2.4　非臨床試験の概括評価の目次

2.4.1　非臨床試験計画概略 2
2.4.2　薬理試験 4
2.4.2.1　効力を裏付ける試験 5
2.4.2.2　副次的薬理試験 6
2.4.2.3　安全性薬理 6
2.4.2.4　薬力学的薬物相互作用 7
2.4.3　薬物動態試験 8
2.4.3.1　分布 9
2.4.3.2　代謝 9
2.4.3.3　排泄 9
2.4.3.4　その他の薬物動態試験 9
2.4.4　毒性試験 11
2.4.4.1　全身曝露量 13
2.4.4.2　単回投与毒性試験 13
2.4.4.3　反復投与毒性試験 13
2.4.4.4　遺伝毒性 14
2.4.4.5　がん原性 14
2.4.4.6　生殖発生毒性試験 14
2.4.4.7　局所刺激性 14
2.4.4.8　その他の毒性試験 14
2.4.4.8.1　幼若動物における試験 14
2.4.4.8.2　免疫原性及び組織交差反応性 14
2.4.4.8.3　その他の試験：PEG-60-マレイミド-システイン（BAY 1025662）の毒性試験 15
2.4.5　総括及び結論 16
引用文献一覧 20

略語一覧 2.6.1 参照

2.4　非臨床試験の概括評価

2.4.1 非臨床試験計画概略

BAY 94-9027〔一般名：ダモクトコグ　アルファ　ペゴル（遺伝子組換え）、2.6.1〕は、部位特異的にポリエチレングリコール（PEG）化した B ドメイン欠失（BDD）遺伝子組換えヒト血液凝固第Ⅷ因子（rFⅧ）（BDD-rFⅧ）であり、導入システイン残基（完全長 rFⅧのアミノ酸配列番号で 1804 に相当）に 60kDa の分枝型 PEG 1 分子が結合している（2.3.S.1.2）。BAY 94-9027 は、内因系凝固カスケードにおいて補助因子として機能する非修飾の rFⅧと同じ作用機序及び活性をもつことから、欠乏した FⅧを補充することが可能である〔血友病 A（FⅧ欠乏症）及び補充療法については 2.5.1.3 を参照〕。BAY 94-9027 における部位特異的な PEG 化は、血漿クリアランスの減少を介して血漿中の FⅧ活性-時間曲線下面積（AUC）を増大させ、消失半減期の延長をもたらし、効力の持続時間を延長する。

BAY 94-9027 の非臨床試験プログラムに関して、複数の規制当局と相談を実施し、[redacted]により BAY 94-9027 及び BAY 1025662 の幼若ラットにおける試験、及び PMDA の要請（[redacted] 年 [redacted] 月）により雌ラットにおける BAY 94-9027 の 2 週間反復投与毒性試験を実施した。さらに [redacted] との議論（[redacted] 年 [redacted] 月）に基づいて、免疫不全 Rowett nude 雄ラットにおける BAY 94-9027 の 6 ヵ月間投与毒性試験を [redacted] 年 [redacted] 月に開始した。

正常な血液凝固能をもつラット及びウサギを用いて、安全性薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験を実施した。ラットは、毒性試験において最も汎用される動物種であり、ウサギはその他の rFⅧ製剤〔コージネイト FS（BAY 14-2222）、2.6.1〕の毒性試験に用いられている。臨床投与経路に従い、非臨床試験では静脈内投与を用いた。

BAY 94-9027 の非臨床試験として、効力を裏付ける試験及び安全性薬理試験（2.6.2、2.6.3）、薬物動態試験（2.6.4、2.6.5）、並びに毒性試験（2.6.6、2.6.7）を実施した。

また、BAY 94-9027 の 60kDa PEG 部（PEG-60-マレイミド-システイン＝PEG-60-Mal-Cys＝BAY 1025662）の薬物動態、排泄及び分布を評価するために、非標識体又は ^{14}C 標識体の BAY 1025662 を用いた試験を実施した（2.6.4、2.6.5）。さらに、BAY 1025662 を用いて、単回投与毒性及び反復投与毒性、並びに幼若動物における毒性を評価した（2.6.6、2.6.7）。

効力を裏付ける試験として、BAY 94-9027 の *in vivo* での有効性を血友病 A マウス出血モデル及び血友病 A イヌ 出血モデルで評価した。安全性薬理試験については、日米 EU 医薬品規制調和会議（ICH）ガイドライン S6（R1）「バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価」〔ICH S6(R1)〕に従い、独立した試験による詳細な検討は必要ないと判断し実施しなかったが、中枢神経系及び腎機能に関する安全性薬理パラメータを、ラット 2 週間反復投与毒性試験のデザインに組み込み評価した。なお、rFⅧ及び PEG のいずれも、心血管系や呼吸器系などの生命維持に重要な器官系に影響を及ぼさないことが知られていることから、これらの評価項目については検討しなかった。BAY 94-9027 の臨床試験で認められた過敏症反応と有効性の欠如（2.5.5.3.3.3.2）を詳細に検討するため、一連の *in vitro* 及び *in vivo* の探索的免疫原性試験を実施した（2.6.2.2.3）。

薬物動態試験では、動物血漿中の BAY 94-9027 は、マイクロプレートに固相化した抗 PEG 抗体又は抗 FⅧ抗体によって捕捉した後、発色合成基質を用いた酵素活性の測定により血漿中 FⅧ活性として定量した。対象とする患者集団の 99%超は男性であることから、ラットを用いた試験では主に雄性を、ウサギを用いた試験では雄性のみを使用した。雌雄のラットを用いた薬物動態試験において、性差はみられなかった。

毒性試験の目的は、潜在的有害作用の特定、潜在的標的臓器毒性の特定及びその可逆性の検討を行うことである。規制当局と相談し、雄動物のみを毒性試験で使用した。例外は雌ラットにおける BAY 94-9027 の 2 週間反復投与毒性試験であり、日本の当局（PMDA）の要請により実施し、雄ラットでの試験方法とほぼ一致させた。ヒトたん白質に対する中和抗体（nAb）が産生され FⅧを失活させることから、各規制当局との合意の上で、BAY 94-9027 の投与期間は 2 週間に限定した。局所刺激性の検討は、BAY 94-9027 の単回及び反復投与毒性試験の一部として行った。長期投与における安全性リスクはないものと考えられるものの、[redacted] との議論に基づいて、免疫不全 Rowett nude 雄ラットにおける BAY 94-9027 の 6 ヵ月間投与毒性試験（26 週間回復を含む）を [redacted] 年 [redacted] 月に開始した。

BAY 1025662 を用いた 4 週間反復投与毒性試験及び幼若動物試験において静脈投与の安全性、特に PEG に関連した細胞質空胞化の可能性を評価した。4 週間以内に細胞質空胞化の有無が検討できると考えられたため、臨床に比較してかなり高用量の PEG-60 用量（4800 倍まで）を選択した。N8-GP 及び N9-GP[1, 2] の長期投与試験で示されているように、ヒトにおいて達成できない程の高用量を用いない限り、通常の曝露倍数の投与量を用いた、長期の投与試験で PEG 関連毒性は発現しないことから、長期の試験は実施しなかった。したがって、PEG-60 は長期投与ではなく、高用量による試験を実施した。BAY 1025662 の薬物動態試験も実施しているが、曝露量を確認するためトキシコキネティクス評価を行った。

生殖発生毒性試験は、BAY 94-9027 を投与する患者集団は大部分が男性であるため、各国規制当局と合意の上で実施しなかった。さらに市販されている rFⅧ製剤の臨床経験により、rFⅧによる生殖への影響はないことが示されている。ICH S6 (R1)の推奨に従い、反復投与毒性試験において雄生殖臓器の病理組織学的検査を行い、これらの臓器に影響がないか評価した。

成熟動物における毒性試験で成長中の臓器系に毒性は認められなかったが、[redacted]に従い、BAY 94-9027 及び BAY 1025662 の幼若ラットにおける試験を実施した。

遺伝毒性試験又はがん原性試験は、ICH S6 (R1)に従い、BAY 94-9027 では実施しなかったが、BAY 1025662 については、標準的組合せの遺伝毒性試験を実施した。

血友病 A マウスモデルにおいて BAY 94-9027 とコージネイト FS（BAY 14-2222）の比較免疫原性試験を実施し、PEG 化が抗 FⅧに対する結合抗体及び中和抗体の産生に及ぼす影響を検討した。BAY 94-9027 のげっ歯類及び非げっ歯類を用いた主要な反復投与毒性試験においても、FⅧ及び PEG に対する結合抗体及び中和抗体の産生を評価し、BAY 14-2222 と比較した。

In vitro ヒト組織交差反応性試験（TCR）において、BAY 94-9027 の組織特異的結合性を評価し、BAY 14-2222 と比較した。

非臨床試験で使用した BAY 94-9027 のロットは GLP 又は GMP 下で製造した（使用ロット：薬理試験 2.6.3.2、薬物動態 2.6.5.2-4、毒性試験 2.6.7.4 の各表を参照。各ロットの分析結果は 2.3.P.5.4 を参照のこと）。血友病 A イヌでの *in vivo* 薬理試験の一部では、HKB11 細胞株産生 BAY 94-9027 製剤を用いた。毒性試験に用いた試験製剤は、開発後期、すなわち第Ⅲ相臨床試験における製剤を代表するものであった。すべての主要な安全性薬理試験及び毒性試験は現行の試験ガイドライン（ICH、OECD、FDA）に従い、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。試験計画書からの逸脱はいずれも、試験の解釈又は質に影響を及ぼすものではなかった。GLP 試験における投与溶液はすべて許容範囲内であった。すべての試験は経済協力開発機構（OECD）加盟国の試験施設において実施した。

2.4.2 薬理試験

BAY 94-9027 の *in vitro* 凝固活性（力価）は、合成基質法及び凝固一段法による測定で確認されている（2.3.P.2.2.3.11）。*In vivo* 有効性は、マウス及びイヌの血友病 A モデルで薬物動態及び効果を検討し評価した。ICH S6(R1)に従い、中枢神経系及び腎機能の安全性薬理パラメータを、ラット 2 週間反復投与毒性試験の一部として評価した。

更に、臨床試験において認められた過敏症反応及び有効性の欠如（2.5.5.3.3.3.2）に関し、追加の検討として一連の探索的免疫原性試験を実施した（2.6.2.2.3）。これらの探索的試験結果は、血友病 A マウスにおける比較免疫原性試験（2.6.6.8.2）及び健康被験者の血清における補体活性化の *in vitro* 試験（2.6.6.8.3）により補完される。

表 2.4.2- 1 に薬理試験及び探索的免疫原性試験を要約する。

表 2.4.2- 1　BAY 94-9027 の薬理試験一覧

Title	Test system (incl. species, method of administration)		Dosing information (concentration)	Reference
Assessment of effects of BAY 94-9027 on clotting in diluted normal plasma of dog, rabbit, and human using the aPTT assay	In vitro plasma (Dog, Rabbit, Human)		0.078-10 IU/mL	4.2.1.1.1 CB-2011-07
Pharmacokinetics of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in a hemophilia A mice	Hemophilia A mouse	IV once	BAY 94-9027: 167 IU/kg or BAY 14-2222: 210 IU/kg	4.2.1.1.2 CB-2010-10
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in the tail clip bleeding model of hemophilia A mice	Hemophilia A mouse	IV once	10, 20, 40, 100, and 200 IU/kg BAY 94-9027 or BAY 14-2222	4.2.1.1.3 CB-2010-11
Efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 949027T070209 in the tail vein transection model of hemophilia A mice	Hemophilia A mouse	IV once	4, 12, 24, 40, and 60 IU/kg BAY 94-9027 or BAY 14-2222	4.2.1.1.4 CB-2010-12
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94-9027 lot 2007.046-80 Early SP in hemophilia A dogs	Hemophilia A dog	IV once	Target 50 IU/kg of BDD-FVIII or BAY 94-9027	4.2.1.1.5 CB-2009-29
Pharmacokinetic and efficacy evaluation of BAY 94- 9027 lot 27N27H0	Hemophilia A dog	IV once	Target 50 IU/kg of BAY 94-9027 or BAY 14-2222	4.2.1.1.6 CB-2012-10

表 2.4.2- 1 BAY 94-9027 の薬理試験一覧（続き）

Title	Test system (incl. species, method of administration)		Dosing information (concentration)	Reference
Exploratory Immunogenicity Studies with BAY 94-9027				
Characterization of T-cell independent immune response to BAY 94-9027 in C57BL/6 and BALB/c mice in the presence or absence of TLR4 or TLR7/8 activator	C57BL/6J; BALB/cJ	IV	0.1 mg/kg BAY 94-9027	4.2.1.1.7 PH-39382
Exploratory BAY 94-9027 (KGN) single dose mini pig study	Mini pig	IV	BAY 94-9027: 100 IU/kg	4.2.1.1.8 PH-39379
Reduced antigen uptake, presentation, T cell activation and antibody production in vitro and in vivo	Hemophilia A mouse	IV	BAY 94-9027: 200 IU/kg BAY 14-2222: 200 IU/kg	4.2.1.1.9 PH-39381
	Human cells	In vitro	BAY 94-9027, BAY 14-2222, BDD-rFVIII: each 3.5 nmol	
Safety Pharmacology with BAY 94-9027				
CNS endpoints were assessed after administration on day 1 (included in 2-week toxicity study in rats A48103)	Male SD rat	IV	BAY 94-9027: 75, 750, 2250 IU/kg; BAY 14- 2222: 2250 IU/kg	4.2.3.2.1 A48103 (GLP)
Renal function endpoints were assessed after administration on day 3 (included in 2-week toxicity study in rats A48103)	Male SD rat	IV	BAY 94- 9027: 75, 750, 2250 IU/kg; BAY 14- 2222: 2250 IU/kg	4.2.3.2.1 A48103 (GLP)

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

BAY 94-9027 の力価が合成基質法及び凝固一段法により測定されており（2.3.P.2.2.3.11）、BAY 94-9027 の *in vitro* 凝固活性が確認されている。様々な動物種の凝固活性における BAY 94-9027 の影響は、各種動物（ウサギ、イヌ及びヒト）の希釈血漿中において、活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）を比較測定し評価した。その結果、BAY 14-2222 及び BAY 94-9027 はいずれも各種動物の希釈血漿の凝固を用量依存的に促進した。BAY 14-2222 及び BAY 94-9027 の凝固促進能は、ヒト血漿で最も強く、イヌ血漿、ウサギ血漿の順であった（2.6.2.2.1）。これらの *in vitro* 試験において、PEG 化は rFⅧ分子の凝固活性に影響を及ぼさないことが確認された。

BAY 94-9027 の有効性（急性効果及び出血予防効果）を評価するために、*in vivo* での効力を裏付ける試験を実施した。主要な試験である血友病 A マウスの試験では、BHK21 細胞株産生製剤の GLP ロットを用いて検討した。このロットは主要な GLP 毒性試験においても用いられている。血友病 A イヌの試験では、HKB11 細胞株（研究用細胞株）産生製剤を用いて実施した後、BHK21 細胞株産生製剤を用いて再度実施した（2.6.2.2.2）。

血友病 A マウス尾切断出血モデルにおける BAY 94-9027 の急性効果は、BAY 14-2222 と同等であり、また、BAY 14-2222 と比べ向上した BAY 94-9027 の薬物動態プロファイルと相関し、

BAY 94-9027 の出血予防効果は BAY 14-2222 に比べ長時間持続した。血友病 A イヌにおいても BAY 94-9027 は急性出血に対する効果を示し、効果の延長も認めた。

探索的免疫原性試験

BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 に対する抗体反応について、2 系統の野生型マウスに BAY 94-9027 を投与することにより検討した（2.6.2.2.3）。0.1mg/kg の BAY 94-9027 を静脈内投与したときの IgM 及び IgG 抗体価を半定量的に測定した。投与後 10 日まで採取した血漿試料及び 8 ヵ月間の休薬後に 10 日間反復投与して採取した血漿試料を解析したところ、抗 PEG 反応は IgM アイソタイプのみであり、反復投与しても IgG アイソタイプへクラススイッチすることはなかった。この抗 PEG IgM 反応は、Toll 様受容体（TLR）リガンドの共存による炎症誘発性環境下で増強した。これらの結果から、BAY 94-9027 の PEG 部分に対する IgM 反応は T 細胞非依存性であり、IgG へクラススイッチすることはないことが示された。マウスモデルでは抗 PEG IgM 反応が確認されたが、一般的に動物モデルでの免疫原性の結果はヒトに直接外挿し難いことから、結果の解釈については留意が必要である。

また、比較免疫原性試験（2.6.6.8.2）と同様に、200IU/kg の BAY 94-9027 を週 1 回 4 週間投与した血友病 A マウスの FⅧ特異的抗体価は、非 PEG 化 FⅧを投与した血友病 A マウスに比べ低かった。*Ex vivo* 試験において、抗原提示細胞である樹状細胞（DC）、及び T 細胞が BAY 94-9027 の免疫原性に及ぼす影響を検討した結果、マウス DC を用いた抗原取込み試験では、BAY 94-9027 の取込みは非 PEG 化 FⅧである BAY 14-2222 に比べ低かった。また、BAY 94-9027 を 4 回投与後のマウスの脾臓 T 細胞の活性化を評価したところ、BAY 14-2222 投与マウスに比べ BAY 94-9027 投与マウスの T 細胞の反応は弱かった。T 細胞は抗体産生 B 細胞の増殖及び分化を支援するサイトカインを産生することから、BAY 94-9027 の免疫原性の低さは、DC 及び T 細胞との相互作用に関係していると考えられた。このことから、BAY 94-9027 のヒト DC 及びヒト T 細胞に対する作用も評価した。その結果、ヒト細胞を用いた *in vitro* 試験においても DC 内への移行が低減し、インヒビター保有患者由来の FⅧ特異的 T 細胞の増殖及びサイトカイン（インターフェロンγ）産生も低かったことから、前述の考察はヒトにも適用され得ると考えられた。

2.4.2.2 副次的薬理試験

副次的薬理試験は実施していない。

2.4.2.3 安全性薬理

rFⅧ及び PEG はともに、広範な非臨床試験成績と市販後の臨床経験を有するよく知られた分子であり、安全と考えられる。rFⅧ及び PEG のいずれも、中枢及び末梢神経系、心血管系、呼吸系などの生命維持に重要な器官系に対し影響を及ぼさないことが知られている。このため、ICH S6(R1)に従い、BAY 94-9027 の影響を独立した安全性薬理試験で詳細に検討する必要はないと判断したが、中枢神経系及び腎機能の安全性薬理パラメータ評価をラット 2 週間反復投与毒性試験に組み入れた（2.6.2.4）。

ラットにおいて、中枢神経系、自律神経系、神経筋系並びに感覚運動系、及び生理機能のパラメータに対する影響は認められず、水分及び電解質（ナトリウム及びカリウム）排泄などの腎機能パラメータにも影響はみられなかった。さらに、クレアチニンクリアランス、たん白質及び

N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ排泄などの糸球体及び尿細管機能のマーカーの上昇も認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

[redacted]において、鎮痛剤と BAY 94-9027 の薬力学的薬物相互作用の可能性について言及された。市販の PEG 化製剤及び PEG 自身と鎮痛剤の間での相互作用は報告されていないことから、薬力学的薬物相互作用試験の実施は必要ないと判断した（2.6.2.5）。

2.4.3 薬物動態試験

ラット及びウサギを用いて、BAY 94-9027 を単回投与したときの薬物動態、及び毒性試験の一環として BAY 94-9027 を反復投与したときの全身曝露量（トキシコキネティクス）を評価した。さらに、PEG 部〔60kDa PEG（PEG-60）、リンカー及びシステインを含む部分（PEG-60-マレイミド-システイン、BAY 1025662）〕をラットに単回投与し、排泄及び分布を検討した。

表 2.4.3- 1　薬物動態試験の概要

Study type	**Species (N)/test system**	**BAY 94-9027**	
		Route	**Dose [IU/kg]**
Pharmacokinetics after a single dose			
4.2.2.2.1 A47788	Rat male (4-13/time point)	IV	60, 250, 800
	Rabbit male (8)	IV	25, 100, 400
4.2.2.2.3 A47769	Rat male (2x3/time point)	IV	750
4.2.2.2.2 PH-39789	Rat female (2x3/time point)		
Pharmacokinetics after repeated dose (refer to Toxicology Module 2.6.6.3).			
Study type	**Species (N)/test system**	**BAY 1025662**	
		Route	**Dose [mg/kg]**
Pharmacokinetics and renal excretion after single dose of BAY 1025662 4.2.2.7.9 PH-38878	Rat male (3-4/time point)	IV	11
Distribution after single dose of [^{14}C]BAY 1025662 4.2.2.7.12 PH-39641	Rat male (1/time point)	IV	11
Mass balance after single dose of [^{14}C]BAY 1025662 or [prop-^{14}C]BAY 1025662 4.2.2.7.10 PH-37841; 4.2.2.7.11 PH-39637	Rat male (3/time point)	IV	11
Pharmacokinetics after repeated dose (refer to Toxicology 2.6.6.8.5).			

ラット及びウサギに BAY 94-9027 を単回静脈内ボーラス投与したとき、検討した用量範囲において血漿中 FⅧ活性の薬物動態は線形であった。血漿クリアランスは、ラット（4.5～5.5mL/h/kg）及びウサギ（3～5mL/h/kg）において非常に低かった。また、両動物種において、定常状態における分布容積は小さく、0.05～0.07L/kg であった。また、血漿中 FⅧ活性の終末相における消失半減期は、ラットで約 8 時間、ウサギで約 12 時間で、市販されている非 PEG 化 FⅧ製剤の BAY 14-2222 を投与したときの血漿中 FⅧ活性の終末相における消失半減期と比較して、ラットで 1.7 倍、ウサギで 1.3 倍長かった。BAY 94-9027 を単回投与したときの血漿中曝露量

〔体重あたりの投与量（IU/kg）で標準化した投与 0 時間から無限大時間までの FⅧ活性-時間曲線下面積（AUC_{norm}）〕は、薬物動態試験とトキシコキネティクス試験で同程度であった。

2.4.3.1 分布

BAY 94-9027 は PEG 化 BDD-rFⅧであり、ICH S6（R1)に従い、分布試験は実施しなかった。

2.4.3.2 代謝

BAY 94-9027 は PEG 化 BDD-rFⅧであり、ICH S6（R1)に従い、代謝試験は実施しなかった。

2.4.3.3 排泄

BAY 94-9027 は PEG 化 BDD-rFⅧであり、ICH S6（R1)に従い、排泄試験は実施しなかった。

2.4.3.4 その他の薬物動態試験

ラットを用いた試験において、非標識又は ^{14}C 標識した BAY 1025662（PEG-60-マレイミド-システイン）を、ヒトに生涯にわたって BAY 94-9027 を投与したときの PEG-60 としてのおよその総投与量に相当する 11mg/kg の用量で単回静脈内ボーラス投与した。BAY 1025662 の排泄及び分布を検討するために、マレイミドリンカー中の異なる位置を標識した 2 種類の BAY 1025662 の ^{14}C 標識体を合成した。最初に合成した ^{14}C 標識体（[^{14}C]BAY 1025662）は、マレイミド分子中の炭素が ^{14}C 標識されているのに対し、2 番目に合成した ^{14}C 標識体（[prop-^{14}C]BAY 1025662）は、リンカーのプロピオン酸中の炭素が ^{14}C 標識されている。

特に記載しない限り、すべての用量及び濃度は、BAY 1025662 当量として示した。

BAY 94-9027 の PEG 部の生体内運命を評価するために、マレイミドリンカーの末端に BDD-rFⅧの代わりにシステインを結合させたサロゲート分子である BAY 1025662（PEG-60-マレイミド-システイン）を合成した。ラットに BAY 1025662 を単回投与したときの血漿中 BAY 1025662 の薬物動態を検討した。さらに、ラットに ^{14}C 標識した BAY 1025662 を単回投与したときの排泄及び分布試験を実施し、放射能の薬物動態及びサイズ排除クロマトグラフィーによる尿中放射能の成分を評価した（4.2.2.7.11 PH-39637）。BAY 1025662（BAY 94-9027 の PEG 部）の薬物動態は、BAY 94-9027 の薬物動態及び BAY 94-9027 から放出された PEG 部の薬物動態を正確に反映していない可能性があるが、BAY 1025662 の排泄及び分布の評価結果からは、BAY 94-9027 から放出された PEG 部の消失経路に関して重要な知見が得られると考えられる。代謝を受けて PEG 化たん白質から放出された PEG 部の律速クリアランスは、PEG のみを単独投与したときと類似していると考えられる[3)]。

雄性 Wistar ラットに BAY 1025662 を 11mg/kg の用量で単回静脈内ボーラス投与したとき、投与後 24 時間までに、投与量の 5.2%の BAY 1025662 が尿中に排泄された。その後も持続的に尿中に排泄され、投与後 7 日までに投与量の約 14%の BAY 1025662 が排泄された（4.2.2.7.9 PH-38878）。

血漿中濃度の経時推移と同様に、BAY 1025662 の累積尿中排泄率の経時推移は双指数関数的であった。BAY 1025662 は、投与後 7 日～14 日にかけて、血漿中の消失半減期と同程度の半減期（約 6 日）で尿中に排泄されたことから、尿中排泄が循環血中からの消失と密接に関係していることが示唆された。このことは、高分子 PEG に関する報告[4)]と良く一致する。

ラットに[prop-^{14}C]BAY 1025662 を単回静脈内ボーラス投与したとき、投与後 7 日までに投与量の 30.4%が排泄され、尿中への排泄が主であった（尿中に投与量の 23.7%、糞中に 6.27%が排泄された）。放射能の排泄は、徐々に減少していったが、試験終了まで持続した。1 日の放射能の排泄量は、投与量の 3.59%（投与後 2～3 日）から 0.025%（投与後 230～231 日）に減少した。投与後 168 日までに尿糞中に排泄された放射能は投与量の 82.6%であった〔尿中に 68.4%（投与後 231 日まで評価）、糞中に 13.8%が排泄された〕。ラット尿試料の高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いたプロファイリングにより、大部分の放射能は未変化体（BAY 1025662）として尿中に排泄されることが示唆された〔投与後 7 日（168 時間）までに回収した尿中放射能の 74%が未変化体で、投与量の 17.6%に相当した〕。この結果は、非標識の BAY 1025662 を投与したときの尿中 BAY 1025662 の排泄率を検討した結果（4.2.2.7.9 PH-38878）と良く一致していた。排泄データについてまとめると、雄性 Wistar ラットに ^{14}C 標識した BAY 1025662 を単回静脈内ボーラス投与したときの排泄データは、PEG の代謝及び排泄を報告した文献 [1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10]、並びに非標識の BAY 1025662 を投与したときの尿中排泄のデータ（2.6.4.8.1.4）と良く一致していた。

ラットに[prop-^{14}C]BAY 1025662 を投与したとき、検討したすべての臓器・組織中の放射能は、緩徐にかつ持続的に減少した（4.2.2.7.11 PH-39637）。血液及び血漿中放射能の消失半減期は、共に約 24 日（血液：投与後 14～168 日の間隔で算出、血漿：投与後 84～168 日の間隔で算出）であった。また、臓器・組織中放射能の消失半減期は、肝臓で 33 日（投与後 14～168 日の間隔で算出）、皮膚で 31 日（投与後 56～168 日の間隔で算出）、屍体で 39 日（投与後 14～168 日の間隔で算出）、精巣で 54 日（投与後 14～168 日の間隔で算出）及び腎臓で 68 日（投与後 14～168 日の間隔で算出）であった（表 2.6.4.8-14）。これらの結果は、臓器・組織中において高分子 PEG の消失半減期が長いことを示した報告 [1, 3, 10] と一致していた。

ラットに[prop-^{14}C]BAY 1025662 を投与したときの放射能の臓器・組織分布を全身オートラジオグラフィーにより検討した（4.2.2.7.12 PH-39641）。投与後 168 日では、ラット体内（消化管を除くすべての臓器・組織）に残存していた放射能は投与量の 4.16%で、排泄（マスバランス）試験の結果（投与後 168 日で約 6%残存、4.2.2.7.11 PH-39637、表 2.6.4.8-12）と良く一致していた。放射能は主に褐色脂肪組織（投与量の 0.91%）、皮膚（0.75%）、精巣（0.73%）、肝臓（0.46%）、腎臓（0.36%）及び脾臓（0.28%）に残存しており、投与後 168 日の時点では消失は不完全であることが示唆された。血液、脳及び骨格筋における放射能は検出下限未満であった。

以上をまとめると、ラットに[prop-^{14}C]BAY 1025662 を投与したときの放射能の消失半減期及び分布に関するプロファイルは、同程度の分子サイズの PEG のプロファイル [9, 10, 11] と一致していた。

2.4.4 毒性試験

現行の試験ガイドライン及び規制要件に従い、BAY 94-9027 の毒性プロファイル及びトキシコキネティクスプロファイルを明らかにし、臨床試験実施及び承認取得のため、非臨床安全性試験を実施した。BAY 94-9027 及び BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）の毒性試験の概要を表 2.4.4- 1 に示す（2.6.6 及び 2.6.7）。主要な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。

BAY 94-9027 の主要な毒性試験としては単回及び 2 週間反復静脈内投与試験並びに幼若ラット静脈内投与毒性試験を実施した。長期投与における安全性リスクはないと考えられるものの、[redacted] との議論に基づいて、免疫不全 Rowett nude 雄ラットにおける BAY 94-9027 の 6 ヵ月間投与毒性試験（26 週間回復を含む）を [redacted] 年 [redacted] 月に開始した。

BAY 94-9027 の PEG 部分である BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）を用いた毒性試験としては、単回投与試験、4 週間反復投与試験、幼若ラットにおける試験及び標準的組合せの遺伝毒性試験を実施した。

表 2.4.4- 1 BAY 94-9027（PEGylated rFⅧ）及び BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）の毒性試験概要

Type of study/study duration	Study title	Species, gender, and strain	Method of admin.	Doses [IU/kg]	Location in CTD/ Reports	GLP
Toxicology studies with BAY 94-9027						
Single-dose with 2-week recovery	BAY 94-9027, BAY 14-2222: Comparative systemic toxicity study in male rats with single intravenous administration followed by an observation period up to 2 weeks.	Rat, male, Sprague Dawley	IV bolus	BAY 94-9027: 800, 4000; BAY 14-2222: 4000	4.2.3.1.1 / A47966	Yes
	Single-dose intravenous toxicity study in male New Zealand White rabbits(Single intravenous Administration Followed by a 2-Weeks Recovery Period).	Rabbit, male, New Zealand White	IV bolus	BAY 94-9027: 400, 4000; BAY 14-2222: 4000	4.2.3.1.2 / PH-36203, PH-36203A	Yes
Repeated Dose 2-week dosing with 4-week recovery	BAY 94-9027,BAY 14-2222:Comparative toxicity study in male rats after intravenous administration every other day over 2 weeks followed by a recovery period of 4 weeks.	Rat, male, Sprague Dawley	IV bolus (every other day)	BAY 94-9027: 75, 750, 2250; BAY 14-2222: 2250	4.2.3.2.1 / A48103	Yes
	BAY 94-9027: Systemic toxicity study in female rats after intravenous administration every other day over 2 weeks followed by a 4 week post -treatment period	Rat, female, Sprague Dawley	IV bolus (every other day)	BAY 94-9027: 75, 750, 2250	4.2.3.2.2 / PH-39043	Yes
	BAY 94-9027 repeated-dose systemic toxicity study in male New Zealand White rabbits.	Rabbit, male, New Zealand White	IV bolus (every other day)	BAY 94-9027: 75, 750, 2250; BAY 14-2222: 2250	4.2.3.2.3 / PH-36207 PH-36207A	Yes

表 2.4.4- 1 BAY 94-9027（PEGylated rFⅧ）及び BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）の毒性試験概要（続き）

Type of study/study duration	Study title	Species, gender, and strain	Method of admin.	Doses [IU/kg]	Location in CTD/ Reports	GLP
Other Toxicology Studies:						
Juvenile study in rats	BAY 94-9027. Repeated dose toxicity study in neonatal Wistar rats after intravenous administration two times per week	Rat, male, Wistar	IV bolus (twice weekly)	BAY 94-9027: 200, 1000	4.2.3.5.4.1 /PH-37672	Yes
In vitro tissue cross-reactivity study (TCR)	Tissue cross-reactivity of BAY 94-9027 with selected human tissues *in vitro*.	Human tissue	in vitro	na	4.2.3.7.2.3 /R-9391	Yes
Comparative antigenicity in Hem A mice	Exploratory Assessment of the Antigenicity of BAY 94-9027 in Hemophilia A Mice following Five Weekly Intravenous Injections	Hemophilia A mice, male	IV bolus (weekly)	BAY 94-9027: 13, 52, 200 BAY 14-2222: 52, 200	4.2.3.7.2.1 /CB-2010-29	No
In vitro complement activation	Testing for complement activation in human serum in vitro	Human serum	in vitro	na	4.2.3.7.2.2 /PH-39028	No

Other Studies: Toxicity Studies with PEG 60-Maleimide-Cysteine (BAY 1025662)						
Type of study/study duration	**Study title**	**Species, gender, and strain**	**Method of admin.**	**Doses [mg/kg]**	**Location in CTD/ Reference**	**GLP**
Single-dose with 2-week recovery	BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) Systemic toxicity study in male rats with single intravenous administration followed by an observation period of 2 weeks.	Rat, male, Sprague Dawley	IV bolus	BAY 1025662 23, 70, 210 mg/kg	4.2.3.7.7.1 /A48160	Yes
	BAY 1025662 Systemic toxicity study in rabbits (M) after single intravenous administration followed by a 2 week observation period	Rabbit, male, New Zealand White	IV bolus	BAY 10256620, 2, 20 mg/kg	4.2.3.7.7.2 /PH-38065	Yes
4-week dosing with 4-week recovery	BAY 1025662(PEG Maleimide Cysteine): Systemic toxicity study in rats after intravenous administration every second day for 4-weeks followed by a recovery period of 4-weeks.	Rat, male, Sprague Dawley	IV bolus (every second day)	BAY 1025662 0.045, 0.7, 11.0 mg/kg	4.2.3.7.7.3 /A50211	Yes
	BAY 1025662: Systemic toxicity study in male rabbits after twice weekly intravenous administration over approximately 4 weeks followed by a 13 week recovery period.	Rabbit, male, New Zealand White	IV bolus twice weekly	BAY 1025662, 0.02, 0.2, 2.00 mg/kg	4.2.3.7.7.4 /PH-38066	Yes

表 2.4.4- 1 BAY 94-9027（PEGylated rFⅧ）及び BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）の毒性試験概要（続き）

Type of study/study duration	Study title	Species, gender, and strain	Method of admin.	Doses [IU/kg]	Location in CTD/ Reports	GLP
Genotoxicity: Ames Assay	Evaluation of BAY 1025662 in a bacterial reverse mutation study using *Salmonella typhimurium*	Salmonella strains	in vitro	BAY 1025662: 0.1; 0.25; 0.5; 1.0; 2.5, and 5.0 mg/plate	4.2.3.7.7.5 /A51161	Yes
Genotoxicity: Mouse Lymphoma Assay	Forward cell mutation assay with BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) at the thymidine kinase ($TK^{+/-}$)-locus in mouse lymphoma L5178Y cells.	Mouse lymphoma cells	in vitro	BAY 1025662: 0.15; 0.5; 1.5, and 5 mg/mL	4.2.3.7.7.6 /A50973	Yes
Genotoxicity: Micronucleus Assay in Rats	Samples taken from Study: BAY 1025662: Systemic toxicity study in rats after intravenous administration every second day for 4 weeks followed by a recovery period of 4 weeks.	Rat, male, Sprague Dawley	IV bolus (every second day)	BAY 1025662 0.045, 0.7, 11 mg/kg	4.2.3.7.7.3 /A50211	Yes
Juvenile study in rats	BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine). Repeated dose toxicity study in neonatal Wistar rats after intravenous administration two times per week for 30 days.	Rat, male, Wistar	IV bolus (twice weekly)	BAY 1025662 0.4, 2.0 mg/kg	4.2.3.7.7.7 /PH-37891	Yes

na = not applicable
BAY 14-2222 = Kogenate FS, full length unmodified FVIII

2.4.4.1 全身曝露量

曝露量をモニタリングするため、ラット及びウサギに 2 週間反復投与した BAY 94-9027 の主要な毒性試験（2.6.6 及び 2.6.7）においてトキシコキネティクス評価を行った。

トキシコキネティクス評価によって、すべての動物種において全身曝露量が最高臨床用量におけるヒトの曝露量よりもかなり高いことが示された。

2.4.4.2 単回投与毒性試験

ラット及びウサギにおいて病理組織学的検査を含む BAY 94-9027 の拡張型単回投与毒性試験を実施した。忍容性は良好であり、血栓形成や他の有害作用は認められなかった。NOAEL は両動物種で検討した最高用量の 4000IU/kg であり、最高臨床用量 60IU/kg の 67 倍であった。

2.4.4.3 反復投与毒性試験

ラット及びウサギにおいて、BAY 94-9027 を 1 日おきにボーラス静脈内投与する 2 週間反復投与毒性試験を実施した。BAY 94-9027 の忍容性は良好であり、実施したいずれの試験においても、投与に関連する死亡又は一般症状に対する影響は認められなかった。検討した最高用量まで、凝固系に対する影響、臓器特異的毒性又はその他の毒性所見は認められなかった。高用量の PEG により生じることがある組織の細胞質空胞化[8, 12]は BAY 94-9027 の試験では認められなかった。

まとめると、げっ歯類及び非げっ歯類毒性試験における NOAEL は最高用量の 2250IU/kg（1 日おき投与）であり、これは最高臨床用量 60IU/kg の 37 倍に相当する。

2.4.4.4 遺伝毒性

ICH S6（R1)によると遺伝毒性試験は一般的にたん白質では必要ではないため、本分子のたん白質部分の遺伝毒性試験は実施しなかった。しかし BAY 1025662 を用いた標準的組合せの *in vivo* 及び *in vitro* 遺伝毒性試験を実施した。いずれの試験においても、BAY 1025662 に遺伝毒性は認められなかった。

2.4.4.5 がん原性

FⅧ自体はヒトの内因性たん白質であるため、がん原性試験は実施の必要はないと考えられる〔ICH S6（R1)〕。BAY 94-9027 に細胞増殖作用や免疫調節作用は認められていない。また PEG[12, 13, 14] 及びヒトの内因性たん白質である FⅧに遺伝毒性はなく、何年もの間患者に使用されており、今までに遺伝毒性又はがん原性の徴候を示していない。

2.4.4.6 生殖発生毒性試験

BAY 94-9027 の生殖発生毒性試験は実施していない。BAY 94-9027 を使用する患者集団は男性が圧倒的多数（＞99%）である。市販されている FⅧ製剤の臨床経験から、FⅧに発生、受胎能、及び生殖に対する影響はないことが示されている。雌雄ラット及び雄ウサギにおける BAY 94-9027 の反復投与毒性試験において、投与に関連する雄又は雌の内分泌系又は生殖器官に対する影響は認められなかった。この結果は、これまでに実施されたコージネイト FS 又はコバールトリイの毒性試験と一致している。したがって ICH S6（R1)に支持されるように、生殖発生毒性試験は実施しなかった。

2.4.4.7 局所刺激性

BAY 94-9027 は、現在市販されているコージネイト FS 及びコバールトリイと同様の製剤組成である。また、いずれの製剤も動物及びヒトにおいて良好な局所忍容性が示されている。BAY 94-9027 の局所刺激性は、上記の単回投与毒性試験及び反復投与毒性試験の一部として検討した。局所刺激性の評価は、試験期間を通しての臨床観察、剖検時の投与部位の評価及び病理組織学的検査により実施した。単回静脈内投与では 4000IU/kg まで、反復静脈内投与では 2250IU/kg まで、投与部位に投与に関連した影響は認められなかった。

2.4.4.8 その他の毒性試験

2.4.4.8.1 幼若動物における試験

成熟ラット又はウサギにおいて成長中の臓器に対する作用は認められなかったが、BAY 94-9027 について幼若動物を用いた試験を実施した。幼若ラットにおいて、最高用量 1000IU/kg までの週 2 回 2 週間投与で投与に関連する有害作用は認められなかった。

2.4.4.8.2 免疫原性及び組織交差反応性

血友病 A マウスに BAY 94-9027 を週 1 回 5 週間静脈内投与し、完全長 rFⅧ（BAY 14-2222）と比較する免疫原性試験において、薬物に対する結合抗体及び中和抗体の誘導を評価した。本試験の結果により、血友病 A マウスにおいて BAY 94-9027 により誘導される結合抗体及び中和抗体は、BAY 14-2222 と比較して少ないことが示された。

過敏症反応と有効性の欠如に関連して検討した探索的免疫原性試験は、2.4.2.1 及び 2.6.2.2.3 に要約する。

さらに *in vitro* 補体活性化試験において、20 人の健康な若い男性提供者（うち 4 人は抗 PEG 抗体を有していた）から得た血清を用いて、BAY 94-9027、BAY 1025662、及び PEG 分子が C3a 及び sC5b-9 を活性化するか検討した。臨床用量の BAY 94-9027 を超える濃度において検討した結果、BAY 94-9027 又は PEG はヒト血清において *in vitro* で補体活性化を誘発しなかった。

In vitro ヒト組織交差反応性試験（TCR）において、BAY 94-9027 の組織特異的結合性を評価し、非 PEG 化完全長 rFⅧと比較した。この *in vitro* TCR 試験において、非 PEG 化 rFⅧ（BAY 14-2222）と異なる BAY 94-9027 の特異的結合は認められなかった。したがって、FⅧの PEG 化によって組織結合に PEG 特異的変化は生じないと結論することができる。

2.4.4.8.3 その他の試験：PEG-60-マレイミド-システイン（BAY 1025662）の毒性試験

BAY 94-9027 の安全性評価を補足するため、独立して BAY 94-9027 の PEG 部分である BAY 1025662（PEG-60-マレイミド-システイン＝PEG-60-Mal-Cys）の安全性を、ラット及びウサギにおける単回投与毒性試験、4 週間投与毒性試験及び幼若ラット試験において評価した。

BAY 1025662 は、GLP 条件下で、BAY 94-9027 製造に用いる PEG-60-マレイミドをシステインと混合し、マレイミドの活性部分を抑制することにより製造した。

BAY 1025662 の単回及び反復投与の忍容性は、臨床用量の高倍用量まで良好であった。いずれの試験においても、投与に関連する死亡又は一般症状に対する影響は認められなかった。4 週間投与試験では、検討した最高用量〔ラット：最高 11mg/kg（最高臨床用量 60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 の 2750 倍）を 1 日おきに投与、ウサギ：最高 2mg/kg（60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 の 500 倍）を週 2 回投与〕まで、臓器特異的毒性又はその他の毒性所見は認められなかった。特に、ラット及びウサギに高用量の BAY 1025662 を単回又は 4 週間投与したときに、組織の細胞質空胞化が認められることはなかった。

BAY 1025662 の静脈内投与を生後 17 日に開始する幼若ラットにおける試験を実施した。幼若動物で検討した最高用量 2mg/kg（最高臨床用量 60IU/kg に含まれる PEG 量の 500 倍）の週 2 回 4 週間投与まで、BAY 1025662 投与による毒性は認められなかった。

BAY 1025662 を用いて標準的組合せの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験を実施した。遺伝毒性は認められなかった。

2.4.5 総括及び結論

BAY 94-9027 は、部位特異的に PEG 化された BDD-rFⅧであり、非修飾の FⅧと比較して消失半減期及び効力の持続時間が延長するようにデザインされている。PEG 化は、バイオ医薬品の全身循環血中の消失半減期を延長するために最も成功した修飾方法であることから [5, 12]、FⅧの修飾方法として PEG 化を選択した。過去約 20 年において 10 を超える PEG 化バイオ医薬品が静脈内投与薬又は皮下投与薬として承認され、この方法が安全かつ有効であることが示されてきた [3, 5, 6, 14, 15]。

BAY 94-9027 の有効性及び安全性を検討した非臨床試験から広範なデータが得られている。また、これらのデータは、その他の FⅧ製剤及び既承認の PEG 化バイオ医薬品に関する公表文献のデータによって補完される（2.6.6.8.6）。

60kDa の PEG を含む BAY 94-9027 は、異なる PEG 分子量及び異なる PEG 化部位をもった複数の候補化合物の中から選択され、*in vitro* の活性、並びに血友病 A のマウス及びイヌモデルで示されたように、*in vivo* 凝固活性を損なうことなく、消失半減期が延長した FⅧ分子である [7]。BAY 94-9027 は、生命維持に重要な器官系に対する安全性薬理評価においても、有害な影響を及ぼさなかった。

探索的免疫原性試験の結果、マウスにおいて BAY 94-9027 に含まれる PEG 部分に対する一過性の IgM 反応が認められたが、IgG へのクラススイッチは生じないことが示された。更に、血友病 A マウスにおける機序検討試験の結果は、以前実施した比較免疫原性試験の結果（2.6.6.8.2）と同様であった。マウスにおける BAY 94-9027 に対する抗体反応性が BAY 14-2222 に比べ低いのは、マウス樹状細胞による PEG 化 FⅧ（BAY 94-9027）の取込みが少なく、結果として T 細胞の活性化が低いためと考えられた。ヒト樹状細胞及びインヒビター保有血友病 A 患者由来の FⅧ特異的 T 細胞を用いた *in vitro* 試験においても同様の結果が得られた。

ラット及びウサギに BAY 94-9027 を単回静脈内ボーラス投与したとき、検討した用量範囲において血漿中 FⅧ活性の薬物動態は線形であった。ラット及びウサギにおいて、血漿クリアランスは非常に低く、定常状態における分布容積は小さかった。血漿中 FⅧ活性の終末相における消失半減期は、ラットで約 8 時間、ウサギで約 12 時間で、市販されている非 PEG 化 FⅧ製剤（コージネイト、BAY 14-2222）を投与したときの血漿中 FⅧ活性の終末相における消失半減期と比較して、ラットで 1.7 倍、ウサギで 1.3 倍長かった。

PEG 分子は、繰り返しのポリエチレン単位の数が異なることにより分子量サイズが異なる。N9-GP 及び N8-GP で用いられている 40 kDa の PEG は、20kDa の側鎖を 2 つ持った分枝 PEG であり [1, 2, 9]、一方、BAY 94-9027 で用いられている 60 kDa の PEG は、30kDa の側鎖を 2 つ持った分枝 PEG である。20～40kDa の PEG の物理化学的性質及び安全性プロファイルは類似しており、60 kDaPEG にも外挿することが可能であると考えられる（PEG に関する詳細な考察は 2.6.4.9 及び 2.6.6.8.6 を参照）。

臨床用量の BAY 94-9027 に含まれる PEG 量は非常に少ない。最高臨床用量である 60IU/kg を週に 1 回投与したとき、PEG としての最大用量は 4μg/kg/週となる。BAY 94-9027 を 60IU/kg の用量で 50 年間週に 1 回投与したときの PEG の累積投与量（ヒトの推定生涯投与量）は約 11mg/kg となる。

BAY 94-9027 の PEG 部の生体内運命を評価するために、ラットにおける BAY 1025662（PEG-60-マレイミド-システイン）の排泄及び分布を検討した。ラットに ^{14}C 標識した BAY 1025662（[prop-^{14}C]BAY 1025662）をヒトの推定生涯投与量である 11mg/kg の用量で投与したとき、放射能はほぼ完全に消失し、試験終了時点の投与後 168 日まで（尿は投与後 231 日まで）の放射能の総回収率（累積排泄量＋体内の残存量）は 89%であった。ラットに[prop-^{14}C]BAY 1025662 を投与したときの放射能の消失半減期は長く、同程度の分子サイズの PEG の分布プロファイル [9, 10] と一致していた。

ラットに BAY 1025662（非標識体）を投与したとき、血漿クリアランスは非常に低く、分布容積は非常に小さかった。血漿中 BAY 1025662 の消失は双指数関数的に起こり、終末相における消失半減期は 5 日（投与後 6～14 日の間隔で算出）で、高分子 PEG に関する報告 [4] と良く一致していた。

投与後 24 時間までに、投与量の 5.2%の BAY 1025662 が尿中に排泄された。その後も持続的に尿中に排泄され、投与後 7 日までに投与量の約 14%の BAY 1025662 が排泄された（4.2.2.7.9 PH-38878）。血漿中濃度の経時推移と同様に、BAY 1025662 の累積尿中排泄率の経時推移は双指数関数的であった。BAY 1025662 は、投与後 7～14 日にかけて、血漿中の消失半減期と同程度の半減期（約 6 日）で尿中に排泄されたことから、尿中排泄が循環血中からの消失と密接に関係していることが示唆された。このことは、高分子 PEG に関する報告 [4] と良く一致する。ラット及びウサギに BAY 1025662 を反復投与したとき、BAY 1025662 の血漿中曝露に中等度から顕著な蓄積がみられ、AUC 及び C_{max} が 2.5～5.6 倍に増加した。これらの蓄積は、血漿中 BAY 1025662 の消失半減期と投与間隔で説明できる。

PEG 化たん白質（及び PEG 化たん白質から放出される 30kDa 超の PEG）は、腎排泄されるのが遅く、組織及び細胞中に取り込まれた PEG 化たん白質のうち、たん白質部分はリソソーム酵素によって効率良く分解されるが、PEG 部は分解されず、蓄積する可能性が非常に高い [3]。PEG 化 FⅧに関する報告によると、ラットの臓器・組織中における 40kDa PEG の消失半減期は、用量の増加に伴い延長した。一方、治療用量はラットで検討した用量よりもかなり低いことから、治療用量を投与したときの消失半減期はかなり短いと考えられる [9]。

ラットにヒト生涯投与量の PEG を投与したとき（[prop-^{14}C]BAY 1025662 を 11mg/kg 投与したとき）の臓器・組織分布データに基づいて、ヒトに BAY 94-9027 を治療用量で（PEG-60 として 4 μg/kg）週 1 回投与したときの血漿中 PEG-60 濃度の経時推移をアロメトリックスケーリングを用いてシミュレーションした（2.6.4.9）。このシミュレーション結果を、臨床試験で測定した血漿中の PEG 濃度の結果と比較した。臨床試験で認められた血漿中の PEG 濃度はアロメトリックスケーリングによる推定値よりも低かった。臨床試験では、172 名の被験者のうち、わずか 3 名において、定量下限（LLOQ：0.1mg/L）付近の PEG 濃度が 1 時点で検出されたのみであった。また、その後、3 名の被験者の血漿中から PEG は認められなかった（2.7.4.2.1.6）。

また、投与後 6 ヵ月の試験終了時点において、ラット体内における放射能の不可逆的な結合及び保持を示唆する兆候はみられなかった。投与後 6 ヵ月において、ラット体内に残存していた放射能は少なく（投与量の 4～6%）、いくつかの臓器・組織において残存がみられた。脳において放射能はほとんど認められず、放射能の血液-脳関門通過性は非常に低いことが示唆された。以上のことから、60kDa PEG のような高分子の PEG を排泄する機構が生体内に存在することが示された。

高分子 PEG（PEG-40 及び PEG-60 を含む）には 2 つのクリアランス経路があると考えられ、まず投与後 1～2 週間において速やかな排泄が起こり、続いてピノサイトーシスによって非特異的に細胞内に取り込まれ、この過程においては長い消失半減期を示す [7, 8]。

BAY 1025662 を用いた PEG-60 の臓器・組織分布試験及び PEG-40 に関する報告[8)]から考察されるように、細胞内に取り込まれた PEG は、おそらくエキソサイトーシスによって血漿中に戻され、さらなる排泄を受けると考えられる。また、PEG の分子量サイズの増加に伴い、PEG の総クリアランスは低下し、消失半減期は延長する[7)]。ラットにおける Nonacog beta pegol (N9-GP)の PEG-40 部の分布及び排泄を検討した試験において、PEG-40 は生体内に広く分布し、排泄されることが示されている。

ラット組織の終末相における消失半減期を用いてモデル解析した結果、ヒトのすべての組織における PEG-40 部の濃度は、投与を開始して 1～2 年以内に定常状態に達すると考えられた[8, 9)]。一方、ヒトに BAY 94-9027 を投与したとき、血漿中の PEG-60 濃度は投与開始から約 1 年後に、組織中の PEG-60 濃度は投与開始から 4 年以内に定常状態に達すると考えられる（4.2.2.7.13 PH-39907）。しかし、N9-GP を 40IU/kg の用量（治療用量）で投与したときの PEG-40 としての用量は 230μg/kg であるのに対し、BAY 94-9027 を 60IU/kg（治療用量）で週 1 回又は 2 回投与したときの PEG-60 としての用量は 4 又は 8μg/kg/週であり、N9-GP の治療における PEG の用量の方が BAY 94-9027 よりもはるかに多い。

BAY 94-9027 から放出された PEG 部は、トランスポーターを介した薬物相互作用の被相互作用薬及び相互作用薬とならないと考えられる（詳細な考察は 2.6.4.9 を参照）。

ラット及びウサギにおける単回及び反復投与毒性試験において、検討した最高用量まで BAY 94-9027 の忍容性は良好であった。BAY 94-9027 は、単回投与試験では最高用量 4000IU/kg まで、また反復投与試験では 2250IU/kg まで、血栓形成を誘発しなかった。臓器特異的な毒性又はその他の毒性は認められなかった。幼若ラットでは、検討した最高用量まで BAY 94-9027 の投与に関連する所見は認められなかった。これらの試験では、脳及び腎臓重量、一般症状及び尿検査パラメータに影響はみられず、病理組織学的検査において組織の細胞質空胞化は認められなかった。

BAY 94-9027 の試験に加え、PEG-60-Mal-Cys 部分である BAY 1025662 についても、ラット及びウサギにおける単回及び 4 週間静脈内投与毒性試験並びに幼若ラットおける 4 週間静脈内投与毒性試験において評価を行った。最高臨床用量 60IU/kg に含まれる PEG 量に比べて高用量（4 週間の投与量での比較において、ラットで 4800 倍、ウサギで 500 倍）まで、臓器特異的な毒性又はその他の毒性は認められなかった。BAY 94-9027 の試験と同様に、脳及び腎臓重量、一般症状及び尿検査パラメータに影響はみられず、特に、病理組織学的検査でいずれの組織においても細胞質空胞化は認められなかった。BAY 1025662 は標準的組合せの *in vivo* 及び *in vitro* 遺伝毒性試験において遺伝毒性の徴候は認められなかった。

全体として、5～60kDa の様々なサイズの PEG 分子を持った PEG 化バイオ医薬品について、非常に良好な安全性プロファイルが示されている[12)]。PEG の分子サイズは直鎖長におけるサブユニットの増加によって異なってくるので、PEG 分子は構造的にサブユニット数のみが異なっている。PEG 分子は不活性で、水溶性が高く、組織に特異的受容体又はその他の標的たん白質は存在しない。バイオ医薬品で報告されている高用量の PEG に起因する唯一の特異的作用は、細胞質空胞化であり、組織学的に主に貪食細胞で認められるが、他の組織でも認められている。様々なサイズの PEG 分子に関して現在までに得られている知見から、細胞質空胞化は、組織変性、壊死、細胞変化、さらには、血液検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量などへの影響を伴っていなければ、その空胞化は、有害作用ではないと結論される。BAY 94-9027 投与においても、また、BAY 1025662 の高用量（ラット：臨床 PEG 量の 4800 倍に相当）を 4 週間投与しても、いずれも細胞質空胞化は認められなかった（2.6.6.8.6）。

60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる PEG 量は非常に少なく、約 4μg/kg である。定期補充療法での最高用量を 60IU/kg の週 1 回又は 2 回投与と仮定すると、1 ヵ月あたりの BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 の量は、PEG 化バイオ医薬品の小児使用に関連して欧州医薬品庁ヒト用医薬品委員会（CHMP）で論じられた値 0.4μmol/kg/月よりも 750～1500 倍低い[8]。PEG の排泄をいっさい考慮しない場合でも、CHMP の基準値 0.4μmol/kg/月に達するには、BAY 94-9027 60IU/kg の週 2 回投与において 60 年必要となる。

BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 量（60IU/kg において約 4μg/kg）は、他の PEG 化バイオ医薬品と比べて少量である（2.6.6.9、図 2.6.6.9.1）。例えば、Nonacog Beta Pegol（PEG 化 FIX）では 40IU/kg 中に PEG は 230μg/kg 含まれている。

結論

以上より、マウス、ラット、ウサギ又はイヌを用いた BAY 94-9027 の薬理及び薬物動態評価において、BAY 94-9027 は、完全長の rFVIII と同様の活性を示し、長い半減期を有することが示された。

これまでの報告[3]と同様に、ラットに ^{14}C 標識した PEG-60（BAY 1025662）を単回投与した排泄及び分布試験で、60kDa の PEG が腎排泄されることが示された。投与後初期における排泄速度は速く、その後より緩徐な消失相がみられ、おそらく組織中 PEG の再分布を反映していると考えられる。ラットを用いた試験において、放射能の不可逆的な結合及び保持を示唆する兆候はみられなかった。脳において放射能はほとんど認められず、放射能の血液-脳関門通過性は非常に低いことが示唆された。

非臨床安全性評価に適切と考えられるラット及びウサギにおける単回及び反復投与毒性試験において、BAY 94-9027 又は BAY 1025662 投与による毒性は認められなかった。PEG 投与と関連する細胞質空胞化やその他の影響は認められなかった。BAY 94-9027 は良好な非臨床安全性プロファイルを示した。したがって、BAY 94-9027 の非臨床安全性データは、確立されている FVIII の臨床使用に加えて、BAY 94-9027 がヒトで安全に使用できることを支持している。

引用文献一覧

1) Rasmussen CE et al, Toxicol Pathol 2016:44:726-737 (4.3.21)

2) Rasmussen CE et al, J Toxicol 2017:ID8496246 (4.3.30)

3) Baumann A et al., Drug Discov Today 2014:19:1623-1631 (4.3.13)

4) Yamaoka T et al., J Pharm Sci 1994:83:601-606 (4.3.16)

5) Webster R et al., Drug Metab Dispos 2007:35:9-16 (4.3.1)

6) Stidl R et al., Haemophilia 2016:22:54-64 (4.3.20)

7) Mei B et al., Blood 2010:116:270-279 (4.3.45)

8) CHMP Safety Working Party of the European Medicinal Agency. (2012). CHMP Safety Working Party's response to the Paediatric Committee regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population November 16, 2012. (4.3.34)

9) Bjørnsdottir I et al., Eur J Pharm Sci 2016:87:58-68 (4.3.14)

10) Longley CB et al., J Pharm Sci 2013:102:2362-2370 (4.3.15)

11) Hong VP et al., ASH 57th Annual Meeting & Exposition 2015:Poster 3517(4.3.46)

12) Ivens IA et al., Toxicol Pathol 2015:43:959-983 (4.3.35)

13) Liebert MA, J Am Coll Toxicol 1993:12:429-457 (4.3.31)

14) Ivens IA et al., Haemophilia 2013:19:11-20 (4.3.36)

15) Turecek PL et al., J Pharm Sci 2016:105:460-475 (4.3.37)