control animals, 2 in the low dose group (40 IU/kg), none in the low mid dose group (150 IU/kg), 3 in the high mid dose group (600 IU/kg) and 3 in the high dose group (1200 IU/kg). The histopathological findings in these decedent animals appeared to be related to infections and no dose relation was seen. These infections were expected findings in this immune compromised animal model. A treatment related increase in PT was seen, normalising during recovery. No anti-drug antibodies developed and animals were exposed during the full treatment period. PEG was detected present by IHC staining in the blood of blood vessels of the brain, in connective tissue of the choroid plexus and in the cytoplasm of the choroid plexus epithelial cells at all dose levels 40-1200 IU/kg after 26 weeks treatment. PEG was also present in choroid plexus epithelial cells detected by IHC at 1200 IU/kg after 26 weeks recovery. Transmission electron microscopy (214495) was assesses on brain tissues including choroid plexus of high dose animals (1200 IU/kg) and control animals after 26 weeks dosing. PEG was found in vesicles (lysosomes) in epithelial cells of the choroid plexus. Judged from the overall cell ultrastructure, including rough endoplasmatic reticulum and polysomes, presence of PEG was not found to affect normal epithelial cell ultrastructure and there were no signs of cellular dysfunction. Although PEG was detected in the choroid plexus by IHC and transmission electron microscopy, no evidence of cellular vacuolation was observed by standard microscopic examination in any dose group and for this reason the presence of PEG by IHC on its own was not considered adverse. Based on absence of treatment related adverse findings evaluated by standard toxicological endpoints the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) for nonacog beta pegol in the study was considered to be 1200 IU/kg every fifth day.</td></tr>
</table>

Dose – nonacog beta pegol (IU/kg/fifth day)	**0**		**40**		**150**		**600**		**1200**	
Number of animals Main **Recovery**	**M: 18** **M: 9**	**F: 18** **F: 9**	**M: 18** **M: 0**	**F: 18** **F: 0**	**M: 18** **M: 0**	**F: 18** **F: 0**	**M: 18** **M: 0**	**F: 18** **F: 0**	**M: 18** **M: 9**	**F: 18** **F: 10**
Toxicokinetics:										
AUC_{last} (hr*ng/mL)										
Week 1	N/A	N/A	131000	91000	411000	290000	1400000	1110000	2710000	2700000
Week 26	N/A	N/A	148000	91200	536000	401000	1720000	1390000	3340000	2910000
C_{max} (ng/mL)										
Week 1	N/A	N/A	3900	3520	13700	14300	47200	37200	87000	111000
Week 26	N/A	N/A	3870	3260	17200	18300	55900	43800	105000	143000
<u>Noteworthy Findings</u>										
Died or Sacrificed Moribund	2	4	2	0	0	0	2	1	1	2
Haematology										
Prothrombin (sec)										
Week 13	23.8	24.7	+1	-2	+12**	+3	+18**	+8**	+21**	+15**
Week 26	25.6	23.5	+1	0	+6**	+1	+12**	0	+19**	+6*
Recovery Week 26	22.7	24.9	-	-	-	-	-	-	+7	+3
Immunhistochemistry (IHC)										
IHC staining brain choroid plexus (no. PEG positive)										
Main study animals										
Blood in blood vessels	0/18	0/18	9/18	8/18	17/18	17/18	18/18	17/18	18/18	18/18
Connective tissue	0/18	0/18	9/18	0/18	17/18	15/18	18/18	18/18	18/18	18/18
Epithelial cells (detected in small vesicles)	0/18	0/18	9/18	8/18	17/18	11/18	18/18	18/18	18/18	18/18
Brain parenchyma	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
Recovery animals										
Blood in blood vessels of brain	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	0/9	0/8
Connective tissue	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	0/9	0/8
Epithelial cells (detected in small vesicles)	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	9/9	8/8

Report Title: 26 Week Toxicity Study by Intravenous Administration to Rowett Nude Rats (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) Followed by a 26 Week Treatment Free Period (GLP)									**Study ID:** 212513	
Species/Strain: Rat/*Crl:NIH-Foxn1*^{rnu}		**Duration of Dosing:** 26 Weeks							**Location in CTD:** 4.2.3.2	
Brain parenchyma	0/4	0/4	-	-	-	-	-	-	0/9	0/8

*p<0.05, ** p<0.01, - not applicable

2.6.7.7.2 カニクイザルにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験及び安全性薬理試験：208260

Report Title: 40K PEG-rFIX 4 Week Intravenous Administration Toxicity and Safety Pharmacology Study in the Male Cynomolgus Monkey Followed by a 5 Week Treatment-Free Period		**Study ID:** 208260
Species/Strain: Cynomolgus Monkey/ *Macaca Fascicularis*	**Duration of Dosing:** 4 weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2
Initial Age: 67-141 weeks	**Duration of Postdose:** 5 weeks	**GLP Compliance:** Yes
Date of First Dose: 08 September 2008	**Method of Administration:** Intravenous	
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.		

Parameters collected:
Clinical observations, body weights, food consumption (qualitative assessment), blood pressures, electrocardiography, haematology, serum chemistry, toxicokinetics, antibody and neutralising antibodies, organ weights, gross pathology and histopathology

Special Features: Immunohistochemistry (IHC) staining for the presence of PEG of the brain, data reported outside main study report (Module 4.2.3.2, 209200), Effect of nonacog beta pegol and BeneFIX® on prothrombin time (PT) in normal human plasma and FIX-depleted human plasma was examined outside the main study report (Module 4.2.3.2, Memo)

No Observed Adverse-Effect Level: The No-Observed-Adverse-Effect-Level (NOAEL) for immunogenicity related effects (antibody formation to a species-foreign protein) was considered to be 350 IU/kg/week, and for non-immunogenic effects was considered to be 1300 IU/kg/week

Brief conclusion: Nonacog beta pegol was administered weekly intravenous at doses of 350, 1300 and 3750 IU/kg/dose. During central nervous system (CNS) assessment on Day 2 and 12 mild body tremors was seen on a single occasions in 7 out of 8 high dose animals (3750 IU/kg/week) and during clinical observation, tremors were noted on Day 15 in two high dose animals previously noted to have tremors present on Day 2 during CNS assessment. A treatment related increase in PT was seen, normalising during recovery. *In vitro* experiments spiking human plasma with increasing concentrations of nonacog beta pegol and BeneFIX® showed that high concentrations of FIX caused increase in PT and thus the increase in PT time seen in this study is likely to be an artefact due to the high FIX concentrations (Memo). Anti-drug antibodies were detected in the 5 out of 6 animals in the treatment free period. During treatment anti-drug-antibodies may be masked due to interference with drug present in plasma sample. Decrease in aPTT was seen post dose and is an expected pharmacological effect of FIX. An increase in aPTT above pre-treatment values can be used as a surrogate marker for development of neutralising anti-drug-antibodies cross reacting to endogenous FIX. From Day 15 and on-

wards a time and dose dependent increase in number of animals with an increase in aPTT > 38.1 s prior to dosing was seen; indicating development of neutralising cross reacting antibodies. Five high dose animals were terminated early due to signs of bleeding simultaneous with an increase in aPTT, indicating development of acquired haemophilia. Signs of acquired haemophilia were seen in one out of eight intermediate dose (1300 IU/kg) animals and six out of eight high dose (3750 IU/kg) animals. Signs of acquired haemophilia were defined as increase in aPTT coincident with a bleeding observed by clinical observations, macro- or microscopic pathology. No microscopic changes were seen in the brain or choroid plexus. Brain tissue sections including brain parenchyma and the choroid plexus were IHC stained by a qualitative detecting PEG and examined by microscopy (209200). In animals receiving 1300 or 3750 IU/kg, PEG was detected in the connective tissue of the choroid plexus and in the cytoplasm of a few choroid plexus epithelial cells. PEG was detected in blood in the brain vasculature at all three dose levels. No other brain structures showed positive PEG staining. Under the conditions of this study, based on lack of tremors and lack clinical and pathological findings other than those related to acquired haemophilia, the NOAEL for non-immunogenic effects of nonacog beta pegol was considered to be 1300 IU/kg/week. Based on the clinical and pathological findings indicative of acquired haemophilia as consequence of cross reacting neutralising antibodies, a NOAEL for immunogenicity-related effects was considered to be 350 IU/kg/week.

Daily Dose (IU/kg/week)		**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals	**(main)**	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
	(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
Toxicokinetic					
AUC_{last} (mean ± SD, h*IU/mL), clot activity					
	Day 1	-	379 ± 69	1365 ± 197	4424 ± 275
	Day 8	-	477 ± 54	1784 ± 271	5659 ± 1782
	Day 15	-	436 ± 147	1688 ± 580	3049 ± 2156
	Day 22	-	490 ± 137	1754 ± 607	3119 ± 2620
	Day 29	-	402 ± 170	1747 ± 968	3910 ± 2351[1]
AUC_{last} (mean ± SD, h*ng/mL), ELISA					
	Day 1	-	1953690 ± 278120	5811393 ± 740474	15513230 ± 1164557
	Day 8	-	2285575 ± 435989	7311985 ± 1744336	20861895 ± 11138102
	Day 22	-	2507156 ± 775580	7218768 ± 1773257	19147278 ± 17109277
	Day 29	-	1596444 ± 624661	11606274 ± 9848149	21302058 ± 10959600[1]
C_{max} (mean ± SD, IU/mL) clot activity					
	Day 1	-	7.37 ± 1.66	30.56 ± 3.91	84.93 ± 3.34
	Day 8	-	8.11 ± 0.53	31.92 ± 2.53	93.54 ± 7.50
	Day 15	-	8.91 ± 0.96	34.86 ± 4.05	84.62 ± 9.37
	Day 22	-	8.83 ± 1.02	34.77 ± 2.83	78.13 ± 18.25

Daily Dose (IU/kg/week)		0 (Control)	350	1300	3750
Number of animals	**(main)**	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
	(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
	Day 29	-	9.42 ± 1.31	35.17 ± 7.44	95.59 ± 6.60[1]
C_{max} (mean ± SD, ng/mL) ELISA					
	Day 1	-	37500 ± 9963	111902 ± 17037	286377 ± 82345
	Day 8	-	34958 ± 8267	116641 ± 26503	396360 ± 131286
	Day 22		42284 ± 3191	173322 ± 49543	500767 ± 119394
	Day 29	-	50558 ± 6679	268099 ± 79108	466043 ± 250295[1]
Noteworthy findings					
Neurological/CNS assessment - body tremor present					
Pre-treatment		0/5	0/8	0/8	0/8
Day 2		0/5	0/8	0/8	6/8
Day 12		-	-	-	1/8
Day 15		-	-	-	0/8
Day 16		-	-	-	0/8
Day 23		-	-	-	0/8
Clinical Observations					
Tremors- Day 15, 3 h post dose		0/5	0/8	0/8	2/8
Bruising		0/5	0/8	1/8	4/8
Swelling		0/5	0/8	0/8	3/8
Haematology					
Mean PT time (s) (% difference from pre-treatment values, Day 2-66)					
Pre-treatment(s)		13.0	13.5	12.8	12.45
Day 2 (24 h post dose 1)		-2.3	+5.2	+21.1**	+53.4***
Day 9 (24 h post dose 2)		-3.8	+5.2**	+22.7***	+55.8***
Day 16 (24 h post dose 3)		-3.8	+1.5	+25.8***	+51.0***
Day 23 (24 h post dose 4)		-5.4	+3.7**	+25.0**	+42.2**
Day 30 (24 h post dose 5)		-5.4	+1.5	+18.0**	+63.9***
Day 31 (48 h post dose 5)		+16.9	+13.3	+22.7	+63.1*

Daily Dose (IU/kg/week)		**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals	**(main)**	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
	(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
Treatment free period					
Day 39		-	-8.1	-3.1	-
Day 46		-	-4.4	+4.7	-
Day 53		-	-4.4	+2.3	-
Day 60		-	-7.4	+1.6	-
Day 66		-	+7.4	+19.5	-

Daily Dose (IU/kg/week)		**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals	**(main)**	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
	(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
Mean APTT time (s),					
(% difference from pre-treatment values of group mean)					
Pre-treatment		30.0	29.9	29.5	29
Day 2 (24 h post dose 1)		-15.7	-43.8**	-47.8**	-38.3
Day 8 (prior to dose)		0.0	-24.7***	-36.3***	-34.6***
Day 9 (24 h post dose 2)		-19.7	-43.8***	-47.8***	-37.2***
Day 15 (prior to dose)		-15.3	-24.7	-21.4	+3.4
Day 16 (24 h post dose 3)		+6.7	-40.1***	-41.4***	-29.7***
Day 22 (prior to dose)		-0.7	-8.7	+2.4	+13.5
Day 23 (24 h post dose 4)		+2.0	-35.1**	-37.6**	-13.5*
Day 29 (prior to dose)		-0.3	+5.4	+14.6	+85.3
Day 30 (24 h post dose 5)		-4.7	-23.7	-21.0	-31.2
Day 31 (48 h post dose 5)		-20.7	-36.5	-48.5**	-30.8
No of animals with aPTT increase above 38.1 s (highest 95% reference range of historical control animals at Covance Harrogate - UK) in pre-dose samples					
Pre-treatment (s)		30.0	29.9	29.5	29
Day 8		0/5	0/8	0/8	0/8
Day 15		0/5	0/8	0/8	2/8
Day 22		0/5	1/8	3/8	5/8
Day 29		0/5	2/8	3/8	2/4
Day 60		-	3/3	3/3	-
aPTT (s) prior to necropsy of the 5 high dose animals terminated due to acquired haemophilia (increase in aPTT coincident with a bleeding)					
Animal no 22 (Sample Day 22)		-	-	-	105
Animal no 23 (Sample Day 22)		-	-	-	85
Animal no 26 (Sample Day 28)		-	-	-	74.9
Animal no 27 (Sample Day 22)		-	-	-	100
Animal no 28 (Sample Day 36)		-	-	-	51

Daily Dose (IU/kg/week)		**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals	**(main)**	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
	(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
Antibody analysis (Antibody positive animals out of no examined)					
	Day 28	-	-	-	1/1
	Day 31	0/5	0/5	0/5	0/2
	Day 36	-	-	-	1/2
	Day 66	-	2/3	3/3	-
Necropsy					
Due to the overall condition of high dose animals early termination was necessary, scheduled or unscheduled time for necropsy outlined below					
Main study animals :					
	Scheduled early kill	0	0	0	2 (Day 24)
	Unscheduled early kill	0	0	0	1 (Day 28)
	Scheduled Terminal kill Day 31	5	5	5	2
Recovery animals:					
	Scheduled early kill	-	0	0	2 (1 Day 24, 1 Day 36[2])
	Unscheduled early kill	-	0	0	1 (Day 36)
	Scheduled Terminal kill Day 66	-	3	3	-
Scheduled early kill Day 24 (main and recovery) animals					
Number of animals examined		-	-	-	3
Macroscopic pathology					
Skin/subcutis head and/or leg					
- Thick		-	-	-	2
- Red		-	-	-	3
Histopathology					
Skin/subcutis					
- Haemorrhage/cellulitis		-	-	-	3
Brain					

Daily Dose (IU/kg/week)		**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals	**(main)**	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
	(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
- Congestion / haemorrhage		-	-	-	1

Daily Dose (IU/kg/week)	**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals (main)	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
Unscheduled early kill (main and recovery) animals				
Number of animals examined	0	0	0	2 (Day 28 and 36)
Macroscopic pathology				
Brain and spinal cord				
- Red discolouration	-	-	-	1
- Red/dark substance	-	-	-	1
Skin/subcutis				
- Red areas	-	-	-	1
Histopathology				
Brain				
- Congestion / haemorrhage	-	-	-	1
Spinal chord				
- Haemorrhage	-	-	-	1
Skin/subcutis				
- Haemorrhage/cellulitis	-	-	-	1
Scheduled terminal kill main animal				
Number of animals examined	5	5	5	2
Macroscopic pathology				
Muscle				
- Red area	-	-	1	-
Histopathology				
Brain				
- submeningeal congestion / haemorrhage	-	-	-	1
Right quadriceps				
- Haemorrhage	-	-	1	-

Daily Dose (IU/kg/week)	**0 (Control)**	**350**	**1300**	**3750**
Number of animals (main)	**M:5**	**M:5**	**M:5**	**M:5**
(Recovery)	**M:0**	**M:3**	**M:3**	**M:3**
Scheduled terminal kill recovery animals				
Number of animals examined	0	3	3	1 (Day 36)
Noteworthy macroscopic findings	-	-	-	-
Noteworthy histopathology findings	-	-	-	-

Statistical significance: * P<0.05 ** P<0.01 *** P<0.0010, - no data
[1]Based on the four surviving animals
[2]One animal was terminated for ethical reasons since it was the only animal left.

2.6.7.8 遺伝毒性試験： in vitro

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.3.

2.6.7.9 遺伝毒性試験： in vivo

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.3.

2.6.7.10 がん原性試験

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.4.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.5.

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

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.5.

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.5.

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

No studies performed, scientific justification provided in 2.4.4.5.

2.6.7.15　局所刺激性試験

Test Article: Nonacog beta pegol

According to ICH S6, the evaluation of local tolerance was included in the pivotal cynomolgus monkey repeated dose toxicity study.

Species/ Strain	**Method of Administration**	**Doses (IU/kg)**	**Gender and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Study ID**
Rabbit/ *New Zealand White*	i.v.; i.a; perivenous	0, 40	4 males per injection site	A single dose of 0.23 ml per animal of nonacog beta pegol administered in the right ear or the corresponding vehicle administered in the left ear by either perivenously, intravenously or intraarterially, caused some local clinical (haemorrhage/bruising and swelling) and microscopically reactions. These reactions were more pronounced after intraarterial administration and with a tendency to slightly higher scores after treatment with the test item than after treatment with vehicle.	210439
Rowett nude rat/*Crl:NIH-Foxn1rnu*	i.v.	0, 40, 150, 600, 1200	Main: 18 male and females per treatment group Recovery: 9 male/female (vehicle control), 9/10 male/females (1200 IU/kg)	No treatment related local reactions. Findings at the intravenous injection sites of the tail were observed at a similar incidence and severity in control and treated animals. All findings occurred at a low incidence, were of minimal or slight severity and were considered related to the intravenous administration procedure and not to treatment with nonacog beta pegol.	212513
Cynomolgus monkey/*Macaca Fascicularis*	i.v.	0, 350, 1300, 3750	8 males (treatment groups) 5 males (vehicle control)	No treatment related local reaction were seen, but minor procedural related local injection site reaction (minimal phlebitis/peri-phlebitis, fasciitis/fibrosis) were seen by microscopic examination in all dose groups, including controls.	208260

2.6.7.16　その他の毒性試験

Test Article: Nonacog beta pegol

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg or mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Antigenicity						
Rats/*HsdHan™:WIST*	i.v.	8 weeks (4 cycles of 2 weeks dosing and 1 week off dose)	25 and 200 daily doses of BeneFIX® or 25 and 200 weekly doses of nonacog beta pegol	10M and 10F	Antibody formation was seen in 3 animals dosed with 25 /IU/kg/day BeneFIX®and 3 animals dosed with 25 IU/kg/week nonacog beta pegol. In conclusion, no difference in immunogenicity between BeneFIX® and nonacog beta pegol was observed.	209353
40 kDa PEG alone studies						
Rat/*HsdHan™:WIST*	i.v.	2 and 6 weeks	12.8 or 33.4 mg/kg every second day corresponding to 45 or 117 mg/kg/week of 40 kDa PEG	3M + 3F	Vacuolation of macrophages in the interstitium of choroid plexus of brain, the red pulp of the spleen (45 and 117 mg/kg/week) and, to a lesser extent, in the mandibular and mesenteric lymph node (117 mg/kg/week) was detectable only after six weeks of treatment. The administration of 40K PEG also caused a reduction of bodyweight gain and food consumption in males, indicating a non-systemic toxic effect, but at the lowest dose the effect on bodyweight occurred only from the end of Week 2. The test material also caused a small prolongation of APTT, which is expected to be due to assay interference.	209294

Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (IU/kg or mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	Study ID
Cynomolgus monkey/*Macaca Fascicularis*	i.v.	2, 6 or 13 Weeks	2 or 12.8 mg/kg every second day corresponding to 7 or 45 mg/kg/week of 40 kDa PEG	3M	Minimal vacuolation of the epithelial cells of the choroid plexus in the brain was observed only after six weeks of treatment at 45 mg/kg/week where it was seen in 2/3 animals. This dose did not cause this finding after two weeks. Neither did a 13 week treatment period at 7 mg/kg/week result in the formation of these vacuoles. There were no other significant findings in this study and no cellular vacuolation was seen in other organs examined. The slight prolongation of APTT was an expected assay-related finding with this type of test material.	209215