2.6.6　毒性試験の概要文の目次

2.6.6　毒性試験の概要文の目次 1
2.6.6.1　まとめ 3
2.6.6.2　単回投与毒性試験 9
2.6.6.2.1　雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験 9
2.6.6.2.2　雄 New Zealand White ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験 10
2.6.6.3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 11
2.6.6.3.1　雄ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験 11
2.6.6.3.2　雌ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験 12
2.6.6.3.3　雄 New Zealand White ウサギにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験 14
2.6.6.4　遺伝毒性試験 16
2.6.6.5　がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 16
2.6.6.6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 17
2.6.6.7　局所刺激性試験 17
2.6.6.8　その他の毒性試験 17
2.6.6.8.1　幼若ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験 17
2.6.6.8.2　血友病 A マウスにおける BAY 94-9027 の免疫原性 18
2.6.6.8.3　ヒト血清における *in vitro* 補体活性化 20
2.6.6.8.4　*In vitro* 組織交差反応性 20
2.6.6.8.5　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 21
2.6.6.8.5.1　BAY 1025662：雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験 21
2.6.6.8.5.2　BAY 1025662：雄ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験 22
2.6.6.8.5.3　BAY 1025662：雄ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験 23
2.6.6.8.5.4　BAY 1025662：雄ウサギにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験 24
2.6.6.8.5.5　BAY 1025662 の遺伝毒性試験 26
2.6.6.8.5.5.1　BAY 1025662：ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験） 26
2.6.6.8.5.5.2　BAY 1025662：マウスリンフォーマ TK 試験 26

2.6.6.8.5.5.3　BAY 1025662：*In vivo* 末梢血小核試験..... 26
2.6.6.8.5.6　BAY 1025662：幼若ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験..... 27
2.6.6.8.6　ポリエチレングリコールの安全性に関する調査..... 28
2.6.6.8.6.1　PEG 化バイオ医薬品による細胞質空胞化..... 29
2.6.6.9　考察及び結論..... 32
2.6.6.10　図表..... 36
引用文献一覧..... 37

2.6.6　毒性試験の概要文

2.6.6.1　まとめ

BAY 94-9027 はポリエチレングリコール（PEG）化した B ドメイン欠失遺伝子組換え型血液凝固第Ⅷ因子（BDD-rFⅧ）であり、置換されたシステイン残基にマレイミドリンカーを介して 60kDa の分枝 PEG（2×30kDa）1 分子が共有結合している。BAY 94-9027 自体は不活性であり、完全長ヒト rFⅧと同様、FⅧa へと活性化すると内因系凝固カスケードにおいて補助因子として凝固に貢献するが、PEG によって循環血液中の半減期が延長されている。BAY 94-9027 製剤には、市販されている完全長 rFⅧであるコージネイト FS 及びコバールトリイと同じ添加剤が含まれている。

現行の試験ガイドライン及び規制当局の要請に従い、BAY 94-9027 の *in vivo* 又は *in vitro* 毒性及びトキシコキネティクスプロファイルを検討するため、包括的な非臨床試験を実施した。この試験プログラムについては、複数の規制当局と相談を行った。BAY 94-9027 の毒性試験は、マウス、ラット、ウサギ、イヌで行われたコージネイト及びコバールトリイの毒性試験でこれまで得られている非臨床経験をさらに充実させるものである。BAY 94-9027 の毒性試験の概要を表 2.6.6.1- 1 に示し、続いて簡単な結論を記載する。PEG の安全性に関する調査結果を 2.6.6.8.6 にまとめ、全体の考察及び結論は 2.6.6.9 に示されている。また、[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（26 週間回復を含む）を [redacted] 年 [redacted] 月に開始した。

ヒトにおける使用に従い、動物試験の投与経路には静脈内投与を選択した。

ラット及びウサギを毒性評価の動物種として選択した。ラットは毒性評価で最も多く使用されているげっ歯類であり、ウサギはコージネイト FS 及びコバールトリイの毒性評価において非げっ歯類として使用されてきた。血友病 A 患者集団の大部分は男性であるため、ほとんどの毒性試験では雄動物のみを使用した。例外は雌ラットにおける BAY 94-9027 の 2 週間反復静脈内投与毒性試験であり、日本の当局の要請（[redacted] 年 [redacted] 月）により実施し、雄ラットでの試験方法とほぼ一致させた。主要な非臨床試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）下で、GLP 又は GMP 規格の凍結乾燥製剤（臨床試験で使用した製剤と同等のもの）を用いて実施した（使用ロットについては表 2.6.7.4 参照）。

雄ラット及び雄ウサギにおいて最高用量 4000IU/kg の単回静脈内投与後 2 週間の回復期間を設ける毒性試験を実施し、高用量の BAY 94-9027 の作用を評価した。これらの試験では、完全な凝固系を有する動物において、特に高用量による血栓形成の可能性に関して検討した。雌雄ラット及び雄ウサギにおいて BAY 94-9027（用量：0、75、750、2250IU/kg）を 1 日おきに静脈内投与（7 回投与）する 2 週間反復投与毒性試験を実施した。これらの試験では、回復群を設け、抗薬物抗体分析及びトキシコキネティクス評価を行った。また、高用量 2250IU/kg の BAY 14-2222（コージネイト FS）を含めた（雌ラット試験を除く）。動物では短期間でヒト FⅧに対する中和抗体が産生され、長期間の投与によって FⅧたん白質の活性が消失し、それ以降は作用がなくなることが知られていることから、各国規制当局と相談の上、投与期間は 2 週間に設定した。

局所刺激性は、BAY 94-9027 の単回及び反復投与毒性試験において、臨床観察及び投与部位の肉眼的並びに病理組織学的評価により検討した。

FⅧの毒性試験の投与期間はすべての動物種（マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びサル）で中和抗体の産生のために制限される。したがって、BAY 94-9027 の試験では抗薬物抗体による二次的毒性の発現を避けるために投与期間は 2 週間に設定した。BAY 94-9027 の PEG-60 部分（PEG-60-マレイミド-システイン＝PEG-60-Mal-Cys＝BAY 1025662）についての評価も実施し、BAY

1025662 の生体内分布と薬物動態特性は BAY 94-9027 とは異なっている可能性があるが、BAY 1025662 を用いた 4 週間投与試験において、PEG-60 に関連する細胞質空胞化の可能性を評価した。臨床使用時の BAY 94-9027 中 PEG-60 量に比べて高用量の PEG-60（1ヵ月間投与量の比較：ヒト BAY 94-9027 60IU/kg 週 2 回投与における PEG-60 投与量に対して、ラットで約 4800 倍、ウサギで約 500 倍）を投与することにより、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、かなり高用量の PEG-60 用量を選択した。N8-GP[1)]及び N9-GP[2)]の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、26 週間以上の長期投与試験で PEG 関連毒性は発現しない。したがって、BAY 1025662 では長期の試験ではなく、高用量を用いた試験を実施し、BAY 1025662 の安全性は、ラット及びウサギを用いた単回及び 4 週間反復投与毒性試験並びに幼若ラット試験において評価した。

BAY 94-9027 に含まれる PEG-60（最高臨床用量 60IU/kg あたり約 4μg/kg）に関連して、PEG の安全性及び公表文献から得られた情報について 2.6.6.8.6 で考察する。

BAY 94-9027 を投与する患者集団の大部分が男性であるため、各国規制当局と合意の上で生殖発生毒性試験は実施しなかった。さらに市販されている rFⅧ製剤の臨床経験において、rFⅧによる生殖への影響はないことが示されている。反復投与毒性試験において雄生殖器の病理組織学的検査を行った。また、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]（[redacted] 年 [redacted] 月）に従い、BAY 94-9027 及び BAY 1025662 の幼若ラット試験を実施した。

遺伝毒性試験及びがん原性試験は、ICH S6 R1 ガイドラインに従い、BAY 94-9027 では実施しなかった。BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）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 及びコージネイト FS（BAY 14-2222）の比較免疫原性試験を実施し、抗 FⅧ抗体の評価を行った。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 補体活性化試験において、20 人の健康な若い男性提供者（4 人は抗 PEG 抗体を有していた）の血清を用い、BAY 94-9027 及び PEG が C3a 及び sC5b-9 を活性化する可能性について検討した。臨床で認められた過敏症及び有効性の欠如に関する機序検討を補足するために、マウスにおける PEG に関連した IgM 誘発及び T 細胞依存性について検討した探索的免疫原性試験の概要については、2.6.2.2.3 を参照のこと。

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、完全長 rFⅧと比較した。

血友病 A マウスにおける比較免疫原性試験、及び *in vitro* 補体活性化試験を除くすべての毒性試験は、GLP に準拠して実施した。

BAY 94-9027 及び BAY 1025662 を用いて実施した毒性試験の概要を以下の表 2.6.6.1- 1 に示す。

表 2.6.6.1- 1 毒性試験の概要

Type of study/study duration	Study title	Species, gender, and strain	Method of admin.	Doses [IU/kg]	Location in CTD / Reference	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 of 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 systemic 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 14-2222Comparative 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
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
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

表 2.6.6.1- 1 毒性試験の概要(続き)

Type of study/study duration	Study title	Species, gender, and strain	Method of admin.	Doses [IU/kg]	Reference	GLP
Other Toxicology Studies:						
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
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

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]	Reference	GLP
Single-dose with 2-week recovery	BAY 1025662 (PEG-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
	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 1025662 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, 0.02, 0.2, 2.00 mg/kg	4.2.3.7.7.4 / PH-38066	Yes
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 Maleimide-Cysteine) at the thymidine kinase locus (TK+/−) 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

na=not applicable

表 2.6.6.1- 1 毒性試験の概要(続き)

Other Toxicology Studies:

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]	Reference	GLP
Genotoxicity: Micronucleus Assay in Rats	Samples taken from Study: 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 mg/kg	4.2.3.7.7.3 / A50211	Yes
Juvenile study in rats	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

非臨床安全性プロファイルは以下のように要約できる。

- BAY 94-9027 又は BAY 1025662 を単回又は反復静脈内投与したとき、検討した最高用量まで、死亡は生じなかった。
- 雄ラット又は雄ウサギに BAY 94-9027 を投与したとき、単回静脈内投与では最高臨床用量 60IU/kg の 67 倍まで、反復静脈内投与（雌ラットも含む）では最高臨床用量の 37 倍まで、忍容性は良好であった。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、また、いずれの組織においても病理組織学的検査で投与に関連した細胞質空胞化は認められなかった。
- 静脈内投与部位に局所刺激性は認められなかった。
- 幼若ラットに BAY 94-9027 又は BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys）を投与したとき、幼若動物に対する特異的な毒性は認められなかった。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、また、いずれの組織においても病理組織学的検査で投与に関連した細胞質空胞化は認められなかった。
- BAY 94-9027 の比較免疫原性試験の結果により、血友病 A マウスに週 1 回計 5 回静脈内投与したときに BAY 94-9027 が誘発する FⅧに対する結合抗体及び中和抗体は、BAY 14-2222（完全長 FⅧ）に比べて少なかった。
- 抗 PEG 抗体がヒト血清に存在するかどうかにかかわらず、臨床用量の BAY 94-9027 又は PEG-60-Mal-Cys の曝露において、BAY 94-9027 又は PEG は *in vitro* でヒト血清中で補体活性化を誘発しなかった。
- BAY 94-9027 の *in vitro* TCR 試験では、非 PEG 化 rFⅧと異なる特異的結合は認められなかった。

- 高用量 BAY 1025662 の単回又は反復静脈内投与により、雄ラット及び雄ウサギに毒性の徴候は誘発されなかった。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、また、いずれの組織においても病理組織学的検査で投与に関連した細胞質空胞化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結果、遺伝毒性リスクがないことが示された。

以上より、ラット及びウサギにおける単回及び反復投与毒性試験では、最高臨床用量 60IU/kg の 37 倍を超える BAY 94-9027 の用量でも成熟又は幼若動物に臓器特異的な毒性は認められなかった。また、血栓形成又はその他の過剰な薬理作用の徴候は認められなかった。BAY 1025662 で実施した標準的組合せの *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験において、遺伝毒性は認められなかった。

結論として、患者に BAY 94-9027 を投与したときリスクとなるような毒性所見は認められなかった。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

雄ラット及び雄ウサギにおいて拡張型単回静脈内投与毒性試験を実施し、BAY 94-9027 の単回投与の影響を検討した。投与後、1 日又は 14 日間観察した。ラットにおける BAY 94-9027 の拡張型単回投与毒性試験（臨床病理検査及び病理組織学的検査を含む）では、BAY 94-9027 の添加剤の 1 つとして使用されているグリシンに対するラットの感受性を考慮して最高用量を 4000IU/kg（臨床における最高用量 60IU/kg の 67 倍）に制限した。ウサギ試験の最高用量 4000IU/kg は、ウサギに倫理的に投与できるとされている投与容量 10mL/kg を基に設定した[3)]。

2.6.6.2.1 雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.1 A47966

雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、BAY 94-9027 を単回投与したときの BAY 94-9027 の毒性、特に血栓形成などの過剰な薬理作用を誘導する可能性を検討すること、さらに作用が発現した場合にその回復を観察することであった。雄 Sprague Dawley ラット（10 匹/群）に予定用量 800 及び 4000IU/kg の BAY 94-9027（それぞれ投与容量 2 及び 10mL/kg）を単回静脈内投与した。別の雄ラット 10 匹の群に、比較対照薬として予定用量 4000IU/kg（投与容量 10mL/kg）の BAY 14-2222（コージネイト FS）を投与した。さらに別の雄ラット 10 匹の群に、同様に BAY 94-9027 の添加剤（プラセボ群）を投与し、対照とした。Day 2 及び Day 15 に、各群雄 5 匹ずつ剖検を行った。試験の概要を表 2.6.6.2- 1 に示す。

表 2.6.6.2- 1 雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験の概要

Study Type	Acute	GLP: Yes
Study Ref.	Report no. A47966	
Batch No.	BAY 94-9027 Lot Number 949027T070209	
	BAY 14-2222, Lot Number 27N1XL1T	
Animals	Sprague Dawley rats, 5 + 5 (2 weeks recovery) males / dose group	
Dose	BAY 94-9027	0, 800, 4000 IU/kg once
	BAY 14-2222	4000 IU/kg once
Administration	Iv	
Vehicle	Excipient solution	
NOAEL	4000 IU/kg	

BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の作用は、臨床パラメータ（死亡、一般状態、摂餌量、摂水量、及び体重）、血液生化学的検査、血液学的検査、凝固パラメータ、尿検査、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査によって評価した。

BAY 94-9027（800、4000IU/kg）又は BAY 14-2222（4000IU/kg）投与により、投与に関連する影響又は死亡は認められなかった。BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の単回静脈内投与は、いずれも検討した高用量まで忍容性は良好であった。したがって、本試験における BAY 94-9027 の NOAEL は 4000IU/kg であった。

2.6.6.2.2　雄 New Zealand White ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.1.2 PH-36203, PH-36203A

雄 New Zealand White ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、BAY 94-9027 を単回投与したときの BAY 94-9027 の毒性、特に血栓形成などの過剰な薬理作用を誘導する可能性を検討すること、さらに作用が発現した場合にその回復を観察することであった。雄 New Zealand White ウサギ（6 匹/群）に、予定用量 0（添加剤対照）、400、4000IU/kg（投与容量 1 又は 10 mL/kg）の BAY 94-9027 を、Day 1 に単回静脈内投与した。比較対照薬として、予定用量 4000IU/kg（投与容量 10 mL/kg）の BAY 14-2222 を、雄 New Zealand White ウサギ 6 匹に、単回静脈内投与した。各群 6 匹中 3 匹を投与後 1 日に屠殺し、残り 3 匹は無投与で 14 日間観察した後に剖検した。最高用量 4000IU/kg は、ウサギに倫理的に投与できるとされている最大投与容量 10mL/kg に基づき選択した。試験の概要を表 2.6.6.2- 2 に示す。

表 2.6.6.2- 2　雄 New Zealand White ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験の概要

Study Type	Acute	GLP: Yes
Study Ref.	Report no. PH-36203 and PH-36203A	
Batch No.	BAY 94-9027 Lot Number 949027T070209	
	BAY 14-2222, Lot Number 27N1XL1T	
Animals	New Zealand White rabbits [Crl:KBL(NZW)BR], 3 + 3 (2 weeks recovery) males / dose group	
Dose	BAY 94-9027	0, 400, 4000 IU/kg once
	BAY 14-2222	4000 IU/kg once
Administration	IV	
Vehicle	Excipient solution	
NOAEL	4000 IU/kg	

動物は定期的に観察して体重を測定し、摂水量は残量の目測により評価した。また血液試料の臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固）を投与前、投与後（当日）及び投与後 14 日に実施した。臓器・組織は肉眼的検査及び病理組織学的検査を行い、臓器重量（肝臓、脳、副腎、胸腺、心臓、腎臓、精巣、精巣上体、脾臓、肺、気管）を測定した。

投与後、死亡は発生しなかった。連日の動物の一般状態観察、体重増加、摂水量には投与に関連する影響は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査では、BAY 94-9027（400 及び 4000IU/kg）の主群及び回復群、BAY 14-2222（4000IU/kg）の主群及び回復群において、投与に関連する所見は認められなかった。すべての FVⅢ投与群に活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のわずかな短縮がみられたが、これは内因性凝固カスケードにおける rFVⅢ分子の薬理作用であると考えられる。

曝露終了時及び回復期間終了時における肉眼検査及び臓器重量には、投与の影響は認められなかった。投与に関連する病理組織学的所見は認められなかった。

検討した条件下で雄 New Zealand White ウサギに BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 を単回静脈内投与したとき、4000IU/kg（NOAEL）まで、忍容性は良好で毒性所見は認められなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

2 週間投与後 4 週間の回復期間を設けた BAY 94-9027 の静脈内（低速ボーラス）投与毒性試験を実施した。動物では短期間でヒト FⅧに対する中和抗体が産生され、長期間の投与によって動物体内での FⅧたん白質の活性が消失し、作用がなくなることが知られており、投与期間はこの知見に基づいて 2 週間に設定した。血友病 A 患者集団は大部分（＞99%）が男性であることから、雄動物のみを使用した（雌ラットにおける 2 週間静脈内投与毒性試験を除く）。また、BAY 94-9027 の長期投与における安全性リスクはないものと考えるものの、[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。

2.6.6.3.1 雄ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.1 A48103

雄ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、雄 Sprague Dawley ラット（10 匹/群）に、予定用量 0（添加剤対照）、75、750、2250IU/kg を 1 日おきに 2 週間静脈内投与（7 回投与）したときの、BAY 94-9027 の全身毒性を評価することであった。対照群及び高用量群では別の 5 匹の動物について 4 週間の回復群を設けた。投与容量は、添加剤対照群では 5.6mL/kg、BAY 94-9027 投与群では低用量から高用量についてそれぞれ 0.19、1.9、5.6mL/kg であった。比較対照薬として、BAY 14-2222 の 2250IU/kg を雄 Sprague Dawley ラット 10 匹及び回復群 5 匹に 1 日おきに 2 週間静脈内投与（計 7 回）した。トキシコキネティクス評価のため各群 9 匹を追加した。試験の概要を表 2.6.6.3- 1 に示す。

表 2.6.6.3- 1 雄ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study Type	Subacute		GLP: Yes
Study Ref.	Report no. A48103		
Batch No.	BAY 94-9027 Lot Number 949027T070209		
	BAY 14-2222, Lot Number 27N1XL1T		
Animals	Sprague Dawley rats, 10 + 9 (toxicokinetics) males / dose group, + 5 males in high dose and control for 4 weeks recovery		
Dose	BAY 94-9027	75, 750, 2250 IU/kg	
	BAY 14-2222	2250 IU/kg	
Administration	IV		
Vehicle	Excipient solution		
NOAEL	2250 IU/kg		

BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の作用は臨床パラメータ（死亡、一般状態、摂餌量及び摂水量、体重、眼科学的検査）、神経系機能検査（安全性薬理評価項目、2.6.2.4.1）、血液学的検査、凝固パラメータ、血液生化学的検査、尿検査、腎機能検査（安全性薬理評価項目、2.6.2.4.2）、結合抗体、中和抗体、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査により評価した。トキシコキネティクス評価については、1 回投与後及び 7 回投与後のそれぞれ 0、0.25、1、4、8、24 時間の時点で採取した血漿試料において FⅧ活性を測定し、血漿中の FⅧ活性 - 時間曲線下面積（AUC）及び最高 FⅧ活性（C_{max}）を算出した。

本試験において死亡は生じなかった。連日の動物の一般状態観察により、75、750、2250IU/kg の BAY 94-9027 の主群及び回復群、2250IU/kg の BAY 14-2222 の主試験群及び回復群において、投与に関連する所見は認められなかった。体重、摂餌量、摂水量に影響は認められなかった。血

液学的検査及び血液生化学的検査パラメータに投与に関連した変化は認められなかった。投与に関連した肉眼的所見及び病理組織学的所見は認められなかった。

抗 PEG 抗体はいずれの用量群においても認められなかった。一方、BAY 94-9027 に対する結合抗体及び中和抗体の時間及び用量依存的な産生、並びに BAY 14-2222 に対する結合抗体及び中和抗体の時間依存的な産生が認められた。

BAY 94-9027 を投与したときの全身曝露量について、AUC（0-48）は用量に比例して増加した（表 2.6.6.3- 2）。C_{max} の増加は、用量比例性をわずかに下回った。BAY 14-2222 を投与したときの AUC（0-48h）は同用量の BAY 94-9027 を投与したときの約 20 分の 1 であった。Day 13 における BAY 14-2222 投与群の血漿中 FⅧ活性はすべて LLOQ 未満であったが、中和抗薬物抗体が原因である可能性が高い。BAY 94-9027 についても、低用量群及び高用量群で主に AUC に減少が認められた。これらの群では、BAY 94-9027 の投与終了時に、一部の動物で結合抗体及び中和抗体の存在が確認された。

表 2.6.6.3- 2　雄ラット 2 週間反復静脈内投与毒性試験における TK パラメータ

Analyte	Dose [IU/kg/d]	Date	C_{max} [IU/L]	$AUC_{(0-48)}$ [IU·h/L]	$AUC_{(0-48)norm}$ [kg·h/L]	$C(24)/C_{max}$ [%]	RA_{Cmax} [%]	RA_{AUC} [%]
A48103								
BAY 94-9027	75	Day 1	1641	14588*	195*	n.c.	n.a.	n.a.
BAY 94-9027	750	Day 1	14443	142213*	190*	10.7	n.a.	n.a.
BAY 94-9027	2250	Day 1	34640	441190*	196*	19.2	n.a.	n.a.
BAY 14-2222	2250	Day 1	11447	22433*	9.97*	0.495 **	n.a.	n.a.
BAY 94-9027	75	Day 13	851	n.c.	n.c.	n.c.	51.8	n.c.
BAY 94-9027	750	Day 13	19022	233062*	311*	20.4	132	164
BAY 94-9027	2250	Day 13	38417	320981*	143*	9.23	111	72.8
BAY 14-2222	2250	Day 13	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

* Obtained by extrapolation to 48 hours
n.a. = not available
n.c. = not calculated

雄 Sprague Dawley ラットに対する BAY 94-9027 及び対照薬 BAY 14-2222 の 1 日おき 2 週間の静脈内投与（計 7 回）は、高用量の 2250IU/kg まで、毒性所見は認められず、忍容性は良好であった。したがって、本試験における BAY 94-9027 の NOAEL は 2250IU/kg であった。

2.6.6.3.2　　雌ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.2 PH-39043

雄ラットにおける 2 週間反復静脈内毒性試験（2.6.6.3.1）に加え、雌 Sprague Dawley ラット（10 匹/群）に、予定用量 75、750、2250IU/kg（それぞれ投与容量 0.19、1.9、5.6mL/kg の BAY 94-9027）を、1 日おきに 2 週間静脈内投与（計 7 回）した。さらに雌ラット 10 匹の 1 群に対照として滅菌生理食塩液を同様に投与した。また、回復性を検討するため、対照群及び BAY 94-9027 高用量群に雌ラット 5 匹ずつを追加し、投与後 4 週間の回復期間を設けた。トキシコキネティクス評価のため各群 9 匹の動物を追加した。試験の概要を表 2.6.6.3- 3 に示す。

表 2.6.6.3- 3　雌ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study Type	Subacute	GLP: Yes
Study Ref.	Report no. PH-39043	
Batch No.	BAY 94-9027 Lot Number 270PW39	
Animals	Sprague Dawley rats, 10 + 9 (toxicokinetics) females / dose group, + 5 females in high dose and control for 4 weeks recovery	
Dose	BAY 94-9027	75, 750, 2250 IU/kg
Administration	IV	
Vehicle	Sterile physiological saline (0.9% NaCl)	
NOAEL	2250 IU/kg	

BAY 94-9027 の作用は臨床パラメータ（死亡、一般状態、摂餌量及び摂水量、体重、眼科学的検査）、血液学的検査及び凝固パラメータ、血液生化学的検査、尿検査、結合抗体及び中和抗体の検査により評価した。また、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査を実施した。トキシコキネティクス評価については、雄ラット試験と同様に、1 回投与後及び 7 回投与後のそれぞれ 0、0.25、1、4、8、24 時間の時点で採取した血漿試料において FⅧ活性を測定した。

検討したいずれの評価項目にも BAY 94-9027（75、750、2250IU/kg）投与に関連した影響は認められなかった。

Day 1 には、AUC は 75～750IU/kg では用量比を下回って、また、750～2250IU/kg では用量比を超えて増加した（表 2.6.6.3- 4）。C_{max} は、75、750、及び 2250IU/kg 投与後それぞれ 1 時間、0.25 時間、4 時間に認められ、6730、32800 及び 92100IU/L であった。投与後 24 時間には C_{max} の 20%（9～15%）未満に低下した。C_{max} 及び AUC は雌ラットで雄ラット（表 2.6.6.3- 2）よりも高かったが、これは群間の変動範囲内にあった（2.6.4.3.2.2）。

表 2.6.6.3- 4　雌ラット 2 週間反復静脈内投与毒性試験における TK パラメータ

Analyte	Dose [IU/kg/d]	Date	C_{max} [IU/L]	$AUC_{(0-24)}$ [IU·h/L]	$AUC_{(0-24)norm}$ [kg·h/L]	$C(24)/C_{max}$ [%]
PH-39043						
BAY 94-9027	75	Day 1	6730	35900	478	8.5
BAY 94-9027	750	Day 1	32800	226000	301	8.6
BAY 94-9027	2250	Day 1	92100	1020000	451	15.1
BAY 94-9027	75	Day 13	388	n.c.	n.c.	n.c.
BAY 94-9027	750	Day 13	18700	56000	74.7	n.c.
BAY 94-9027	2250	Day 13	17400	25200	11.2	n.c.

n.a. = not available
n.c. = not calculated

Day 2 には抗薬物抗体は検出されなかった。最初に抗体が検出されたのは Day 9 であった。結合抗体及び中和抗体の産生頻度及び産生量は、Day 9 では用量群間で同程度であったが、Day 15 では用量増加とともに上昇した。Day 15 には、中和抗体（nAb）を産生したラット数は用量増加とともに増加した。Day 13 における曝露量は個体間変動があり、Day 1 の曝露量より低かった。これは、中和抗体の産生が原因である可能性が高い。

雌ラットに対する BAY 94-9027 の 1 日おき 2 週間の投与（計 7 回）した結果、最高用量の 2250IU/kg まで毒性は認められず、忍容性は良好であった。すべての用量で BAY 94-9027 に対する結合抗体及び中和抗体が認められた。本試験における NOAEL（無毒性量）は 2250IU/kg であった。

2.6.6.3.3　雄 New Zealand White ウサギにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.2.3 PH-36207, PH-36207A

雄 New Zealand White ウサギにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、雄 New Zealand White ウサギ（6 匹/群）に、用量 0（添加剤対照）、及び予定用量 75、750、2250IU/kg を 1 日おきに 2 週間静脈内投与（計 7 回）したときの、BAY 94-9027 の全身毒性を評価することであった。また、対照群及び高用量群に 3 匹ずつを追加し、投与後 4 週間の回復期間を設けた。投与容量は、添加剤対照群では 5.6mL/kg、BAY 94-9027 投与群では低用量から高用量についてそれぞれ 0.19、1.9、5.6mL/kg であった。比較対照薬として、予定用量 2250IU/kg（投与容量 5.6mL/kg）の BAY 14-2222 を 1 日おきに 2 週間（計 7 回）、ウサギ 6 匹に静脈内投与した。試験の概要を表 2.6.6.3- 5 に示す。

表 2.6.6.3- 5　雄 New Zealand White ウサギにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study Type	Subacute		GLP: Yes
Study Ref.	Report no. PH-36207 and PH-36207A		
Batch No.	BAY 94-9027 Lot Number 949027T070209		
	BAY 14-2222, Lot Number 27N1XL1T		
Animals	New Zealand White rabbits [(Crl:KBL(NZW)BR], 6 + 3 (4 weeks recovery : control and high doses)) males / dose group		
Dose	BAY 94-9027	75, 750, 2250 IU/kg	
	BAY 14-2222	2250 IU/kg	
Administration	Iv		
Vehicle	Excipient solution		
NOAEL	2250 IU/kg		

動物は定期的に観察して体重を測定し、摂餌量及び摂水量（残量の目測により測定）を測定した。また血液試料の臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固）及び尿検査を初回投与前、最終投与の翌日、回復期間終了時に実施した。臓器・組織は肉眼的検査及び病理組織学的検査（高用量群及び対照群の全臓器・組織）を行い、臓器重量（肝臓、脳、副腎、胸腺、心臓、腎臓、精巣、精巣上体、脾臓、肺、気管）を測定した。さらにトキシコキネティクス評価、FⅧに対する結合抗体及び中和抗体の分析、抗 PEG 抗体（BAY 14-2222 投与群は除く）の分析のための血液試料を採取した。

本試験において死亡は生じなかった。連日の動物の一般状態観察により、BAY 14-2222 の 2250IU/kg 群の主試験群の 1 匹（No.26）を除き、投与に関連する所見は認められなかった。この動物では両後肢の腫脹と変色がみられた後、摂餌量及び便の量が減少し、投与終了時に摂水量が減少した。これは、内因性ウサギ FⅧと交差反応する阻害抗体に起因する活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）延長により引き起こされた可能性がある。体重、摂餌量及び摂水量には投与による有害な影響は認められなかった。BAY 94-9027 の 2250IU/kg 群及び BAY 14-2222 の 2250IU/kg 群の各主試験群で、投与期間中に体重増加の抑制がみられたが、これらの群の動物は、

他群の動物とは別にブリーダーから出荷されており、より高齢で、初期体重が高値（Day 1 での平均体重；対照群：3190.9g、BAY 94-9027 高用量群：3756.2g、BAY 14-2222 群：3829.8g）であったことによるものと考えられた。この 2 群の動物は平坦な成長曲線を示す、より後期の成長期にあった。

血液学的検査では活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）の統計学的に有意な、わずかな延長が、BAY 94-9027 の 750IU/kg 群（平均 25.4 秒）及び 2250IU/kg 群（平均 27.5 秒）の各主群、及び BAY 14-2222 の 2250IU/kg 群の主群（平均 24.5 秒）で認められた。また同所見は BAY 94-9027 の 2250IU/kg 群及び BAY 14-2222 の 2250IU/kg 群の各回復群においても最終投与後に認められ、回復期間終了時にも顕著ではないものの認められた。この aPTT 延長は、内因性ウサギ FⅧと交差する阻害抗体によって全体の凝固時間が延長した可能性が高い（後述の結合抗体及び中和抗体分析についての記述を参照）。他の血液学的検査値では、すべての用量で投与に関連した影響は認められなかった。血液生化学的検査及び尿検査でも、すべての用量で投与に関連した影響は認められなかった。

一部の臓器でみられた臓器重量の変化は、投与に関連した影響ではなかった。精巣及び脾臓の臓器重量は BAY 14-2222 の 2250IU/kg 群の主群においてのみ絶対重量及び相対重量が増加したものの、回復期間終了時にはこれらの変化は認められなかった。脾臓重量の増加は、後述する毒性ではない病理組織学的所見と関連している可能性がある。精巣重量の増加については、剖検時に対応する所見が認められておらず、明らかな病理組織学的所見もなかったことから、投与に関連した影響とは考えられない。これらの変化は毒性ではなく、生物学的変動を反映したものと考えられる。

肉眼病理所見では、投与に関連する所見は認められなかった。病理組織学的検査では、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 の 2250IU/kg 投与群で、肝細胞の細胞質濃縮が認められたが、BAY 94-9027 では回復期間終了時にこの変化は認められなかった。この所見はグリコーゲン含量の低下と対応しており、毒性ではないと考えられる。脾臓では、BAY 94-9027 の 750IU/kg 以上の群の投与終了時、及び BAY 14-2222 の 2250IU 群の投与終了時及び回復期間終了時において、白脾髄濾胞内の胚中心の量／サイズが増加したが、これはヒト rFⅧ分子に対する免疫反応によるものであり、毒性所見ではないと考えられる。

いずれの投与群においても、投与終了時又は回復終了時に投与部位（耳介静脈）における局所刺激性を示す所見は認められなかった。

トキシコキネティクス評価（表 2.6.6.3- 6）では、Day 1 の BAY 94-9027 投与群の AUC（0-48）は低用量群から中用量群まで用量に比例して増加し、中用量群から高用量群まで、用量比例性をわずかに上回って増加することが示された。Cmax ではほぼ用量に比例して増加した。Day 1 の BAY 14-2222 投与群の AUC（0-48）は、同じ用量の BAY 94-9027 を投与したときの約 4 分の 1 であった。Day 13 には、BAY 94-9027 の中用量群及び高用量群における血漿中 FⅧ活性はすべて LLOQ 未満であったが、これは中和抗体が原因である可能性が高い。低用量群では 0.25 時間にのみ一時的な曝露が認められた（Day 1 での対応する FⅧ活性の約 20%）。Day 1 において BAY 94-9027 投与群の AUC 及び 24 時間時点の血漿中 FⅧ活性が BAY 14-2222 投与群より高いが、これは BAY 94-9027 のより長い半減期によるものである。

表 2.6.6.3- 6 雄ウサギ 2 週間反復静脈内投与毒性試験における TK パラメータ

Analyte	Dose [IU/kg/d]	Date	C_{max} [IU/L]	$AUC_{(0-48)}$ [IU·h/L]	$AUC_{(0-48)norm}$ [kg·h/L]	$C(24)/C_{max}$ [%]	RA_{Cmax} [%]	RA_{AUC} [%]
Rabbit study PH-36207 and PH-36207A								
BAY 94-9027	75	Day 1	1304	20847[a]	278[a]	25.6	n.a.	n.a.
BAY 94-9027	750	Day 1	10743	202247	270	23.2	n.a.	n.a.
BAY 94-9027	2250	Day 1	43535	865496	385	33.1	n.a.	n.a.
BAY 14-2222	2250	Day 1	45786	216286[a]	96.1[a]	1.12	n.a.	n.a.
BAY 94-9027	75	Day 13	295	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
BAY 94-9027	750	Day 13	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
BAY 94-9027	2250	Day 13	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
BAY 14-2222	2250	Day 13	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.

[a] Obtained by extrapolation to 48 hours.
n.a. = not available
n.c. = not calculated

抗体分析では、抗 BAY 94-9027 抗体産生が低用量 75IU/kg から時間依存的及び用量依存的に認められた。中等度から高い抗体価を示した結合抗体は中和活性も示した。低用量群（75IU/kg）における結合抗体産生は Day 15 にのみ検出可能であったが、中用量群及び高用量群（750 及び 2250IU/kg）における結合抗体産生は Day 7 から始まった。抗体産生は、投与期間終了時（Day 15）又は回復期間早期（Day 29）にピークに達し、回復群では Day 42 まで持続した。BAY 14-2222 の 2250IU/kg 群における抗体産生は、Day 7 から始まり、時間依存的であった。中等度から高い抗体価を示した結合抗体は中和活性も示した。投与期間中、抗 BAY 14-2222 結合抗体の抗体価は抗 BAY 94-9027 結合抗体と比較して高い傾向にあった。BAY 94-9027 投与群において抗 PEG 抗体は認められなかった。

雄 New Zealand White ウサギに対する BAY 94-9027 の投与は、Day 1 の AUC（0-48）865496IU·h/mL 及び C_{max} 43535IU/mL に相当する 2250IU/kg まで、忍容性は良好で毒性所見は認められなかった。雄 New Zealand White ウサギに対する BAY 14-2222 の投与は、AUC（0-48）216286IU·h/mL 及び C_{max} 45786IU/mL に相当する 2250IU/kg において、忍容性は良好で毒性所見は認められなかった。本試験における BAY 94-9027 の NOAEL は 2250IU/kg であった。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

内因性凝固因子の類似化合物であるため、バイオテクノロジー応用医薬品についての ICH ガイドライン（ICH S6 R1）に従い、BAY 94-9027 の遺伝毒性試験は必要とされない。この分子の PEG-60-Mal-Cys 部分（BAY 1025662）を評価するために標準的組合せの遺伝毒性試験を実施した（2.6.6.8.5.5）。

2.6.6.5 がん原性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

FⅧは補充たん白質であるため、BAY 94-9027 のがん原性試験は必要ないと考えられる（ICH S6 R1）。また、反復投与毒性試験で示されたように、動物では BAY 94-9027 に対する中和抗体が産生されることから、活性体への曝露は約 2 週間に限られる。BAY 94-9027 の作用機序が凝固カスケードに限られるため、BAY 94-9027 は細胞増殖作用や免疫調節作用を示すとは考えられない。

PEG 分子に組織／細胞反応性はなく、単回及び反復投与毒性試験において BAY 94-9027 及び PEG-60-Mal-Cys（BAY 1025662）のいずれも、懸念が生じるような組織変化を示さなかった。BAY 1025662 は、標準的組み合わせの遺伝毒性試験において遺伝毒性を示さなかった（2.6.6.8.5.5 参照）。一般的に各種分子量の PEG 分子[4)]、及び FⅧ製剤は遺伝毒性がなく、長年患者で使用されてきており、これまでがん原性の徴候は認められていない。したがって、BAY 94-9027 のがん原性の可能性について懸念はない。

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

男性が BAY 94-9027 を使用する患者集団の圧倒的多数を占める。市販されている FⅧ製剤の臨床経験から、rFⅧに発生、受胎能、及び生殖に対する影響がないことが示されている。雄ラット及び雄ウサギにおける BAY 94-9027 の単回及び反復投与全身毒性試験において、投与に関連した雄生殖器に対する影響は認められなかった。したがって、生殖発生毒性試験は実施していない（ICH S6 R1）。

2.6.6.7　局所刺激性試験

BAY 94-9027 は、現在市販されている、良好な局所忍容性を示すコージネイト FS 及びコバールトリイと同等の製剤組成である。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。これらの試験における局所刺激性の評価は、試験期間を通しての臨床観察、及びその後の剖検時の投与部位の観察と病理組織学的検査により行った。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、良好な局所忍容性が認められた。

2.6.6.8　その他の毒性試験

2.6.6.8.1　幼若ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.5.4.1 PH-37672

幼若雄 Wistar ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、幼若動物における BAY 94-9027 の毒性を評価することであった。日齢の異なる動物群（2 群）に BAY 94-9027 を 0（添加剤対照）、予定用量 200、又は 1000IU/kg を投与容量 3mL/kg で週 2 回（計 5 回）、16 日間にわたって投与した。反復投与後の全身曝露を減少させる FⅧに対する中和抗体産生を避けるため、いずれの群も投与は 2 週間までとした。投与開始時に 17 日齢の雄ラット 22 匹及び 32 日齢の雄ラット 25 匹（離乳群）に、尾静脈からボーラス静脈内投与した。BAY 94-9027 の影響を、臨床エンドポイント（死亡、一般状態、体重、眼科学的検査）、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固）、免疫原性（中和抗体）、また、剖検予定日に生存していた動物 6 匹/群についての剖検、臓器重量及び臓器・組織の病理組織学的検査により評価した。試験の概要を表 2.6.6.8- 1 に示す。

表 2.6.6.8- 1　幼若ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study type	**Repeat-dose toxicity**	**GLP: Yes**
Study reference	Study report: PH-37672	
Batch number	BAY 94-9027 Lot number 27N38L0	
Animals	Wistar rats [HsdRccHan: Wis], age PND 17 (22 rats per group) or 32 (25 rats per group), each age-group dosed for 2 weeks	
Dose	BAY 94-9027: 200, 1000 IU/kg	
Administration	iv twice weekly	
Vehicle	Excipient solution	
NOAEL	1000 IU/kg	

第 1 群では生後 17 日（PND17）に投与を開始した。幼若ラットでは、この日齢が安定して反復静脈内投与できる最も若い日齢と考えられる。ラットの生後 17 日では、神経系、生殖系、骨格系、呼吸器系、腎臓系、心臓系、及び肝臓系がまだ発達段階にある[5)]。投与は成長する（成人早期）まで継続した。動物が低体重で血液量が少ないため、トキシコキネティクス（モリタリング）評価用の血液試料は、生後 24 日（3 回目の投与後）及び生後 31 日（5 回目の投与後）並びに離乳動物群で生後 46 日（5 回目の投与後）の投与後 1 時間（曝露対照）に採取し、血漿中 FⅧ活性を測定した。さらに詳細なトキシコキネティクス評価のため、生後 32 日の初回投与前、初回投与後 1、4、8、24 時間に採取した血漿試料の FⅧ活性を測定した。

ラット 3 匹（生後 31 日：1000IU/kg 投与群 1 匹、生後 46 日：200IU/kg 投与群 1 匹、1000IU/kg 投与群 1 匹）が剖検前日に二酸化炭素（CO_2）麻酔下で採血後すぐに自然死した。この死亡及び認められた組織学的変化は試験手技（CO_2 麻酔）に関連によるものであり、投与に関連するものではないと判断された。したがって、生存には、高用量の 1000IU/kg まで BAY 94-9027 投与による影響はないと結論された。一般状態、体重、眼科学的検査、血液学的検査、凝固、血液生化学的検査、剖検、又は臓器重量に投与の影響はみられなかった。病理組織学的検査における投与に関連した影響は認められなかった。尾部の投与部位に投与に関連した局所作用も認められなかったことから、局所忍容性は良好であることが示された。

トキシコキネティクス評価では、生後 32 日に投与を開始したラットの Day 1 の AUC（0-tlast）は用量比例性をわずかに上回って増加した（AUC の算出区間：200IU/kg 群で 0～8 時間、1000IU/kg 群で 0～24 時間）。C_{max}（n＝3）は用量比例性を下回って増加した。生後 17 日に投与を開始したラットでは、生後 24 日（Day 8）及び生後 31 日（Day 15）のいずれにおいても C(1h)〔n＝6（Day 8）及び n＝10（Day 15）〕は用量に比例して増加した。いずれの日齢群でも、投与終了時に中和抗体は認められなかった。

結論として、200 又は 1000IU/kg の BAY 94-9027 を幼若雄ラットに週 2 回 2 週間静脈内投与した結果、投与に関連した毒性所見は認められず、NOAEL は 1000IU/kg であった。

2.6.6.8.2　血友病 A マウスにおける BAY 94-9027 の免疫原性

参照項目：4.2.3.7.2.1 CB-2010-29

血友病 A マウスに反復静脈内投与し、BAY 94-9027 の比較免疫原性試験を実施した。本試験の目的は、血友病 A マウスモデル（12 匹/群）において、BAY 94-9027 を 5 回（週 1 回）反復静脈内投与したときの抗 FⅧ結合（bAb）及び中和抗体（nAb）の産生について、BAY 14-2222（コージネイト FS）と比較することであった。血友病 A マウスの試験で得られた動態データより、13IU/kg の BAY 94-9027 と 52IU/kg の BAY 14-2222 で同等の曝露量（同程度の AUC）が得られると

推定され、同様に、52IU/kg の BAY 94-9027 と 200IU/kg の BAY 14-2222 で同程度の AUC が得られると推定された。このように両製剤間で全身投与及び曝露量を考慮した比較ができるようにした。試験の概要を表 2.6.6.8- 2 に示す。

表 2.6.6.8- 2 血友病 A マウスにおける比較免疫原性試験の概要

Study type	**Comparative antigenicity**	**GLP: no**
Study reference	Study report: CB-2010-29	
Batch number	BAY 94-9027 Lot number 949027T070209	
	BAY 14-2222, Lot number 27N1XL1T	
Animals	Male hemophilia A mice	
Dose	BAY 94-9027: 13, 52, 200 IU/kg	
	BAY 14-2222: 52, 200 IU/kg	
Administration	Intravenous, weekly	
Vehicle	Excipient solution	

本試験中に BAY 94-9027 の低用量群の 2 匹が死亡した。1 匹は 3 回目の投与後（Day 22）に死亡した。剖検を実施したが、死因はあきらかにならなかった。もう 1 匹は、Day 27 に死亡しているのが確認された。頸部に裂傷がみられたことから雄マウス間の争いで受けた外傷により死亡したと考えられた。血友病マウスでは、比較的小さい傷でも死亡にいたる場合がある。体重は試験期間中増加し、群間に統計学的な差は認められなかった。結合抗体及び中和抗体の頻度と抗体価（Day 21 及び Day 36）について表 2.6.6.8- 3 に示す。

表 2.6.6.8- 3 血友病 A マウスにおける結合抗体及び中和抗体の頻度及び抗体価

Test material	**Dose IU/kg**		**Pre-dose titer**	**Day 21 titer bAb**	**Day 21 titer nAb**	**Day 36 bAb titer**	**Day 36 nAb titer**
BAY 94-9027	13	Frequency	0/12	1/12	1/1	2/10	1/2
		Mean	0	107	8	1664	100
		Median	0	0	8	0	100
BAY 14-2222	52	Frequency	0/12	4/12	0/4	8/12	6/8
		Mean	0	73	0	1603	27
		Median	0	0	0	400	14
BAY 94-9027	52	Frequency	0/12	1/12	0/1	9/12	3/9
		Mean	0	13	0	473	3
		Median	0	0	0	160	7
BAY 14-2222	200	Frequency	0/12	11/12	8/11	12/12	12/12
		Mean	0	6327	32	31653	252
		Median	0	1280	2	24000	200
BAY 94-9027	200	Frequency	0/12	5/12	2/5	6/12	4/6
		Mean	0	1343	14	4740	107
		Median	0	0	0	40	22

結論として、血友病 A マウスにおいて BAY 94-9027 の週 1 回、5 回静脈内投与により産生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。これは、投与量と推定曝露量（AUC）のいずれに基づいて比較しても同じであった。

2.6.6.8.3　ヒト血清における *in vitro* 補体活性化

参照項目：4.2.3.7.2.2 PH-39028

本 *in vitro* 試験の目的は、20 人の健康な若い男性提供者から得た血清において、BAY 94-9027 が補体系を活性化するかどうかを検討することであった。

血清試料に 3 又は 30 IU/mL の BAY 94-9027 を 37℃ で 60 分間曝露し、活性化補体 C3a 及び sC5b-9 の形成を ELISA で測定した。比較のために、添加剤対照、PEG-60-Mal-Cys、及び分子量の異なる 2 種のポリエチレングリコール（12kDa 及び 108kDa）を用いた試験も行った。補体活性化と投与前から存在する試験薬物に対する抗体の相関の有無を探索するため、血清提供者から得た血漿試料における BAY 94-9027 又は PEG に対する抗体の分析も行った。

提供された 20 血清のいずれにおいても、BAY 94-9027 によって C3a 又は sC5b-9 濃度は、溶媒対照（0.9%NaCl 溶液）と比較して増加しなかった。さらに添加剤（プラセボ）、リンカー（PEG-60-Mal-Cys）、及び 2 種の PEG（12kDa 及び 108kDa）についても、すべて BAY 94-9027 と同じ濃度に相当する濃度で検討したが、全 20 試料において C3a 又は sC5b-9 の濃度は増加しなかった。一方、陽性対照 Zymosan では、全試料で C3a 及び sC5b-9 の大きな増加が認められた。20 試料中 4 試料において、BAY 94-9027 又は PEG に対する抗体が低レベル（検出限界付近）で存在した。

本試験では、臨床的意義のある濃度で検討した場合、BAY 94-9027、添加剤、リンカー部分（PEG-60-Mal-Cys）、又は異なる分子量の 2 種の PEG は、健康提供者の血清の補体経路を *in vitro* で活性化しないとの成績が得られた。

2.6.6.8.4　*In vitro* 組織交差反応性

参照項目：4.2.3.7.2.3 R-9391

本試験の目的は、正常ヒト組織での試験薬物 BAY 94-9027 の結合特異性を、BAY 14-2222（完全長ヒト rFⅧ、コージネイト FS）と *in vitro* で比較することであった。BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 を 2 段階のたん白質濃度（0.2μg/mL 及び 1.0μg/mL）で正常ヒト組織（大脳、心臓、腎臓、肝臓、肺及び脾臓）の凍結切片に適用し、マウス抗ヒト FⅧ抗体及びビオチン化抗マウス IgG 二次抗体を用いて、免疫組織学的に検出した。

BAY 94-9027 及び比較対照 BAY 14-2222 とインキュベートした後、抗 FⅧ抗体による特異的染色がヒト心臓、腎臓及び肺の内皮細胞に認められた。BAY 94-9027 の結合の分布及び強度は BAY 14-2222 と同程度であり、腎臓及び肺の内皮細胞の 1%未満及び心臓内皮細胞の 25%～50%に境界域～中等度（±～3＋）の細胞質染色が認められた。陰性対照（BAY 94-9027 プラセボ）とインキュベートした組織では抗 FⅧ抗体による特異的染色は認められず、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 に認められた反応が特異的であることが確認された。

以上より、BAY 94-9027（PEG 化 FⅧ）及び BAY 14-2222（非 PEG 化完全長ヒト rFⅧ）は、心臓の一部の内皮細胞並びに腎臓及び肺のごくわずかな内皮細胞に対して、同程度の結合を示した。ヒト脳、肝臓、脾臓に対する結合は認められなかった。PEG 化たん白質 BAY 94-9027 の結合と非 PEG 化 FⅧの結合に差は認められなかった。

2.6.6.8.5　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 1025662 を用いて実施した毒性試験は BAY 94-9027 の安全性評価を補足する。BAY 94-9027 の PEG-60 部分である PEG-60-マレイミドは、BDD-rFⅧのシステインに結合している。この PEG-60-マレイミドを毒性試験で評価するため、システインによってマレイミドのリンカー活性を抑制した。この分子が BAY 1025662 又は PEG-60-マレイミド-システインである。

以下に要約する試験において、BAY 1025662 を被験物質として用い、その安全性を評価した。BAY 1025662 の試験におけるトキシコキネティクス評価は曝露量の確認のため行われたものであり、血漿中濃度及び薬物動態を BAY 94-9027 と比較するためのものではない。BAY 1025662 のトキシコキネティクス及び薬物動態並びに ^{14}C 標識 BAY 1025662 の排泄及び分布試験については、2.6.4 及び 2.6.5 参照。

2.6.6.8.5.1　BAY 1025662：雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.1 A48160

雄 Sprague Dawley ラット（15 匹/群）に、BAY 1025662 を用量 0（0.9%生理食塩液対照、10mL/kg）、23、70 及び 210mg/kg、各々投与容量 1.1、3.33 及び 10mL/kg で単回静脈内投与した。これらの高用量（60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる PEG-60-Mal-Cys 約 4μg/kg と比べて）は、ラットでの最初の探索的試験において全く毒性が認められなかったため、また、血漿中 PEG 検出のための測定法バリデーションのために選択した。剖検は Day 2 及び Day 15 の 2 時点に、それぞれ 10 匹/群及び 5 匹/群の動物について実施した。別の 6 匹/群の動物を用いてトキシコキネティクス評価を行った。試験の概要を表 2.6.6.8- 4 に示す。

表 2.6.6.8- 4　雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験の概要

Study Type	Acute	GLP: Yes
Study Ref.	Report no. A48160	
Batch No.	BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine), Laboratory notebook, Berkeley, # 2009-076-97	
Animals	Sprague Dawley rats, 10 + 6 (toxicokinetics) males / dose group, + 5 males /dose group for 2 weeks recovery	
Dose	BAY 1025662　23, 70, 210 mg/kg	
Administration	IV	
Vehicle	0.9% sterile physiological saline	
NOAEL	210 mg/kg	

死亡、一般状態、摂餌量及び摂水量、体重、血液生化学的検査、血液学的検査及び凝固パラメータ、尿検査、Day 1～8 のトキシコキネティクス、肉眼的病理検査、臓器重量、病理組織学的検査により、BAY 1025662 の影響を評価した。

210mg/kg（BAY 94-9027 に含まれる PEG 用量の 50000 倍以上）までの単回静脈内投与の忍容性は良好であった。23mg/kg 以上の投与において、Day 1 と Day 3 との間で摂餌量がわずかに減少した。さらに高用量の 210mg/kg では、Day 1 と Day 7 との間で摂水量がわずかに減少した。これらの一過性の影響は、ラットの一般状態を損なわなかったため、毒性作用とはみなされなかった。Day 2 に屠殺したラットの病理組織学的検査において血液含量の高い脾臓のみられた頻度が増加した。これは BAY 1025662 に関連しない可能性が高く、また、毒性プロファイルの評価に影響が

ないので毒性所見とはみなされなかった。しかし、本試験の条件下で BAY 1025662 が瀉血の程度に影響を及ぼした可能性は除外できない。

血漿中 BAY 1025662 の濃度 - 時間曲線下面積（AUC）及び最高濃度（C_{max}）は、ほぼ用量に比例して増加した（210mg/kg では用量比例性をわずかに下回った）。消失半減期は比較的長かった（2.5～3 日、表 2.6.6.8- 5）。

表 2.6.6.8- 5　ラット単回静脈内投与試験における TK パラメータ

Parameter	Units	Doses of BAY 1025662		
		23 mg/kg	70 mg/kg	210 mg/kg
AUC	[mg·h/L]	30044	80706	237065
AUC_{norm}	[kg·h/L]	1306	1153	1031
AUC(0-168)	[mg·h/L]	25699	70827	201817
AUC(168-∞)	[%]	14.5	12.2	14.9
t_{max}	[h]	0.5	0.083	0.083
C_{max}	[mg/L]	615	1940	4838
$C_{max,norm}$	[kg/L]	26.7	27.7	23.0
$C(24)/C_{max}$	[%]	46.7	37.1	43.5
$C(168)/C_{max}$	[%]	6.96	5.67	7.21
$t_{1/2}$	[h]	70.3	62.3	70.0

2.6.6.8.5.2　BAY 1025662：雄ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.2 PH-38065

BAY 1025662 を雄ウサギに単回静脈内投与した後、2 週間までの無処置の観察期間を設けた。本試験では BAY 1025662 の曝露量及び動態を検討した。本試験はウサギにおける BAY 1025662 反復投与の用量設定のための試験でもあった。試験の概要を表 2.6.6.8- 6 に示す。

表 2.6.6.8- 6　雄ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験の概要

Study type	Single-dose toxicity	GLP: Yes
Study reference	Study report: PH-38065	
Batch number	PGCS2012	
Animals	New Zealand White Rabbits,	
Dose	BAY 1025662: 0, 2, 20 mg/kg	
Administration	Intravenous	
Vehicle	0.9% sterile physiological saline	
NOAEL	20 mg/kg	

雄 New Zealand White ウサギ（3 匹/群）に 0、2、20mg/kg の BAY 1025662 を単回静脈内投与した。対照群には同様の方法で生理食塩液を投与した。BAY 1025662 の用量は、60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる PEG-60-Mal-Cys 約 4μg/kg の 500 倍及び 5000 倍に相当する。臨床パラメータ（死亡、一般状態、体重、摂餌量）、臨床検査（血液学的検査、凝固、血液生化学的検査）及び剖検、臓器重量及び病理組織学的検査（剖検：Day 15）により、BAY 1025662 の影響を評価した。トキシコキネティクス評価については、投与前、及び単回静脈内投与後 0.167、1、7、24、48、96、168、336 時間に採取した血漿試料の BAY 1025662 の濃度を測定した（以下の表 2.6.6.8- 7 参照）。

表 2.6.6.8- 7 雄ウサギ単回静脈内投与毒性試験における TK パラメータ

		Doses of BAY 1025662	
Parameter	**Unit**	**2 mg/kg**	**20 mg/kg**
AUC	mg·h/L	6740	86200
AUC_{norm}	kg·h/L	3370	4310
$AUC_{(0-336)}$	mg·h/L	6010	73600
$\%AUC_{(336-\infty)}$	%	10.6	13.9
C_{max}	[mg/L]	68.4	622
$C_{max\ norm}$	[kg/L]	34.2	31.1
t_{max}	H	0.167	1.05
CL	mL/(h·kg)	0.297	0.232
$C_{(336)}/C_{max}$	%	7.0	11.3
$t_{½}$	H	105	121
MRT_{iv}	H	148	169
V_{ss}	L/kg	0.0440	0.0391

最高用量 20mg/kg まで、臨床パラメータ、臨床検査及び病理組織学的検査に投与による影響は認められなかった。

AUC は用量比例性をわずかに上回って増加し、C_{max} は用量に比例して増加した。排泄は非常に遅く、最高濃度から半減したのは投与後 2 日であり、終末相の半減期は 4～5 日であった。クリアランスは非常に小さく、2 及び 20mg/kg でそれぞれ 0.30 及び 0.23mL/（h·kg）であった。定常状態の分布容積（V_{ss}）は非常に小さく、約 0.03L/kg であった。

本試験の条件下において、雄ウサギへの単回静脈内投与の忍容性は良好であった。

2.6.6.8.5.3 BAY 1025662：雄ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.3 A50211

雄 Sprague Dawley ラット（1 群あたり主群 12 匹、＋回復群 6 匹、＋トキシコキネティクス群 9 匹）に 0.045、0.7、11.0mg/kg の BAY 1025662 を 1 日おきに 4 週間静脈内投与した。別の 2 群を設け生理食塩液又は溶媒を投与容量 10 mL/kg で投与し、対照とした。回復期間は 4 週間とした。BAY 1025662 の用量は、11mg/kg の単回投与が 4μg/kg（60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 の推定量）を週 1 回 50 年間投与した場合の累積生涯投与量に相当することに基づいて選択した。試験の概要を表 2.6.6.8- 8 に示す。

表 2.6.6.8- 8 雄ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study type	**Repeat-dose toxicity**	**GLP: Yes**
Study reference	Study report: A50211	
Batch number	27-2008-176-01 (Laboratory notebook, Bayer AG, Berkeley, USA)	
Animals	Sprague Dawley rats, 12+ 9 (toxicokinetics) males/dose group, + 6 males in all groups for 4 weeks recovery	
Dose	BAY 1025662: 0.045, 0.70, 11.0 mg/kg	
Administration	Intravenous, every second day	
Control groups	0.9% sterile physiological saline buffer or 0.08 g Tween 80, 2.92 g NaCl, 0.37 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ad 1000 mL WFI	
NOAEL	11 mg/kg	

臨床パラメータ（死亡、一般状態、摂餌量、摂水量及び体重）、血液生化学的検査、血液学的検査及び凝固パラメータ、尿検査、肝酵素活性測定、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査により、BAY 1025662 の影響を評価した。

さらに本試験に末梢血小核試験を含めることにより、BAY 1025662 の遺伝毒性を検討した（2.6.6.8.5.5.3）。

トキシコキネティクス評価については、Day 1 及び Day 28 の投与後 0.083、0.5、1.5、7、24、48 時間の時点で採取した血漿試料の BAY 1025662 の濃度を測定した。

高用量の 11.0mg/kg まで、投与に関連する毒性所見は認められなかった。肝臓組織において、モノオキシゲナーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ及びウリジン 5′二リン酸（UDP）グルクロニルトランスフェラーゼのわずかな減少が、投与期間終了時又は回復期間に一部の用量で認められた。この減少は適応性変化であると考えられた。

投与期間終了時、BAY 1025662 の全身曝露量 AUC（0-48）及び C_{max} は用量比を中程度に下回って増加した（表 2.6.6.8- 9）。投与から 48 時間後のトラフ値の範囲は、各 C_{max} 値の 41.4%～50.8%であった。BAY 1025662 の反復投与後、中等度から顕著な蓄積（AUC（0-48）及び C_{max}：2.5 倍～5.6 倍）が認められた。

表 2.6.6.8- 9　雄ラット 4 週間反復静脈内投与試験における TK パラメータ

Dose ev. 2nd Day [mg/kg/d]	Sex	Date	C_{max} [mg/L]	AUC(0-48) [mg·h/L]	$AUC(0\text{-}48)_{norm}$ [kg·h/L]	$C(48)/C_{max}$ [%]	RAC_{max} [%]	RAAUC [%]
Rat								
0.045	m	Day 1	1.13	26.7[a]	594[a]	n.c.	n.a.	n.a.
0.7	m	Day 1	25.9	501	716	23.5	n.a.	n.a.
11	m	Day 1	323	6495	590	24.0	n.a.	n.a.
0.045	m	Day 27	5.84	149	3302	50.8	519	556
0.7	m	Day 27	63.9	1585	2265	50.1	247	316
11	m	Day 27	884	19145	1740	41.4	273	295

[a] = estimate, AUC(0-48) extrapolated from 7 to 48 h
n.a. = not available, n.c. = not calculated

雄ラットへの BAY 1025662 の 4 週間反復静脈内投与（1 日おき）の忍容性は良好であった。血液生化学的検査、血液学的検査、肝酵素、肉眼的又は病理組織学的検査において、BAY 1025662 の組織毒性作用を示す所見は認められなかった。

BAY 1025662 の反復投与後、末梢血小核試験において、変異原性は検出されなかった。

2.6.6.8.5.4　BAY 1025662：雄ウサギにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.4 PH-38066

雄ウサギに BAY 1025662 を週 2 回（計 8 回投与）4 週間静脈内投与した後、13 週間までの無投与の観察期間を設けた。本試験では BAY 1025662 の曝露量及び動態を検討した。試験の概要を表 2.6.6.8- 10 に示す。

表 2.6.6.8- 10 雄ウサギにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study type	**Repeat-dose toxicity**	**GLP: Yes**
Study reference	Study report: PH-38066	
Batch number	PGCS2012,	
Animals	New Zealand White Rabbit, 6 males per group, + 3 males for recovery in control, mid and high dose	
Dose	BAY 1025662: 0.02, 0.20, 2.00 mg/kg,	
Administration	Intravenous, twice weekly	
Control groups	0.9% sterile physiological saline buffer: 0.08 g Tween 80, 2.92 g NaCl, 0.37 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ad 1000 mL WFI	
NOAEL	2.0 mg/kg	

雄 New Zealand White ウサギ（6 匹/群）に BAY 1025662 のストック溶液を 0.9%NaCl 溶液で希釈して投与した。生理食塩液を陰性対照として投与した。BAY 1025662 は、耳静脈に週 2 回、0.02、0.2、2.0mg/kg の用量で 4 週間（計 8 回投与）静脈内投与した。BAY 1025662 の用量は、60IU/kg の BAY 94-9027 に含まれる BAY 1025662 の量 4μg/kg の 5、50、500 倍となる量を選択した。

投与容量は、対照、中用量及び高用量では 0.20mL/kg、低用量では 0.02mL/kg とした。対照群、中用量群及び高用量群では 13 週間の回復群（3 匹/群）を設け、所見の回復性又は遅発について評価した。トキシコキネティクス評価については、Day 1 及び Day 25 のそれぞれ投与後 0.166、0.5、2、7、24、72 時間に採取した血漿試料の BAY 1025662 濃度を測定した（以下の表 2.6.6.8-11 参照）。さらに回復期間には 8 回目の投与後 168、336、672、1344、2184 時間の血漿試料を採取した。

表 2.6.6.8- 11 雄ウサギ 4 週間反復静脈内投与試験における TK パラメータ

Dose twice weekly [mg/kg/d]	**Sex**	**Date**	**C_{max} [mg/L]**	**AUC(0-72) [mg·h/L]**	**$AUC(0\text{-}72)_{norm}$ [kg·h/L]**	**$C(72)/C_{max}$ [%]**	**RAC_{max} [%]**	**RAAUC [%]**
Rabbit								
0.02	m	Day 1	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.a.	n.a.
0.2	m	Day 1	5.74	241	1210	39.0	n.a.	n.a.
2	m	Day 1	56.5	2210	1110	37.9	n.a.	n.a.
0.02	m	Day 25	2.13	38.5[a]	1920[a]	n.c.	n.c.	n.c.
0.2	m	Day 25	15.3	692	3460	41.8	267	287
2	m	Day 25	133	6130	3060	46.9	236	277

[a] = AUC(0-24)
n.c = not calculated, n.a. = not available

BAY 1025662 を投与したウサギの全身曝露量 AUC 及び C_{max} は用量に比例して増加した。中用量及び高用量での排泄は比較的遅く、投与終了時には 2.5 倍の蓄積が認められた。

雄ウサギに週 2 回 4 週間静脈内投与し無投与の観察期間 13 週間を設けた場合の忍容性は良好であった。最高用量 2.0mg/kg まで、死亡、一般症状、臨床検査及び病理組織学的検査において投与の影響は認められなかった。

2.6.6.8.5.5　BAY 1025662 の遺伝毒性試験

BAY 1025662 について、標準的組合せの遺伝毒性試験を実施した。遺伝毒性試験として、*in vitro* Ames 試験（5mg/plate まで）、L5178Y 細胞を用いた *in vitro* マウスリンフォーマ試験（5mg/mL まで）及びラットにおける *in vivo* 小核試験を実施した。

2.6.6.8.5.5.1　BAY 1025662：ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（Ames 試験）

参照項目：4.2.3.7.7.5 A51161

試験の目的は、BAY 1025662 が、Aroclor 1254 処理した雄ラット肝臓ホモジネート（S9）を含む代謝活性化系（S9 mix）の存在下又は非存在下で、ネズミチフス菌 5 系統に点突然変異を誘発するかどうかを、細菌を用いる復帰突然変異試験（直接プレート法及びプレインキュベーション法）により検討することであった。

ネズミチフス菌を試験菌株として用いた復帰突然変異試験（直接プレート法及びプレインキュベーション法）において、代謝活性化系（S9 mix）の存在下又は非存在下で最高推奨用量レベル 5.0mg/plate まで、BAY 1025662 は変異原性を示さなかった。

2.6.6.8.5.5.2　BAY 1025662：マウスリンフォーマ TK 試験

参照項目：4.2.3.7.7.6 A50973

試験の目的は、BAY 1025662 がマウスリンフォーマ細胞株 L5178Y のチミジンキナーゼ（TK）遺伝子座に変異を誘発するかどうかを検討することであった。2 つの独立したアッセイを代謝活性化系（S9 mix）の非存在下又は存在下で行った。試験系の特異性及び感度を確認するため、適切な陰性対照及び陽性対照についても並行して試験した。緩衝液（BAY 1025662 の希釈用）又は生理食塩液（BAY 1025662 ストック溶液）をそれぞれ溶媒又は陰性対照とした。既知の変異原であるマイトマイシン C（Mit C、0.05 及び 0.1μg/mL）及びシクロホスファミド（CP、3.0μg/mL）を陽性対照とした。

本試験において、代謝活性化系の非存在下又は存在下で最高濃度 5mg/mL まで、溶媒対照の変異コロニー数の 2 倍を超える変異コロニー数の増加は認められなかった。

代謝活性化系の非存在下又は存在下のいずれにおいても、検討したすべての濃度で BAY 1025662 の細胞毒性は認められなかった。また、小型及び大型の変異コロニーの割合にも変化は認められなかった。

2.6.6.8.5.5.3　BAY 1025662：*In vivo* 末梢血小核試験

参照項目：4.2.3.7.7.3 A50211

BAY 1025662 の雄ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験（2.6.6.8.5.3）において、Day 24 に雄ラット（5 匹/群）の末梢血試料を採取し、小核のフローサイトメトリー解析を行った。フローサイトメトリー解析は、FACScan フローサイトメーター（Becton Dickinson 社製）を用い、励起光 488nm で実施した。

各試料につき 20,000 個以上の網状赤血球（RET）を解析し、小核を有する網状赤血球の出現頻度（%MN-RET）を測定した。さらに小核を有する正染性赤血球数（%MN-NCE）を測定した。毒性指標として血液試料中の RET 画分（%RET）を算出した。

Day 24 に雄ラットから採取した末梢血の小核（MN）を解析したところ、生物学的に意味のある、又は統計学的に有意な、網状赤血球（RET）又は正染性赤血球（NCE）の小核の増加は認められなかった（表 2.6.6.8- 12）。全身曝露量については、表 2.6.6.8- 9 を参照のこと。

表 2.6.6.8- 12 *In vivo* 末梢血小核試験の概要

Group	Treatment	Number of animals	% MN-RET (mean ± SD)	% MN-NCE (mean ± SD)	% RET (mean ± SD)
1	Negative control	5	0.08 ± 0.04	0.01 ± 0.01	1.36 ± 0.22
2	Vehicle control	5	0.04 ± 0.02	0.00 ± 0.01	1.52 ± 0.15
3	0.045 mg/kg BAY 1025662	5	0.07 ± 0.01	0.01 ± 0.00	1.52 ± 0.28
4	0.7 mg/kg BAY 1025662	5	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.01	1.56 ± 0.44
5	11 mg/kg BAY 1025662	5	0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.01	1.59 ± 0.26

BAY 1025662 を投与した動物において、小核を有する網状赤血球の頻度に変化はないと結論づけられる。

2.6.6.8.5.6 BAY 1025662：幼若ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験

参照項目：4.2.3.7.7.7 PH-37891

幼若 Wistar ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験を実施した。本試験の目的は、幼若動物における BAY 1025662 の毒性を検討することであった。雄ラット（10 匹/群）に、BAY 1025662 を 0（添加剤対照：生理食塩液）、0.4 及び 2.0mg/kg を週 2 回 30 日間静脈内投与した。トキシコキネティクス評価には別の雄ラット 9 匹/群を使用した。投与容量は 3mL/kg とした。

幼若ラットで安定して反復静脈内投与できる最も若い日齢である生後 17 日（PND17）に投与を開始した。生後 17 日のラットは、神経系、生殖系、骨格系、呼吸器系、腎臓系、心臓系及び肝臓系がまだ発達段階にある [5]。投与は 30 日間動物が成長するまで継続した。試験の概要を表 2.6.6.8- 13 に示す。

表 2.6.6.8- 13 幼若ラットにおける 4 週間反復静脈内投与毒性試験の概要

Study type	**Repeat-dose toxicity**	**GLP: Yes**
Study reference	Study report: PH-37891	
Batch number	BAY 1025662 Batch number PGCS2012	
Animals	Wistar rats [HsdRccHan: Wis], age PND 17 (19 rats per group) dosed for 4 weeks	
Dose	BAY 1025662: 0.4, 2.0 mg/kg	
Administration	Intravenous, twice weekly	
Vehicle	0.9% sterile NaCl	
NOAEL	2.0 mg/kg	

臨床パラメータ（死亡、一般状態、体重）、臨床検査（血液学的検査、血液生化学的検査、凝固）、剖検、臓器重量及び病理組織学的検査により評価を行った。トキシコキネティクス評価では、7 回目の投与（Day 22、生後 38 日）の投与前、投与後 0.5、7、24、48 及び 144 時間に採取した血漿試料の BAY 1025662 濃度を測定した。

2mg/kg までの用量の BAY 1025662 を反復静脈内投与したときの忍容性は良好であった。死亡の発生はなく、問題となる毒性は認められなかった。投与部位（尾）に局所作用は認められなかった。

トキシコキネティクス評価において、AUC 及び C_{max} は用量に比例して増加した。最高濃度は 0.5 時間（投与後最初の採血時点）に認められ、緩徐に低下した。補間により求めた 72 時間（Day 22 の投与間隔の終了時点：次の投与前）の濃度は C_{max} の約 40%であった。72 時間時点の濃度は Day 22 の投与前の濃度と同程度であり、定常状態であることが示された。高用量 2.0mg/kg の投与で、AUC（0-144）は 3810mg·h/L、C_{max} は 57.0mg/L であった。

BAY 1025662 を 0.4 及び 2.0mg/kg の用量で幼若雄ラットに 17 日齢より週 2 回 30 日間静脈内投与（計 9 回投与）したとき、投与に関連した毒性所見は認められなかった。

2.6.6.8.6　ポリエチレングリコールの安全性に関する調査

BAY 94-9027 分子の一部分である PEG-60 の長期安全性を考察するため、関連文献及びデータを以下にまとめる。

PEG 化薬物に特化した次の 2 つのガイダンスが考察において重要である。

- *Food and Drug Administration (FDA) Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment of Therapeutic Protein Products*[6)]
- the *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Safety Working Party's response to the European medicinal agency (EMA) Pediatric Committee regarding the use of PEGylated drug products in the paediatric population*[7)]

免疫原性関連については 2.6.2.2.3 でも考察されており、詳細な考察は 5.3.5.3.7 にまとめられている。2012 年の SWP の回答では、細胞質空胞化に関して、細網内皮系（RES）細胞では異物を除去しようとする身体の反応であると考える一方で、尿細管上皮や脈絡叢上皮などの細胞では懸念があるとしている。SWP の要約によると、これらの細胞質空胞化は分子量 40kDa 以上の PEG、サルにおける 6 週間以上投与の毒性試験、累積 0.4μmol/kg/月以上の PEG 投与、などの一定の条件下で認められるとされている。2012 年以降、より短い試験期間（4 週間）及び他の動物種（ラット）においても PEG による組織の空胞化が認められたことが報告された[8)]。現時点での PEG 化バイオ医薬品の詳細については、最近の文献に記載されている[8,9,10,11,12)]。現時点で 10 を超える PEG 化バイオ医薬品が承認されており、いくつかはヒトにおいて長期治療に使用されている。また、少なくとも 4 つの PEG 化凝固因子が、治験段階にあるか、又は承認されており、非臨床データ[1,2,9,13,14)]が公表されている。

BAY 94-9027 中の PEG 投与量が少ないことを明らかにするために、PEG-60 量を上述の SWP 文書[7)]で取り上げられている基準値 0.4μmol/kg/月と比較する。BAY 1025662（PEG-60-Mal-Cys） 4μg/kg を最大で週 2 回投与したと仮定すると、PEG-60-Mal-Cys の投与量は、最大で 32μg/kg/月、又は 0.533nmol/kg/月となる。PEG-60 の最大投与量は 0.4μmol/kg/月と比較して 750 倍低いことになる。

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 の定期補充療法（60IU/kg の週 2 回投与）において 60 年必要となる。

2.6.6.8.6.1　PEG 化バイオ医薬品による細胞質空胞化

PEG 分子は不活性であり、水によく溶け、器官・組織に特異的受容体や標的たん白はない。公表文献からの情報によると、PEG 化製剤の毒性は通常、親（PEG 非結合）化合物の毒性を反映する[9,11,12]。毒性試験における唯一の PEG による影響として、細胞質空胞化がいくつかのバイオ医薬品の病理組織学的評価で報告されている。

公表されている毒性情報において、細胞質空胞化は、器官機能及び細胞の微細構造に変化がなく、また、周辺組織に変化もないことから有害作用ではないと考えられている。また、これまでヒトにおいて PEG 化製剤で PEG に関連する影響の報告はない。

毒性試験の病理組織学的検査において、細胞質空胞化は、5kDa 以上の PEG の反復投与[8,11]で、また単回投与[16]においても認められている。標準的な H&E 染色では PEG は染まらないが、これらの空胞は、リソソーム又はエンドソームによる PEG 又は PEG 化製剤の取り込みを示している可能性が高い。PEG の存在を確認するには、抗 PEG 抗体を用いた免疫染色法を使用する必要がある。この方法によって空胞の中に PEG が検出され、また、最近では細胞質にも認められている[8,2,15]。しかし、この方法は定量的ではなく、また、方法の感度や組織中の PEG に結合する検出抗体に影響される。

40kDa の非結合 PEG が比較的高用量で細胞質空胞化を誘発することが、Rudmann ら[15]により示された。光学顕微鏡下で認められる空胞は、2～4μm の大きさで円形、不連続で明るい細胞質内空胞であり、H&E では染色されない。Bendele ら[16]は、20kDa の PEG を含む PEG 化たん白質を単回高用量投与又は反復投与したときに認められた腎臓での空胞化（尿パラメータに変化なし）が、このたん白質の腎クリアランス及び再取り込みと関連することを報告した。このことから、空胞化が非結合 PEG によるもの、又は PEG 化たん白質の臓器特異的な分布／排泄によるものであることが示唆されている。

細胞質空胞化は、マクロファージ及びその他の細網内皮系細胞に高い頻度でみられ、PEG のような異物を除去するための適応反応である可能性が高い。空胞は尿細管上皮及び脈絡叢上皮などの非貪食性細胞にも認められている。

Rudmann ら[15]は、ラットに非結合 PEG を静脈内投与（10、20、又は 40kDa の 100mg/kg を、各々1 日 1 回、1 日おき、週 2 回を 3 ヵ月投与）した試験において、PEG の分子量が、組織分布及び空胞化の両方に影響を及ぼすことを示した。各 PEG の 1 ヵ月の投与量は 10kDa：2800mg/kg/月、20kDa：1400mg/kg/月、40kDa：800mg/kg/月であった。10kDa 及び 20kDa の PEG 投与では、尿細管上皮、肺胞マクロファージ及び肝臓クッパー細胞に PEG 免疫反応（染色）が顕著に認められたが、細胞質空胞化は認められなかった。一方、40kDa の PEG を投与したラットでは、脾被膜下赤脾髄マクロファージ、腎間質マクロファージ及び脈絡叢上皮細胞に強い PEG 免疫反応が認められ、高頻度で細胞質空胞化と関連していた。PEG 化バイオ医薬品の分布パターンは、薬物受容体／標的を介した取り込み、又はリガンド特異的輸送機序に左右されることが多く、空胞化がみられる臓器・組織とその時の投与期間及び投与量は薬物ごとに異なるため、非結合 PEG のデータから、PEG 化バイオ医薬品についてどの程度正確に外挿できるかは明確でない。このことは、2013 年に実施された、開発中の PEG 化バイオ医薬品 17 製品についての Ivens らによる調査[8]によって示されており、例えば、脈絡叢の空胞化は 20、30、及び 40kDa PEG 化たん白質において認められた。

PEG 化バイオ医薬品に用いられている PEG 分子の大きさ及び量はさまざまである。例えば、長期投与で承認されているバイオ医薬品では、PEG サイズは 20kDa 以上であり、臨床用量での PEG

量は、Cimzia：3500μg/kg（40kDa）、Refixia（N9-GP）：230μg/kg（40kDa）、Pegasys：2μg/kg（40kDa）、Plegridy：1μg/kg（20kDa）、Mircera：0.3μg/kg（30kDa）である[9,11]。

BAY 94-9027 に関する最も重要な関連のある公表文献は、免疫不全ラットに PEG（40kDa）化 FⅧ(Turoctocog alfa pegol、N8-GP：臨床 PEG 量は BAY 94-9027 と同程度）及び PEG（40kDa）化 FⅨ　Refixia（Nonacog beta pegol、N9-GP：臨床 PEG 量は BAY 94-9027 の約 50 倍）を 6 ヵ月又は 12 ヵ月間静脈内投与した毒性試験成績である[1,2]。PEG の分子量は直鎖長の増加によって異なってくるので、構造的には、ポリエチレン鎖におけるサブユニットの数が違っているだけである。PEG 分子の性質は分子量 20、30、及び 40kDa で同様であり、このことは 60kDa の PEG にも外挿できると考えられる。N8-GP では 1200IU/kg までの用量で 4 日毎 26 週間又は 52 週間投与において細胞質空胞化は認められず、また、26 週間及び 52 週間投与のいずれにおいても脳組織（脈絡叢を含む）及び脳の血管に PEG は検出されなかった[1]。

N9-GP の 26 週間投与試験でも、光学顕微鏡下で臓器・組織の病理組織学的評価が実施され、脈絡叢及び脾臓の免疫組織化学（IHC）染色による PEG 存在の検討、さらに脈絡叢の電子顕微鏡での評価も行われた[2]。その結果、光学顕微鏡下では空胞化は認められなかったが、PEG は、脈絡叢上皮細胞の小型の細胞質小胞に、6 週間後（高用量のみ）及び 26 週間後（全用量）に用量及び時間依存的に検出された。この小型の細胞質小胞は、脈絡叢の標準的 H&E 染色では可視化できなかった。さらに PEG は脈絡叢の結合組織や脳及び脈絡叢の血管内に弱く検出されたが、他の脳組織では検出されなかった。脾臓では、PEG は 26 週間投与後にのみマクロファージに検出された。回復期間 26 週間後の IHC 染色は、高用量群の脈絡叢を除き、陰性であった。前述のように定性的評価の IHC 染色は、検出抗体と組織処理に依存している。細胞質内及び小胞における PEG 染色の存在について考察がなされ、これらは組織の変化がないことから有害作用ではないと結論されている。

この毒性試験における N9-GP の投与量（5 日毎の反復投与）は、40IU/kg（臨床用量：0.2mg PEG/kg/dose）、150IU/kg（0.8mgPEG/kg/dose）、600IU/kg（2.7mgPEG/kg/dose）又は、1200IU/kg（6.4mgPEG/kg/dose）であった。一方、BAY 94-9027 の臨床における最高用量 60IU/kg に含まれる PEG 量は約 0.004mg/kg である。FⅧと FⅨを比べると、FⅨで PEG 投与量がはるかに多い。この試験における N9-GP 投与での PEG 投与量は BAY 94-9027 の臨床における PEG 投与量の 50～1600 倍の範囲であり、同様の動物試験においては BAY 94-9027 による組織の細胞質空胞化は生じないであろうと推測できる。このことは N8-GP の 52 週間毒性試験において確認された[1]。

N9-GP、N8-GP 及び BAY 94-9027 の血液凝固たん白質としての血流への分布は、臓器・組織に結合標的を有する他の多くの PEG 化バイオ医薬品とは異なる。BAY 94-9027 には組織に特異的な標的受容体はない。FⅧの *in vivo* クリアランスの一部は低比重リポたん白質受容体関連たん白質（LRP）への特異的結合によっている[17,18,19,20]。FⅧと LRP の相互作用に加えて、プロテオグリカン[21]や LDL 受容体[20]などの受容体との相互作用もまた FⅧのクリアランスに寄与している。したがって、BAY 94-9027（PEG-60 を伴う）は、腎臓からの PEG-60 の排泄に加えて、肝臓（受容体への結合）により除去され、胆汁を介して排泄される可能性が高いと考えられる。Bjoerndottir ら[13]は、非結合 40kDa PEG の排泄は用量依存的であり、低用量ほど排泄が速い（投与量範囲 1～200mg/kg）ことも示した。これらの類似点から、上述の N8-GP 及び N9-GP の試験結果を BAY 94-9027 に外挿することは可能であると考えられる。BAY 94-9027 で用いられている PEG-60 の分布及び排泄パターンは ^{14}C 標識 BAY 10225662 を用いた試験で検討され、まとめられている（2.6.4.8）。

肝臓（リンパ及び脾臓も）での取り込みは N8-GP が非結合 PEG-40 よりも優先されることが Bjoernsdottir によって示された[13]。この結果もまた BAY 94-9027 に適用できるものと考えられる。

PEG により誘発される細胞質空胞化は時間及び用量に依存しており、BAY 94-9027 のような低用量範囲では発現しないと考えられる。貪食細胞における空胞化は PEG 除去による適応反応であると考えられる。また、重要なことは、細胞質空胞化は、組織変性、壊死及び細胞変化、さらには、血液検査、血液生化学検査、尿検査又は臓器重量などへの影響を伴っていなければ、有害作用とはみなされないことである。

2.6.6.9　考察及び結論

BAY 94-9027 の毒性

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検討するため、包括的な非臨床安全性試験を実施し、BAY 94-9027 の単回投与毒性、反復投与毒性及び幼若動物における毒性を評価した。BAY94-9027 の PEG-60 部分（BAY 1025662、PEG-60-Mal-Cys）の評価については、単回投与毒性試験、4 週間の反復投与毒性試験、幼若動物における試験及び標準的な組合せの遺伝毒性試験を実施した。PEG の安全性に関しては 2.6.6.8.6 で考察した。

BAY 94-9027 を用いたいずれの試験においても投与に関連した死亡は生じなかった。ラット及びウサギにおける BAY 94-9027 の最高用量 4000IU/kg までの単回投与毒性試験及び最高用量 2250IU/kg までの反復投与毒性試験において、毒性は認められなかった。血栓形成の誘発やその他の過剰な薬理作用に関連した有害作用は、いずれの試験においても認められなかった。PEG に起因した可能性のある影響は認められなかった。体重、一般症状、脳及び腎臓重量に影響はみられず、組織の細胞質空胞化も認められなかった。

ラットでは、Day 1 における BAY 94-9027 投与群の AUC（0-48）は用量に比例して増加した。BAY 14-2222（完全長 FVⅢ）投与群の AUC（0-48）は、同じ用量の BAY 94-9027 投与群と比較して、約 20 分の 1 であった。BAY 94-9027 投与群では、Day 1 と比較して、Day 13 における曝露量は低かった。一方、BAY 14-2222 投与群では Day 13 には検出されず、これは抗薬物抗体産生が原因である可能性が高い。ウサギでは、Day 1 における BAY 94-9027 投与群の AUC（0-48）は、低用量群から中用量群では用量に比例して、中用量群から高用量群では用量比例性をわずかに上回って、増加した。Day 13 における BAY 94-9027 の中用量群及び高用量群並びに BAY 14-2222 群の血漿中 FVⅢ活性はすべて定量下限未満であった。これは抗薬物抗体による可能性が高い。

ヒトたん白質をラット及びウサギに投与したため、認められた抗薬物抗体の産生頻度はヒトでの産生を予測するものではない。ラット及びウサギに BAY 94-9027 を反復投与したとき、抗 PEG 抗体は認められなかった。血友病 A マウスにおける比較免疫原性試験において、BAY 94-9027 に対する結合抗体及び中和抗体は、完全長 FVⅢ（BAY 14-2222）に比べて少なかった。

局所刺激性は、単回及び反復投与毒性試験において、一般状態観察、投与部位の肉眼的及び病理組織学的検査により検討した。局所刺激性に対照動物との差は認められなかった。

健康被験者のヒト血清を用いて補体活性化について *in vitro* で評価を行ったところ、BAY 94-9027 及び PEG-60-Mal-Cys はいずれも、抗 PEG 抗体が存在している状況でも、補体活性化を誘発しなかった。*In vitro* のヒト組織交差反応性試験において、BAY 94-9027 及び BAY 14-2222 は、心臓の一部の内皮細胞並びに腎臓及び肺のごくわずかな内皮細胞に対して、同程度の結合を示した。ヒト脳、肝臓、脾臓に対する結合は認められなかった。FVⅢの PEG 化によって、PEG を持たない完全長 FVⅢと異なる組織結合は生じないと結論することができる。

BAY 94-9027 の幼若ラットにおける試験を生後 17 日に静脈内投与を開始し、実施した。最高用量 1000IU/kg（週 2 回投与）まで 2 週間投与において、毒性所見は認められなかった。

BAY 94-9027 の遺伝毒性試験は実施しなかった。BAY 1025662 については標準的組合せの *in vivo* 及び *in vitro* 遺伝毒性を実施した。その結果、遺伝毒性を示す所見は認められなかった。

FVⅢは内因性たん白質であるため、BAY 94-9027 のがん原性試験は必要ではないと考えられる。BAY 94-9027 は細胞増殖作用や免疫調節作用を示さず、また、PEG-60、他の PEG 分子[4)]、又は FVⅢ

には、遺伝毒性はなく、長年にわたり患者に使用されているが、これまでにがん原性の徴候は認められていない。

分子量の異なる PEG 分子について、非常に良好な安全性プロファイルが示されており、特異的な標的臓器への影響も認められていない。2.6.6.8.6 に要約したように、いくつかバイオ医薬品で主に貪食細胞にみられる細胞質空胞化が PEG に起因する唯一の特異的作用であった。PEG 化たん白質の投与による特有の毒性はなく、毒性は通常親たん白質に関連している。ラットで、2250IU/kg までの BAY 94-9027 の 1 日おき 2 週間投与、又は 11mg/kg（ヒトに対する用量 60IU/kg に含まれる PEG-60 量の約 2700 倍）までの BAY 10256624 の 1 日おき 4 週間投与において、細胞質空胞化は認められなかった。

BAY 94-9027 投与における PEG 投与量は非常に少なく、BAY 94-9027 の臨床における最高用量 60IU/kg で 1 回投与あたり約 4μg/kg であり、BAY 94-9027 を週 2 回投与すると仮定した場合でも最大 8μg/kg/週である。これは EMA の SWP[7]で論じられた小児集団に 1 ヵ月間投与する場合の限界値の約 750 倍低い量である。

BAY 94-9027 の幼若動物における試験に加え、BAY 1025662 の幼若ラットにおける試験を実施し、生後 17 日に静脈内投与を開始した。BAY 1025662 の週 2 回 4 週間投与において、幼若動物において最高用量の 2.0mg/kg まで、投与に関連した毒性は認められなかった。

結論：BAY 94-9027 は、雄ラット及び雄ウサギの毒性試験において、単回静脈内投与では予定最高臨床用量の約 67 倍まで、1 日おき 2 週間の反復投与では予定最高臨床用量の約 37 倍まで、良好な忍容性を示した。BAY 94-9027 又は BAY 1025662 を用いた試験において、PEG に関連した影響は認められなかった。

BAY 94-9027 の臨床用量が低いので、長期使用における安全性のリスクは細胞質空胞化も含めて認められず、臓器機能への影響もほとんどないと考えられる。結論として、BAY 94-9027 は良好な非臨床安全性プロファイルを示し、BAY 94-9027 の非臨床安全性データは、FⅧの確立された臨床使用に従ったヒトにおける安全な使用を支持するものである。

BAY 94-9027 と細胞質空胞化

PEG 化バイオ医薬品において、細胞質空胞化は用量及び時間依存的であり、空胞化はラットにおいて 4 週間投与で病理組織学的に観察されることが示されている[8]。BAY 1025662 を用いた毒性試験では、高用量を 4 週間にわたって反復投与し、BAY 1025662 が細胞質空胞化を含む PEG 関連の影響を誘発するかどうか評価した。BAY 1025662 の生体内での分布パターンは BAY 94-9027 と違う可能性が高いが、BAY 94-9027 のたん白部分が分解され、PEG-60 が残っている状況を表していると考えられる。また、他の PEG 化 FⅧの N8-GP において高用量で低用量よりも排泄が遅いことが示されている[13]ことから、BAY 1025662 の高用量での試験は、PEG が体内に残存するような最悪の状況を再現している。^{14}C 標識 BAY 1025662 の排泄と分布の評価に関しては 2.6.4 に記載されている。

BAY 94-9027 の想定される最高臨床用量 60IU/kg に含まれる PEG 量は約 4μg/kg であり、週 2 回の定期補充療法でも、最大で約 8μg/kg/週である。臨床用量の BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 の量は、他のバイオ医薬品における PEG 量と比較して低用量の範囲にある[8,9,11]（図 2.6.6.9-1）。

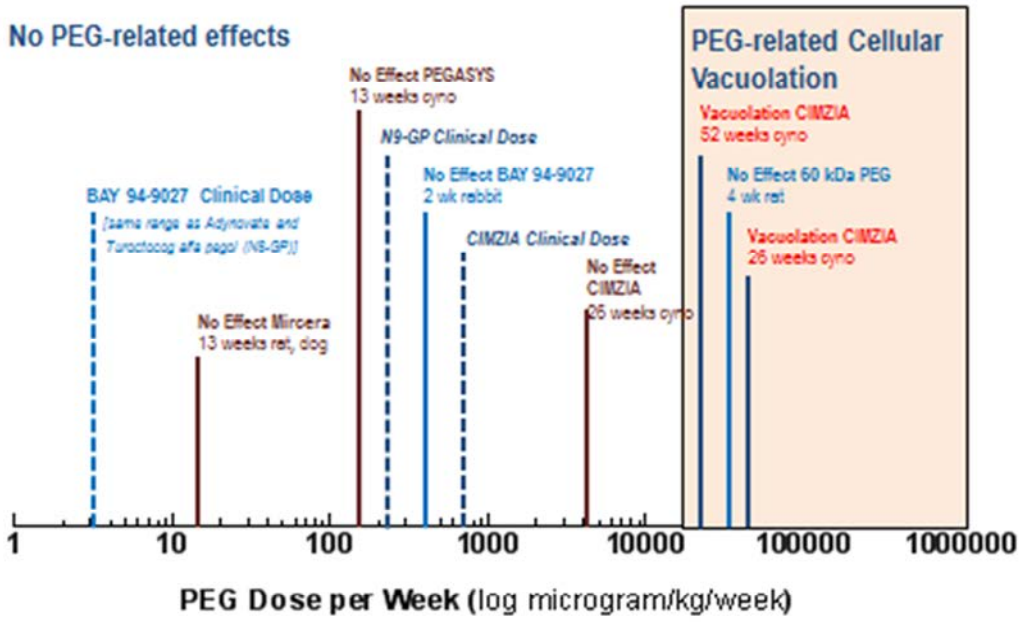


図 2.6.6.9- 1　BAY 94-9027 と他の PEG 化バイオ医薬品の比較（PEG 投与量と認められた所見）

BAY 1025662 を用いた毒性試験（ラット、ウサギ）の無毒性量（NOAEL）における PEG-60 量と BAY 94-9027 60IU/kg 中の PEG-60 量（ヒト：4μg/kg/dose、8 x 4μg/kg/月）の比較を以下に示す（表 2.6.6.9- 1 も参照）。

ラット及びウサギにおける BAY 1025662 の急性毒性試験での単回投与量のヒト PEG-60 投与量との比較：

１．ラットでの高用量：210mg/kg / 4μg/kg　=　52500 倍

２．ウサギにおける高用量：20mg/kg / 4μg/kg = 500 倍

ラット及びウサギにおける BAY 1025662 の 4 週間投与毒性試験での 1 ヵ月あたりの投与量（ラット：1 日おきの投与、ウサギ：週に 2 回投与）のヒト PEG-60 投与量との比較：

１．ラットでの高用量：11mg/kg x 14 回　/　4μg/kg x 8 回= 4800 倍

２．ウサギでの高用量：2mg/kg x 8 回　/　4μg/kg x 8 回= 500 倍

BAY 94-9027 の最高臨床用量における PEG 量と比較して BAY 1025662 の毒性試験における PEG 投与量を表 2.6.6.9- 1 にまとめた。

表 2.6.6.9- 1 PEG-60-Mal-Cys（BAY 1025662）の毒性試験における PEG 投与量と BAY 94-9027 60IU/kg 中の最大 PEG 投与量との比較（週あたりでの比較）

Type of study	Species, gender, and strain, Report Number	Method of admin.	PEG-60-Mal-Cys Dose [mg/kg]	**Margin to Human PEG Dose[4]**	Reference Findings
Single-dose with 2-week recovery (GLP)	Rat, male, Sprague Dawley,	IV bolus	23, 70, 210	**Na**	4.2.3.7.7.1 / A48160 No adverse effects [2]
	Rabbit, male, New Zealand White,	IV bolus	2, 20	**Na**	4.2.3.7.7.2 / PH-38065 No adverse effects [1]
4-week dosing (GLP)	Rat, male, Sprague Dawley ,	IV bolus (every second day)	0.045, 0.7, 11.0	**20, 306, 4813 fold**	4.2.3.7.7.3 / A50211 No adverse effects[2]
	Rabbit, male, New Zealand White,	IV bolus twice weekly	0.02, 0.2, 2.00	**5, 50, 500 fold**	4.2.3.7.7.4 / PH-38066 No adverse effects[3]
4 weeks juvenile study in rats (GLP)	Rat, male, Wistar,	IV bolus (twice weekly)	0.4, 2.0	**100, 500 fold**	4.2.3.7.7.7 / PH-37891 No adverse effects[3]

[1] Parameters assessed included: body weight, clinical pathology including coagulation and fibrinogen, organ weights, histopathology of selected organs including brain and kidneys

[2] Parameters assessed included: body weight, clinical pathology including coagulation and fibrinogen, organ weights including brain, histopathology of >40 organs including brain and kidneys

[3] Parameters assessed included: body weight, clinical pathology including coagulation and fibrinogen, organ weights including brain, histopathology of >40 organs including brain with choroid plexus and kidneys

[4] Calculation of margin of dose in animal study to human PEG-60 dose: Maximal anticipated weekly dose of BAY 94-9027 as 2x 60 IU/kg/week containing 2x 4 µg/kg or 8 µg/kg/week compared to weekly dose in animal study.

na = not applicable since single dose

BAY 94-9027 に含まれる PEG-60 のリスク評価

BAY 94-9027 の試験では抗薬物抗体による二次的毒性の発現を避けるために投与期間は 2 週間に設定した。BAY 94-9027 の PEG-60 部分についての評価のために、PEG-60 部分（BAY 1025662）を用いた 4 週間投与試験を実施し、PEG-60 に関連する細胞質空胞化の可能性を評価した。臨床使用時の BAY 94-9027 中 PEG-60 量に比べて高用量の PEG-60 を投与することにより、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、臨床に比較してきわめて高用量の PEG-60 用量を選択した。N9-GP[2)]及び N8-GP[1)]の試験で示されているように、ヒトにおいては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、長期の投与試験では PEG-60 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。ラットにおいて 20kDa 以上の PEG を 4 週間投与し

たときに空胞化が認められており[8)]、このことはBAY 1025662の安全性評価においてラット及びウサギの試験デザインが適切であることを示している。

BAY 94-9027に含まれるPEG-60のリスク評価について重要な点を以下にまとめる。

- BAY 94-9027は、他のPEG化バイオ医薬品と比べて低用量範囲にある少量のPEG 60kDaを含んでいる。
- PEG-60-Mal-Cysの高用量反復投与において細胞質空胞化は認められなかった（最高臨床用量におけるPEG投与量に対し、ラットで4800倍まで、ウサギで500倍まで）。
- PEGの分子量は直鎖長の増加によって異なってくるので、構造的には、ポリエチレン鎖におけるサブユニットの数が違っているだけである。PEG分子の性質は分子量20、30、及び40kDaで同様であり、このことは60kDaのPEGにも外挿できると考えられる。
- 長期投与試験を実施したとしても、BAY 94-9027に含まれているPEG-60に関して患者へのさらなるリスクの特定にはいたらないと考えられる。
- BAY 94-9027には、血中からFⅧを除去する肝臓にあるスカベンジャーレセプター以外にいずれの組織にも特異的な受容体や標的は存在しない。したがって、特異的結合によって特定の組織に高濃度のBAY 94-9027が取り込まれる可能性は低い。
- 大きさの異なるPEG分子に関する現在の知見から、細胞質空胞化は、組織変性、炎症、壊死、細胞変化又は血液検査、血液生化学検査、尿検査、臓器重量などの毒性指標の変化を伴わなければ有害作用とはみなされない。
- ラットにおいてPEG-60は腎臓から排泄され、放射能（PEG）の滞留性や非可逆的結合の兆候はない（2.6.4）。特に、脳には残留放射能は検出されず、放射能が脳血液関門を通過しないことが示された。
- BAY 94-9027の定期補充療法において、PEGが全く排泄されないと仮定して、CHMP SWPが小児での使用について言及している0.4μmol/kg/月に達するには60年必要である。

結論：BAY 94-9027の臨床用量が低いため長期の投与において安全性のリスクはほとんどないと考えられる。血漿及び組織のPEG量は少なく、長期の使用においてPEGの臓器機能への影響はないと考えられる。

2.6.6.10　図表

図及び表は本文中に記載した。

引用文献一覧

1) Rasmussen CE et al., J Toxicol. 2017:ID 8496246 (4.3.30)

2) Rasmussen CE et al., Toxicologic Pathology 2016:44:726-737 (4.3.21)

3) Diehl KH et al., J. Appl. Toxicol. 2001:21:15-23 (4.3.17)

4) Liebert MA, J Am.Col.Toxicol. 1993:12: 429-457 (4.3.31)

5) FDA, Guidance for Industry, Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products: February 2006 (4.3.32)

6) FDA, Guidance for industry, Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products:August 2014 (4.3.33)

7) EMA, CHMP Safety Working Party's response to the Paediatric Committee(PDCO): November 2012 (4.3.34)

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

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

10) Baumann A et al., Drug discovery today 2014:19:1623-1631 (4.3.13)

11) Turecek PI et al., J Pharmaceutical Sciences 2016:105:460-475 (4.3.37)

12) Webster R et al., Drug Metabolism and Disposition 2007:35:9-16 (4.3.1)

13) Bjoernsdottir I et al., European J Pharmaceutical Scineces 2016:87:58-68 (4.3.14)

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

15) Rudmann DC et al., Toxicol Pathol 2013:41:970-983 (4.3.38)

16) Bendele A et al., Toxicol Sci 1998:42:152-157 (4.3.39)

17) Lenting PJ et al., J Biol Chem. 1999:274:23734-23739 (4.3.40)

18) Saenko EL et al., J Biol Chem. 1999:274:37685-37692 (4.3.41)

19) Bovenschen N et al., J Biol Chem. 2003:278:9370-9377 (4.3.42)

20) Bovenschen N et al., Blood 2005:106:906-912 (4.3.43)

21) Sarafanov AG et al., J Biol Chem. 2001:276:11970-11979 (4.3.44)

2.6.7.1 毒性試験： 一覧表

Test Article: BAY 94-9027 and BAY 1025662, the PEG-60-Maleimide-Cysteine component in BAY 94-9027

Overview of Toxicological Studies

Type of Study/ Treatment Duration	Species/ Strain	Method of Administration	Doses/ Concentrations [IU/kg]	GLP	Report Number	Location in CTD
			BAY 94-9027			
Single-Dose Toxicity						
Single dose[d]	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous	800, 4000 BAY 14-2222: 4000	Yes	A47966	4.2.3.1.1
Single dose[a]	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous	400, 4000 BAY 14-2222: 4000	Yes	PH-36203 PH-36203A	4.2.3.1.2
Repeat-Dose Toxicity						
2 weeks[d]	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous (every other day)	75, 750, 2250 BAY14-2222: 2250	Yes	A48103	4.2.3.2.1
2 weeks[d]	Rat, female, Sprague Dawley	Intravenous (every other day)	75, 750, 2250	Yes	PH-39043	4.2.3.2.2
2 weeks[a]	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous (every other day)	75, 750, 2250 BAY 14-2222: 2250	Yes	PH-36207 PH-36207A	4.2.3.2.3
Juvenile Toxicity						
16 days[a, e]	Rat, male Wistar	Intravenous (twice weekly, every third or fourth day)	200, 1000	Yes	PH-37672	4.2.3.5.4.1
Immunogenicity Studies						
5 weeks[b]	Antigenicity in Mice, male hemophilia A	Intravenous (weekly)	13, 52, 200 BAY14-2222: 52, 200	No	CB-2010-29	4.2.3.7.2.1

Test Article: BAY 94-9027 and BAY 1025662, the PEG-60-Maleimide-Cysteine component in BAY 94-9027

Overview of Toxicological Studies

Type of Study/ Treatment Duration	Species/ Strain	Method of Administration	Doses/ Concentrations [IU/kg]	GLP	Report Number	Location in CTD
In vitro complement activation[d]	human serum	In vitro	3, 30 IU/mL	No	PH-39028	4.2.3.7.2.2
In vitro tissue cross reactivity study[c]	human tissue	In vitro	0.2, 1.0 µg/mL BAY14-2222: 0.2, 1.0 µg/mL	Yes	R-9391	4.2.3.7.2.3

Type of Study/ Treatment Duration	Species/ Strain	Method of Administration	Doses/ Concentrations [mg/kg]	GLP	Report Number	Location in CTD
Other toxicity studies (Test Article: BAY 1025662, the PEG-60-Maleimide-Cysteine component in BAY 94-9027)						
Single dose toxicity[d]	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous	23, 70, 210	Yes	A48160	4.2.3.7.7.1
Single dose toxicity[d]	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous	2, 20	Yes	PH-38065	4.2.3.7.7.2
Repeat-Dose Toxicity 4 weeks[d]	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous (every second day)	0.045, 0.7, 11.0	Yes	A50211	4.2.3.7.7.3
Repeat-Dose Toxicity 4 weeks[a]	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous (twice weekly)	0.02, 0.2, 2.00	Yes	PH-38066	4.2.3.7.7.4
Salmonella/ microsome assay[d]	Salmonella strains	*In vitro*	0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mg/plate	Yes	A51161	4.2.3.7.7.5
Mouse Lymphoma Assay[d]	Mouse Lymphoma Cells	*In vitro*	0.15, 0.5, 1.5 and 5.0 mg/mL	Yes	A50973	4.2.3.7.7.6
Micronucleus test[d]	Rat, male, Sprague Dawley ; samples from study A50211	Intravenous	0.045, 0.7, and 11.0	Yes	A50211	4.2.3.7.7.3

Type of Study/ Treatment Duration	Species/ Strain	Method of Administration	Doses/ Concentrations [mg/kg]	GLP	Report Number	Location in CTD
Juvenile Toxicity 30 days[a]	Rat, male Wistar	Intravenous (twice weekly)	0.4, 2.0	Yes	PH-37891	4.2.3.7.7.7

[a] Study was performed at Department of Toxicology, Bayer HealthCare AG(currently Bayer AG), Wuppertal, Germany
[b] Study was performed at Department of Hematology Research, Bayer HealthCare, Richmond, CA 94801, USA
[c] Study was performed at [redacted],USA
[d] Study was performed at Department of Nonclinical Drug Safety, Bayer Schering Pharma AG(currently Bayer AG), Berlin, Germany
[e] 2 different age groups: one starting treatment at age 17 days, the other starting at age 32 days

na not applicable

2.6.7.2 トキシコキネティクス： トキシコキネティクス試験の一覧表

Test Article: BAY 94-9027 and BAY 1025662, the PEG 60 Maleimide Cysteine component in BAY 94-9027

Overview of Toxicokinetic Studies with BAY 94-9027

Type of Study/ Treatment Duration	Species/ Strain	Method of Administration	Doses/ Concentrations [IU/kg]	GLP	Report Number	Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity						
2 weeks	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous	75, 750, 2250 BAY-14-2222: 2250	Yes	A48103	4.2.3.2.1
2 weeks	Rat, female, Sprague Dawley	Intravenous	75, 750, 2250	Yes	PH-39043	4.2.3.2.2
2 weeks	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous	75, 750, 2250 BAY-14-2222: 2250	Yes	PH-36207 PH-36207A	4.2.3.2.3
Juvenile Toxicity						
16 days	Rat, male Wistar	Intravenous	200, 1000	Yes	PH-37672	4.2.3.5.4.1

Other toxicity studies (Test Article: BAY 1025662)

Type of Study/ Treatment Duration	Species/ Strain	Method of Administration	Doses/ Concentrations [mg/kg]	GLP	Report Number	Location in CTD
Single dose toxicity	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous	23, 70, 210	Yes	A48160	4.2.3.7.7.1
Single dose toxicity	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous	2, 20	Yes	PH-38065	4.2.3.7.7.2
Repeat-Dose Toxicity 4 weeks	Rat, male, Sprague Dawley	Intravenous	0.045, 0.7, 11.0	Yes	A50211	4.2.3.7.7.3
Repeat-Dose Toxicity 4 weeks	Rabbit, male, New Zealand White	Intravenous	0.02, 0.2, 2.00	Yes	PH-38066	4.2.3.7.7.4
Juvenile Toxicity	Rat, male Wistar	Intravenous	0.4, 2.0	Yes	PH 37891	4.2.3.7.7.7

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

BAY 94-9027 のトキシコキネティクス試験は、2 週間投与毒性試験（雄ラット、雌ラット及び雄ウサギ）において実施されており、成績は 2.6.6 に記載されている。また、以下の各試験の概要表にもまとめられている。

BAY 1025662(PEG-60-Mal-Cys)のトキシコキネティクス試験成績は、ラット及びウサギを用いた単回及び 4 週間投与毒性試験において実施されており、成績は2.6.6に記載されている。また、以下の各試験の概要表にもまとめられている。

2.6.7.4 毒性試験： 被験物質（ロット毎）一覧

Since BAY 94-9027 is a biological, no drug substance has been tested. BAY 94-9027 was formulated as drug product and tested in toxicology studies.

BAY 1025662 was prepared under GLP from PEG-60-maleimide, formulated with cysteine and 0.9% NaCl to quench the active maleimide with cysteine.

Lots of BAY 94-9027 used in toxicology studies

Type of study/study duration	Species, gender, and strain	Lot used	GLP	Location in CTD/ Report Number
Single-dose with 2-week recovery	Rat, male, Sprague Dawley	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[a]: 27N1XL1T	Yes	4.2.3.1.1 / A47966
	Rabbit, male, New Zealand White	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[a]: 27N1XL1T	Yes	4.2.3.1.2 / PH-36203
Repeated-dose 2-week dosing with 4-week recovery	Rat, male, Sprague Dawley	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[a]: 27N1XL1T	Yes	4.2.3.2.1 / A48103
	Rat, female, Sprague Dawley	270PW39	Yes	4.2.3.2.2 / PH-39043
	Rabbit, male, New Zealand White	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[a]: 27N1XL1T	Yes	4.2.3.2.3 /PH-36207
Juvenile study in rats	Rat, male, Wistar	27N38L0	Yes	4.2.3.5.4.1 / PH-37672
In vitro tissue cross-reactivity study (TCR)	Human tissue	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[a]: 27N1XL1T	Yes	4.2.3.7.2.3 / R-9391
Comparative antigenicity in Hem A mice	Hemophilia A mice, male	BAY 94-9027: 949027T070209 BAY 14-2222[a]: 27N1XL1T	No	4.2.3.7.2.1 / CB-2010-29
In vitro complement activation	Human serum	270R4GJ	No	4.2.3.7.2.2 / PH-39028

[a] BAY 14-2222 is Kogenate FS, full length unmodified rFVIII

Lots of BAY 1025662 used in toxicology studies

Type of study/study duration	Species, gender, and strain	Lot used	Location in CTD / Report Number	GLP
Single-dose with 2-week recovery	Rat, male, Sprague Dawley	Laboratory notebook, Bayer Berkeley, # 2009-076-97	4.2.3.7.7.1 / A48160	Yes
	Rabbit, male, New Zealand White	PGCS2012	4.2.3.7.7.2 / PH-38065	Yes
Repeated-dose 4-week dosing with 4-week recovery(rat)	Rat, male, Sprague Dawley	27-2008-176-01 (Laboratory notebook, Bayer, Berkeley)	4.2.3.7.7.3 / A50211	Yes
4-week dosing with 13-week recovery(rabbit)	Rabbit, male, New Zealand White	PGCS2012	4.2.3.7.7.4 / PH-38066	Yes
Genotoxicity: Ames Assay	Salmonella strains	27-2008-176-01 (Laboratory notebook, Bayer, Berkeley)	4.2.3.7.7.5 / A51161	Yes
Genotoxicity: Mouse Lymphoma Assay	Mouse Lymphoma cells	27-2008-176-01 (Laboratory notebook, Bayer, Berkeley)	4.2.3.7.7.6 / A50973	Yes
Genotoxicity: Micronucleus Assay in Rats	Rat, male, Sprague Dawley	27-2008-176-01 (Laboratory notebook, Bayer, Berkeley)	4.2.3.7.7.3 / A50211	Yes
Juvenile study in rats	Rat, male, Wistar	PGCS2012	4.2.3.7.7.7 / PH-37891	Yes

2.6.7.5 単回投与毒性試験

2.6.7.5.1 雄ラットにおける単回静脈内投与毒性試験

Report Title:	BAY 94-9027, BAY 14-2222. Comparative systemic toxicity study in male rats with single intravenous administration followed by an observation period of up to 2 weeks		
Report No.:	A47966		
Location in CTD:	4.2.3.1.1		
Test Article:	BAY 94-9027, BAY 14-2222		
Species/Strain:	Rat / HSD: Sprague Dawley SD	Study No.:	TOXT3080438
Initial age:	8 weeks	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	Single application	Date of 1st dose:	21 Sep. 2009
Duration of Postdose:	Up to 2 weeks`		
Method of Administration:	Intravenous		
Vehicle/Formulation:	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm polysorbate 80		
Special features:	-		
NOAEL	4000 IU/kg body weight (nominal dose)		

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rats

Extended Single Dose Toxicity Study –			**Test Article:** **BAY 94-9027** **BAY 14-2222**	**Report No.:** **A47966**
Dose [IU/kg] (nominal)	**0**	**4000**	**800**	**4000**
Gender	**Control** **M**	**BAY 14-2222** **M**	**BAY 94-9027** **M**	**BAY 94-9027** **M**
Number of Animals (+ recovery)	5 (+ 5)	5 (+ 5)	5 (+ 5)	5 (+ 5)
Noteworthy Findings				
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0	0
Body Weight (%[a])	-	-	-	-
Food Consumption (%[a])	-	-	-	-

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rats

Extended Single Dose Toxicity Study –			**Test Article:** **BAY 94-9027** **BAY 14-2222**	**Report No.:** **A47966**
Dose [IU/kg] (nominal)	**0**	**4000**	**800**	**4000**
Gender	**Control**	**BAY 14-2222**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**
	M	**M**	**M**	**M**
Water Consumption	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-
Organ Weights[a, b] (%)	-	-	-	-
Gross Pathology				
Number examined (+ recovery)	5 (+ 5)	5 (+ 5)	5 (+ 5)	5 (+ 5)
	-	-	-	-
Histopathology				
Number examined (+ recovery)	5 (+ 5)	5 (+ 5)	5 (+ 5)	5 (+ 5)
	-	-	-	-
Postdose Evaluation[c]				
Number Evaluated	5	5	5	5

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

a At end of dosing period. For controls, group means were used. For treated groups, percent differences from controls were used. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
b Evaluation was based on percent difference for the absolute organ weights
c Findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible

2.6.7.5.2 雄ウサギにおける単回静脈内投与毒性試験

Report Title:	Single Dose Systemic Toxicity Study in Male New Zealand White Rabbits (Single Intravenous Administration Followed by a 2-Weeks Recovery Period)		
Report No.:	PH-36203, PH-36203A		
Location in CTD:	4.2.3.1.2		
Test Article:	BAY 94-9027, BAY 14-2222		
Species/Strain:	Rabbit / New Zealand White (Crl:KBL(NZW)BR)	Study No.:	T1079870
Initial age:	127-134 days	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	Single administration	Date of 1st dose:	29 Sep. 2009
Duration of Postdose:	14 days		
Method of Administration:	Intravenous		
Excipients:	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm polysorbate 80		
Special features:	-		
NOAEL	4000 IU/kg body weight (nominal dose)		

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rabbits

Extended Single Dose Toxicity Study		**Test Article:**	**BAY 94-9027**	**Report No.:**	**PH-36203 PH-36203A**
Dose [IU/kg] (nominal)	**0**	**400**	**4000**		**4000**
Gender	**Control M**	**BAY 94-9027 M**	**BAY 94-9027 M**		**BAY 14-2222 M**
Number of Animals (+ recovery)	3 (+ 3)	3 (+ 3)	3 (+ 3)		3 (+ 3)
Noteworthy Findings					
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0		0
Body Weight (%[a])	-	-	-		-
Food Consumption (%[a])	-	-	-		-
Water Consumption	-	-	-		-

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rabbits

Extended Single Dose Toxicity Study		**Test Article:**	**BAY 94-9027**	**Report No.:**	**PH-36203 PH-36203A**
Dose [IU/kg] (nominal)	**0 Control**	**400 BAY 94-9027**	**4000 BAY 94-9027**		**4000 BAY 14-2222**
Gender	**M**	**M**	**M**		**M**
Clinical Observations	-	-	-		-
Hematology	-	-	-		-
Serum Chemistry	-	-	-		-
Organ Weights [a, b] (%)	-	-	-		-
Gross Pathology					
Number examined (+ recovery)	3 (+ 3)	3 (+ 3)	3 (+ 3)		3 (+ 3)
	-	-	-		-
Histopathology					
Number examined (+ recovery)	3 (+ 3)	3 (+ 3)	3 (+ 3)		3 (+ 3)
	-	-	-		-
Postdose Evaluation[c]					
Number Evaluated	3	3	3		3

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked

Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights

c Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible

2.6.7.6　反復投与毒性試験：　重要な試験以外の試験

No studies conducted

2.6.7.7 反復投与毒性試験： 重要な試験

2.6.7.7.1 雄ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験

Report Title:	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		
Report No.:	A48103		
Location in CTD:	4.2.3.2.1		
Test Article:	BAY 94-9027, BAY 14-2222		
Species/Strain:	Rat / HSD: Sprague Dawley SD	Study No.:	TOXT7081026
Initial age:	8 weeks	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	2 weeks (7 applications)	Date of 1st dose:	28 Sep. 2009
Duration of Postdose:	4 weeks		
Method of Administration:	Intravenous		
Vehicle/Formulation:	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm polysorbate 80		
Special features:	Central Nervous Function Test and Kidney Function Test were included		
NOAEL	2250 IU/kg body weight (nominal dose)		

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			**Test Article:**	**BAY 94-9027 BAY 14-2222**	**Report No.: A48103**
Dose [IU/kg] Every Other Day (nominal)	**0**	**2250**	**75**	**750**	**2250**
Gender	**Control M**	**BAY 14-2222 M**	**BAY 94-9027 M**	**BAY 94-9027 M**	**BAY 94-9027 M**
Number of Animals (+ recovery)	10 (+ 5)	10 (+ 5)	10	10	10 (+ 5)
Toxicokinetics					
Number of animals/time-point	3	3	3	3	3
AUC (0-24) [mIU·h/mL] Day 1		23667	14229	125657	348756
AUC (0-24) [mIU·h/mL] Day 13		n.c.	n.c.	167182	285078

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			**Test Article:**	**BAY 94-9027** **BAY 14-2222**	**Report No.: A48103**
Dose [IU/kg] Every Other Day (nominal)	**0**	**2250**	**75**	**750**	**2250**
	Control	**BAY 14-2222**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**
Gender	**M**	**M**	**M**	**M**	**M**
C_{max} [mIU/mL], Day 1		11447	1641	14443	34640
C_{max} [mIU/mL], Day 13		n.c.	851	19022	38417
Noteworthy Findings					
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a])	-	-	-	-	-
Food Consumption (%[a])	-	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-
Organ Weights[a, b] (%)	-	-	-	-	-
Gross Pathology					
Number examined (+ recovery)	10 (+ 5)	10 (+ 5)	10	10	10 (+ 5)
	-	-	-	-	-
Histopathology					
Number examined (+ recovery)	10 (+ 5)	10 (+ 5)	10	10	10 (+ 5)
	-	-	-	-	-
Immunogenicity					
Binding Antibodies for BAY 94-9027[d]	-	+++	+	++	+++
Neutralizing Antibodies for BAY 94-9027[d]	-	+++	-	+	+++

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			**Test Article:**	**BAY 94-9027** **BAY 14-2222**	**Report No.:** **A48103**
Dose [IU/kg] Every Other Day (nominal)	**0**	**2250**	**75**	**750**	**2250**
	Control	**BAY 14-2222**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**
Gender	**M**	**M**	**M**	**M**	**M**
Anti-PEG Antibodies	-	-	-	-	-
Additional Examinations					
Central Nervous Function Test	-	-	-	-	-
Kidney Function Test	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation[c]					
Number Evaluated	5	5	0	0	5

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. A Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights
c Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible
d Based on peak titers
n.c. not calculated

2.6.7.7.2 雌ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験

Report Title:	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		
Report No.:	PH-39043		
Location in CTD:	4.2.3.2.2		
Test Article:	BAY 94-9027		
Species/Strain:	Rat/ Sprague Dawley SD	Study No.:	T102086-7
Initial age:	9-10 weeks -	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	2 weeks (7 applications)	Date of 1st dose:	18 May 2015
Duration of Postdose:	4 weeks		
Method of Administration:	Intravenously (tail vein)		
Vehicle/Formulation:	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm polysorbate 80		
Special features:	-		
NOAEL	2250 IU/kg body weight (nominal dose)		

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study **Test Article: BAY 94-9027** **Report No.: PH-39043**

Dose [IU/kg] Every Other Day	**0**	**D1**	**D2**	**D3**
	Control	**75**	**750**	**2250**
Gender	**F**	**F**	**F**	**F**
Number of Animals(+ recovery)	10 (+5)	10	10	10(+5)
Toxicokinetics				
No. of Animals/Time Point	3	3	3	3
AUC (0-24) [IU.h/L] Day 1		35900	226000	1020000
AUC (0-24) [IU.h/L]Day 13		n.c.	56000	25200
C_{max} [IU/L] Day 1		6730	32800	92100
C_{max} [IU/L] Day 13		388	18700	17400

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study		Test Article: BAY 94-9027		Report No.: PH-39043
Dose [IU/kg] Every Other Day	**0**	**D1**	**D2**	**D3**
	Control	**75**	**750**	**2250**
Gender	**F**	**F**	**F**	**F**
Noteworthy Findings				
Died/Sacrificed Moribund	-	-	1[d]	-
Body Weight	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-
Organ Weights[a,b] (%)	-	-	-	-
Gross Pathology				
Number examined	10	10	10	10
	-	-	-	-
Histopathology				
Number examined	10	0	0	10
	-			-
Immunogenicity	-	-	-	-
Binding Antibodies BAY 94-9027[c]	-	+	++	+++
Neutralizing Antibodies to BAY 94-9027[c]	-	+	+	+++
Postdose Evaluation				
Number Evaluated	5	0	0	5
Died/Sacrificed moribund	-			1[d]

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study		Test Article: BAY 94-9027		Report No.: PH-39043
Dose [IU/kg] Every Other Day	**0**	**D1**	**D2**	**D3**
	Control	**75**	**750**	**2250**
Gender	**F**	**F**	**F**	**F**

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights
c Based on peak tilters
d Accidental death due to blood sampling procedure
n.c. not calculated

2.6.7.7.3 雄ウサギにおける2週間反復投与毒性試験

Report Title:	BAY 94-9027. Repeated Dose Systemic Toxicity Study in Male New Zealand White Rabbits (2-Weeks Intravenous Administration Followed by a 4-Weeks Recovery Period)		
Report No.:	PH-36207, PH-36207A		
Location in CTD:	4.2.3.2.3		
Test Article:	BAY 94-9027, BAY 14-2222		
Species/Strain:	Rabbit / New Zealand White (Crl:KBL(NZW)BR)	Study No.:	T2079871
Initial age:	94-150 days (main groups) 94-115 days (recovery groups)	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	Every other day for 2 weeks (7 doses)	Date of 1st dose:	03 Sep 2009
Duration of Postdose:	4 weeks		
Method of Administration:	Intravenous		
Vehicle/Formulation	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm polysorbate 80		
Special features:	-		
NOAEL	2250 IU/kg body weight (nominal dose)		

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			**Test Article:** **BAY 94-9027**	**Report No.:**	**PH-36207 PH-36207A**
Dose [IU/kg] Every Other Day (nominal) Gender	**0 Control M**	**75 BAY 94-9027 M**	**750 BAY 94-9027 M**	**2250 BAY 94-9027 M**	**2250 BAY 14-2222 M**
Number of Animals (+ recovery)	6 (+ 3)	6	6	6 (+ 3)	6 (+ 3)
Toxicokinetics					
Number of animals/time-point	3	3	3	3	3
AUC (0-48) [mIU·h/mL] Day 1		20847&	202247	865496	216286&
AUC (0-48) [mIU·h/mL] Day 13		n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
C_{max} [mIU/mL], Day 1		1304	10743	43535	45786
C_{max} [mIU/mL], Day 13		295	n.c.	n.c.	n.c.

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			**Test Article:** **BAY 94-9027**	**Report No.:**	**PH-36207** **PH-36207A**
Dose [IU/kg] Every Other Day (nominal)	**0**	**75**	**750**	**2250**	**2250**
	Control	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 14-2222**
Gender	**M**	**M**	**M**	**M**	**M**
Noteworthy Findings					
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0	0	0
Body Weight (%[a])	-	-	-	-	-
Food Consumption (%[a])	-	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-
Hematology					
Prolonged partial thromboplastin time[#]	-	-	+	+	+
Serum Chemistry	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-
Organ Weights[a, b] (%)	-	-	-	-	-
Spleen, absolute[#]	1.527 g	-5.17 %	+12.18 %	+15.78 %	+46.17 %*
Spleen, organ weight to body weight ratio[#]	0.0423 %	0.0397 %	0.0467 %	0.0450 %	0.0575 %
Gross Pathology					
Number examined (+ recovery)	6 (+ 3)	6	6	6 (+ 3)	6 (+ 3)
	-	-	-	-	-
Histopathology					
Number examined (+ recovery)	6 (+ 3)	6	6	6	6 (+ 3)
Spleen: Increased amount/size of germinal centers in white pulp follicles[#]	-	-	+	+	++
Liver: Increased incidence of	-	-	-	+	++

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			**Test Article:** **BAY 94-9027**	**Report No.:**	**PH-36207** **PH-36207A**
Dose [IU/kg] Every Other Day (nominal)	**0**	**75**	**750**	**2250**	**2250**
	Control	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 14-2222**
Gender	**M**	**M**	**M**	**M**	**M**
condensed cytoplasm of hepatocytes#					
Immunogenicity					
Binding Antibodies[d]	-	+	+	++	+++
Neutralizing Antibodies[d]	-	+	+	++	+++
Anti-PEG Antibodies	-	-	-	-	n.a.
Postdose Evaluation[c]					
Number Evaluate[d]	3	0	0	3	3
Hematology					
Prolonged partial thromboplastin time#	-	n.a.	n.a.	+	+
Histopathology					
Spleen: Increased amount/size of germinal centers in white pulp follicles#	-	n.a.	n.a.	-	+
Liver: Increased incidence of condensed cytoplasm of hepatocytes#	-	n.a.	n.a.	-	+
Immunogenicity					
Binding Antibodies[d]	-	n.a.	n.a.	++	+++
Neutralizing Antibodies[d]	-	n.a.	n.a.	++	+++
Anti-PEG Antibodies	-	n.a.	n.a.	-	n.a.

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Statistical analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$
Statistical methods: Organ weights: ANOVA and Dunnett's test
a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical

Repeat-Dose Toxicity - 2-Week Toxicity Study			Test Article: BAY 94-9027	Report No.:	PH-36207 PH-36207A
Dose [IU/kg] Every Other Day	**0**	**75**	**750**	**2250**	**2250**
(nominal)	**Control**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 94-9027**	**BAY 14-2222**
Gender	**M**	**M**	**M**	**M**	**M**

significance is based on actual data (not on the percent differences)

b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights

c Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible

d Based on peak titers

n.c. not calculated

n.a. not applicable

& extrapolated from 24 to 48 h

considered as not adverse (rabbits were form different batches of delivery)

2.6.7.8　In Vitro 遺伝毒性試験

No studies conducted with BAY 94-9027 (per ICHS6 R1)

2.6.7.9　In Vivo 遺伝毒性試験

No studies conducted with BAY 94-9027 (per ICHS6 R1)

2.6.7.10　がん原性試験

No studies conducted with BAY 94-9027

2.6.7.11　生殖発生毒性試験：　重要な試験以外の試験

No data available.

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

No studies conducted with BAY 94-9027 as the patient population is male. Male reproductive organs were evaluated in the repeated administration toxicology studies per ICH S6 R1.

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 conducted with BAY 94-9027 as the patient population is male.

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 conducted with BAY 94-9027 as the patient population is male.

2.6.7.15　局所刺激性試験

Local tolerance was assessed as part of the single and repeat dose GLP toxicity studies. See summary in Toxicology Written Summary (see 2.6.6).

2.6.7.16 その他の毒性試験

2.6.7.16.1 幼若動物を用いた試験

Juvenile Toxicity - Intravenous Administration Two Times per Week in Rats

Report Title:	Repeated Dose Toxicity Study in Neonatal Wistar Rats after Intravenous Administration Two Times per Week
Report No.:	PH-37672
Location in CTD:	4.2.3.5.4.1
Test Article:	BAY 94-9027

Species/Strain:	Rats/Strain HsdRCCHan:Wist	Study No.:	T100466-7
Initial age:	Pups: PND 17, Weanlings PND 32	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	16 days (up to Pups: PND 32, Weanlings PND 47) [administration twice weekly (every third and fourth day)]	Date of 1st dose:	05 Mar 2013
Duration of Postdose:	no post dose period		
Method of Administration:	Intravenous		
Vehicle/Formulation:	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1% sucrose, 2.2% glycine, 80 ppm polysorbates 80		
Special features:	Two age groups in study: Pups (PND 17~, Groups 1-3) and Wealings (PND 32~, Groups 4-6)		
NOAEL	1000 IU/kg		

Repeat-Dose Toxicity - (16-Day) Toxicity Study **Test Article: BAY 94-9027** **Report No.: PH-37672**

Dose [IU/kg] twice weekly	**Group 1 Control**	**Group 2 200**	**Group3 1000**	**Group 4 Control**	**Group 5 200**	**Group 6 1000**
		Pups			**Weanlings**	
Gender	**M**	**M**	**M**	M	M	M
Number of Animals	22	22	22	25	25	25
Exposure Control and Toxicokinetics [Groups 1-3 (pups): Study Day 8 (PND 24) and Study Day 15 (PND 31) Groups 4-6 (weanlings): Study Day 1 (PND 32) and Study Day 15 (PND 46)]						
No. of Animals/Time Point[c]	10(3)	10(3)	10(3)	10(3)	10(3)	10(3)
Rats with starting age of PND 32:						

Repeat-Dose Toxicity - (16-Day) Toxicity Study			**Test Article:**	**BAY 94-9027**	**Report No.:**	**PH-37672**
Dose [IU/kg] twice weekly	**Group 1 Control**	**Group 2 200 Pups**	**Group3 1000**	**Group 4 Control**	**Group 5 200 Weanlings**	**Group 6 1000**
Gender	**M**	**M**	**M**	M	M	M
Toxicokinetics – Start date PND 32 (1 st dose, Study Day 1)						
AUC (0-tlast) [IU·h/L]				-	25800	187000
AUC $(0\text{-tlast})_{norm}$ [kg·h/L]				-	129	187
t_{last} [h]				-	8.00	24.0
C_{max} [IU/L]				-	5210	18300
$C_{max,\ norm}$ [kg/L]				-	26.0	18.3
t_{max} [h]				-	1.00	4.00
$C(24)/C_{max}$ [%]				-	n.c.	7.1
Toxicokinetics – Exposure Control PND 46 (1h after 5 th dose, Study Day 15)						
C_{max} [IU/L]				-	3780	21600
$C_{max,\ norm}$ [kg/L]				-	18.9	21.6
RA-C_{max} [%]				-	72.6	119
Rats with starting age of PND 17:						
Toxicokinetics – Exposure Control PND 24, (1h after 3 rd dose, Study Day 8)						
C_{max} [IU/L]	-	3400	17700			
$C_{max,\ norm}$ [kg/L]	-	17.0	17.7			
Toxicokinetics – Exposure Control PND 31, (1h after 5 th dose, Study Day 15)						
C_{max} [IU/L]	-	3580	17500			
$C_{max,}$ norm [kg/L]	-	17.9	17.5			
RA-$C_{max}^{\#}$ [%]	-	105	98.9			
Noteworthy Findings						
Died/Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-
Body Weight (%[a])	116.3	+0.9	+3.8	191.9	-0.2	+0.3

Repeat-Dose Toxicity - (16-Day) Toxicity Study **Test Article: BAY 94-9027** **Report No.: PH-37672**

Dose [IU/kg] twice weekly	**Group 1 Control**	**Group 2 200 Pups**	**Group3 1000**	**Group 4 Control**	**Group 5 200 Weanlings**	**Group 6 1000**
Gender	**M**	**M**	**M**	M	M	M
Clinical Observations	-	-	-	-		
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-	-
Organ Weights[b](%)	-	-	-	-	-	-
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-
Number examined						
Histopathology						
Number examined	6	6	6	6	6	6
Organ	-	-	-	-	-	-
Finding	-	-	-	-	-	-
Antigenicity investigation						
Neutralizing antibody	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

- No noteworthy finding
n.d. not detected
a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)
b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights
c Figures in parenthesis indicate No. of animals per time point for Study Day 1(PND32)
Study day 15 compared to day 8 (5th dose to 3rd dose)

2.6.7.16.2 BAY 94-9027の比較免疫原性試験

Report Title:	Exploratory assessment of the antigenicity of BAY 94-9027 in hemophilia A mice following five weekly intravenous injections		
Report No.:	CB-2010-29		
Location in CTD:	4.2.3.7.2.1		
Test Article:	BAY 94-9027, BAY 14-2222		
Species/Strain:	Hemophilia A mouse (males)	Study No.:	PCD2009-013
Initial age:	6-8 weeks	GLP compliance:	No
Duration of Dosing:	5 weeks (once weekly)	Date of 1st dose:	30 Sep 2009
Duration of Postdose:	-		
Method of Administration:	intravenous		
Vehicle/Formulation:	20 mM histidine, 2.5 mM calcium chloride, 30 mM sodium chloride, 1 % sucrose, 2.2 % glycine, 80 ppm polysorbate 80		
Special features:	Endpoint: anti-drug antibodies		

Comparative antigenicity in Hem A mice

Repeat-Dose Antigenicity - 5-Week Study			**Test Article:** **BAY 94-9027** **BAY 14-2222**	**Report No.:**	**CB-2010-29**
Dose [IU/kg] weekly (nominal)	**52**	**200**	**13**	**52**	**200**
Gender	**BAY 14-2222** **M**	**BAY 14-2222** **M**	**BAY 94-9027** **M**	**BAY 94-9027** **M**	**BAY 94-9027** **M**
Number of Animals	12	12	12	12	12
Noteworthy Findings					
Died/Sacrificed Moribund	0	0	2	0	0
Body Weight	-	-	-	-	
Clinical Observations	1/12 injured tail	-	-	-	-
Immunogenicity					

Comparative antigenicity in Hem A mice

Repeat-Dose Antigenicity - 5-Week Study			**Test Article:**	**BAY 94-9027 BAY 14-2222**	**Report No.:**	**CB-2010-29**
Dose [IU/kg] weekly (nominal)	**52**	**200**	**13**	**52**		**200**
Gender	**BAY 14-2222 M**	**BAY 14-2222 M**	**BAY 94-9027 M**	**BAY 94-9027 M**		**BAY 94-9027 M**
Binding Antibodies[a]:						
Pre-dose	0/12	0/12	0/12	0/12		0/12
Day 21	4/12	11/12	1/12	1/12		5/12
Day 36	8/12	12/12	2/12	9/12		6/12
Neutralizing Antibodies[b]:						
Day 21	0/4	8/11	1/1	0/1		2/5
Day 36	6/8	12/12	1/2	3/9		4/6

- No noteworthy finding

a Number of animals with binding antibodies/total number of animals

b Number of animals with neutralizing antibodies/animal with binding antibodies

2.6.7.16.3 ヒト血清における in vitro 補体活性化

Test Article: BAY 94-9027
Report Title: Testing for complement activation in human serum in vitro

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration [IU/ml]	Gender (No. per Group)	Noteworthy findings	Location in CTD Report Number
In vitro complement activation	In vitro complement activation in human serum with BAY 94-9027	In vitro:	BAY 94-9027: 3 and 30 PEG-60-Mal-Cys: 75 and 750 ng/mL PEG12 and PEG108: 750 ng/mL	n.a.	No increase in C3a or sC5b-9	4.2.3.7.2.2 PH-39028

2.6.7.16.4 組織交差反応性試験

Test Article: BAY 94-9027
Report Title: Tissue cross-reactivity of BAY 94-9027 with selected human tissues in vitro

Study Type	Species/ Strain	Method of Administration	Concentration [IU/ml]	Gender (No. per Group)	Noteworthy findings	Location in CTD Report Number
In vitro tissue cross reactivity study	human tissue (cryosections)	In vitro:	BAY 94-9027, BAY 14-2222 at 0.2 µg/mL and 1.0 µg/mL	n.a.	BAY 94-9027 (PEGylated FVIII) and BAY 14-2222 had comparable binding to some endothelial cells of the heart and to very few endothelial cells in the kidney and the lung.	4.2.3.7.2.3 R-9391

2.6.7.16.5　その他の試験: PEG-60-Maleimide-Cysteine (BAY 1025662)の毒性試験

2.6.7.16.5.1 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cystein) : 雄ラットにおける単回投与毒性試験

Report Title:	BAY 1025662 (PEG-Maleimide-Cysteine) Systemic toxicity study in male rats with single intravenous administration followed by an observation period of 2 weeks
Report No.:	A48160
Location in CTD:	4.2.3.7.7.1
Test Article:	BAY 1025662

Species/Strain:	Rat / HSD: Sprague Dawley SD	Study No.:	TOXT4081032
Initial age:	8 weeks	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	Single application	Date of 1st dose:	21 Oct 2009
Duration of Postdose:	2 weeks		
Method of Administration:	intravenous injection		
Vehicle/Formulation:	Sodium Chloride Solution 0.9% w/v		
Special features:	-		
NOAEL	210 mg/kg		

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rats

Extended Single-Dose Toxicity Study		**Test Article:**	**BAY 1025662**	**Report No.:**	**A48160**
Dose [mg/kg]	**0**	**23**	**70**	**210**	
Gender	**Control M**	**M**	**M**	**M**	
Number of Animals (+ recovery)	10 (+ 5)	10 (+ 5)	10 (+ 5)	10 (+ 5)	
Toxicokinetics					
Number of animals/time-point	3	3	3	3	
AUC (0-168) [mg·h/L]	-	25699	70827	201817	
C_{max} [mg/L], Day 1	-	615	1940	4838	

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rats

Extended Single-Dose Toxicity Study		**Test Article:**	**BAY 1025662**	**Report No.:**	**A48160**
Dose [mg/kg]	**0**	**23**	**70**		**210**
	Control				
Gender	**M**	**M**	**M**		**M**
Noteworthy Findings					
Died/Sacrificed Moribund	0	0	0		0
Body Weight (%[a])	-	-	-		-
Food Consumption, Day 1-3 (%[a,d])	25.5	- 7.8	- 12.2 **		- 11.4 *
Water Consumption, Day 1-3 (%[a])	39.2	- 0.5	- 7.7		- 14.3
Clinical Observations	-	-	-		-
Hematology	-	-	-		-
Serum Chemistry	-	-	-		-
Urinalysis	-	-	-		-
Organ Weights[a, b] (%)	-	-	-		-
Gross Pathology					
Number examined	10	10	10		10
	-	-	-		-
Histopathology					
Number examined	10	10	10		10
Spleen, higher blood content[e]	+ (n = 2)	-	-		+ (n = 9)
Postdose Evaluation[c]					
Number Evaluated	5	5	5		5

Extended Single-Dose Toxicity Study in Rats

Extended Single-Dose Toxicity Study		**Test Article:**	**BAY 1025662**	**Report No.:**	**A48160**
Dose [mg/kg]	**0**	**23**	**70**		**210**
Gender	**Control M**	**M**	**M**		**M**

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked

Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01

a For controls, group means are shown (mean from day 1 to 3 for food and water consumptions).. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights

c Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible

d Dunnett Test

e the higher incidence at the high dose is probably a chance finding, however, it cannot be ruled out that the compound may influence the degree of exsanguination under the conditions of the study

2.6.7.16.5.2 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) : 雄ウサギにおける単回投与毒性試験

Report Title:	Systemic toxicity study in rabbits (M) after single intravenous administration followed by a 2 week observation period
Report No.:	PH-38065
Location in CTD:	4.2.3.7.7.2
Test Article:	BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cystein)

Species/Strain:	Rabbits/ New Zealand White (NZW)/Charles River France	Study No.:	T100526-4
Initial age:	5-6 months	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	1 day (single administration)	Date of 1st dose:	15 Apr 2013
Duration of Postdose:	2 weeks		
Method of Administration:	intravenously (lateral ear vein)		
Vehicle/Formulation:	0.9 % NaCl solution		
Special features:	-		
NOAEL	20 mg/kg		

Single-Dose Toxicity **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: PH-38065**

Dose [mg/kg]	**0**	**D1**	**D2**
	Control	**2**	**20**
Gender	**M**	**M**	**M**
Number of Animals	3	3	3
No. of Animals/Time Point	3	3	3
AUC (0-336) [mg*h/L]		6010	73600
C_{max} [mg/L]		68.4	622

Single-Dose Toxicity	**Test Article:**	**BAY 1025662**	**Report No.:**	**PH-38065**
Dose [mg/kg]	**0**	**D1**		**D2**
	Control	**2**		**20**
Gender	**M**	**M**		**M**
Noteworthy Findings				
Died/Sacrificed Moribund	-	-		-
Body Weight	-	-		-
Food Consumption	-	-		-
Clinical Observations	-	-		-
Hematology	-	-		-
Serum Chemistry	-	-		-
Organ Weights	-	-		-
Gross Pathology				
Number examined	3	3		3
	-	-		-
Histopathology				
Number examined	3	3		3
	-	-		-

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Necropsy at Study Day 15

2.6.7.16.5.3 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine): 雄ラットにおける 4 週間投与毒性試験

Report Title:	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
Report No.:	A50211
Location in CTD:	4.2.3.7.7.3
Test Article:	BAY 1025662

Species/Strain:	rat, HSD: Sprague Dawley SD	Study No.:	TOXT2081111
Initial age:	approximately 8 weeks	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	every second day from day 1 to day 27 (14 doses)	Date of 1st dose:	13/14 Jul 2010
Duration of Postdose:	29 days		
Method of Administration:	intravenous injection		
Vehicle/Formulation:	0.08 mg Tween 80, 2.92 mg NaCl, 0.37 mg CaCl2x2H2O ad 1 mL sterile water for injection		
Special features:	-		
NOAEL	11.0 mg/kg		

Repeat-Dose Toxicity - 4-Week Toxicity Study **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: A50211**

Dose [mg/kg] **Every other day** **Gender**	**0** **0.9%NaCl Control** **M**	**0** **Vehicle Control** **M**	**D1** **0.045** **M**	**D2** **0.7** **M**	**D3** **11.0** **M**
Number of Animals(+ recovery)	12(+ 6)	12(+ 6)	12(+ 6)	12(+ 6)	12(+ 6)
Toxicokinetics (Day 27)					
No. of Animals/Time Point	3	3	3	3	3
AUC (0-48) [mg *h/L]			149	1585	19145
$AUC\ (0\text{-}48)_{norm}$ [kg *h/L]			3302	2265	1740
C_{max} [mg/L]			5.84	63.9	884
$C_{max,\ norm}$ [kg/L]			130	91.3	80.4

Repeat-Dose Toxicity - 4-Week Toxicity Study **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: A50211**

Dose [mg/kg] **Every other day** **Gender**	**0** **0.9%NaCl Control** **M**	**0** **Vehicle Control** **M**	**D1** **0.045** **M**	**D2** **0.7** **M**	**D3** **11.0** **M**
C (48)/C_{max} [%]			50.8	50.1	41.4
t_{max} [h]			0.500	0.0833	0.500
R_AC_{max} [%]			519	247	273
R_AAUC [%]			556	316	295
Noteworthy Findings					
Died/Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-	-
Water Consumption	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-	-
Gross Pathology					
Number examined	10	10	10	10	10
Findings	-	-	-	-	-
Histopathology					
Number examined	10	10	n.a.	n.a	10
Findings	-	-	-	-	-
Additional Examinations	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation					
Number Evaluated	6	6	6	6	6
Findings	-	-	-	-	-

Repeat-Dose Toxicity - 4-Week Toxicity Study **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: A50211**

Dose [mg/kg]	0	0	D1	D2	D3
Every other day	0.9%NaCl Control	Vehicle Control	0.045	0.7	11.0
Gender	M	M	M	M	M

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01
n.a. not applicable

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights

c Noteworthy findings during the treatment period, which were not listed under 'Postdose Evaluation' were fully reversible

2.6.7.16.5.4 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) : 雄ウサギにおける 4 週間投与毒性試験

Report Title:	BAY 1025662: Systemic toxicity study in male rabbits after twice weekly intravenous administration over approximately 4 weeks followed by a 13 week recovery period
Report No.:	PH-38066
Location in CTD:	4.2.3.7.7.4
Test Article:	BAY 1025662 (PEG-60-Maleimid-Cystein)

Species/Strain:	Rabbits/ New Zealand White (NZW)/Charles River, France	Study No.:	T100942-6
Initial age:	3-6 month	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	Twice weekly for 25 days (8 applications)	Date of 1st dose:	30 Sep 2013
Duration of Postdose:	93 days		
Method of Administration:	intravenously (lateral ear vein)		
Vehicle/Formulation:	0.9 % NaCl solution (sterile)		
Special features:	-		
NOAEL	2.0 mg/kg		

Repeat-Dose Toxicity - 4-Week Toxicity Study **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: PH-38066**

Dose [mg/kg] **Twice weekly** **Gender**	**0** **Control** **M**	**D1** **0.02** **M**	**D2** **0.20** **M**	**D3** **2.0** **M**
Number of Animals(+ recovery)	6(+ 3)	6	6(+ 3)	6(+ 3)
Toxicokinetics (Day 25)				
No. of Animals/Time Point		4	4	4
AUC (0-72) [mg *h/L]		38.5 (AUC 0-24)	692	6130
C_{max} [mg/L]		2.13	15.3	133

Repeat-Dose Toxicity - 4-Week Toxicity Study		Test Article: BAY 1025662		Report No.: PH-38066
Dose [mg/kg] **Twice weekly** **Gender**	**0** **Control** **M**	**D1** **0.02** **M**	**D2** **0.20** **M**	**D3** **2.0** **M**
Noteworthy Findings				
Died/Sacrificed Moribund	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-
Food Consumption	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	
Ophthalmoscopy	-	-	-	-
Hematology	-	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-	-
Urinalysis	-	-	-	-
Organ Weights	-	-	-	-
Gross Pathology				
Number examined	6	6	6	6
	-	-	-	-
Histopathology				
Number examined	6			6
	-			-
Postdose Evaluation				
Number Evaluated	3	0	3	3

- No noteworthy finding + Mild ++ Moderate +++ Marked
Statistical analysis: * p < 0.05, ** p < 0.01

2.6.7.16.5.5 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine): 細菌を用いる復帰突然変異試験

Report Title:	Evaluation of BAY 1025662 in a bacterial reverse mutation study using Salmonella typhimurium (Ames-Test)
Report No.:	A51161
Location in CTD:	4.2.3.7.7.6
Test Article:	BAY 1025662

Test for Induction of:	Point mutations	Study No.:	TOXT1081570
Strains:	S. typhimurium: TA 1535, TA 1537, TA 98, TA100, TA 102	GLP Compliance:	Yes
No. of Independent Assays:	2	Date of Treatment:	Sep 2010
No. of Replicate Cultures:	3		
No. of Cells Analyzed/Culture:	$> 10^8$		
Metabolizing System:	Aroclor 1254-induced male rat liver S9, 10% (Plate incorporation) or 30% (Pre-incubation)		
Vehicle for Test compound:	Buffer solution		
Vehicle for Positive Controls:	Phosphate buffer or Dimethyl sulfoxide (DMSO)		
Treatment:	Plate incorporation and Pre-incubation		
Cytotoxic Effects:	None		
Genotoxic Effects	None		

Genotoxicity in vitro - Salmonella microsome assay **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: A51161**

Without Activation	Test Article	Concentration [µg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	TA 102
Plate Incorporation	Buffer solution	150 µL	16	124	8	17	208
	0.9 % NaCl	150 µL	17	129	8	17	238
	BAY 1025662	100	17	135	8	15	219
	BAY 1025662	250	18	132	6	15	272
	BAY 1025662	500	15	133	8	15	193
	BAY 1025662	1000	15	131	7	17	226
	BAY 1025662	2500	14	143	6	15	232
	BAY 1025662	5000	17	138	6	13	257
	Na-azide	5	528	642	-	-	-
	2NF	10	-	-	-	669	-
	4-NPDA	10	-	-	71	-	-
	MMC	0.2	-	-	-	-	497

Without Activation	Test Article	Concentration [µg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	TA 102
Pre-Incubation	Buffer solution	150 µL	15	139	9	17	196
	0.9 % NaCl	150 µL	15	130	9	17	205
	BAY 1025662	100	15	134	10	16	169
	BAY 1025662	250	14	141	8	16	208
	BAY 1025662	500	11	129	10	16	212
	BAY 1025662	1000	13	142	10	17	184
	BAY 1025662	2500	15	136	10	16	210
	BAY 1025662	5000	14	134	10	16	198
	Na-azide	5	1021	1043	-	-	-
	2NF	10	-	-	-	559	-
	4-NPDA	10	-	-	87	-	-
	Cumene	50	-	-	-	-	456
	MMC	0.2	-	-	-	-	786

Genotoxicity in vitro - Salmonella microsome assay **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: A51161**

With Activation	Test Article	Concentration [µg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	TA 102
Plate Incorporation	Buffer solution	150 µL	14	126	12	36	228
	0.9 % NaCl	150 µL	14	119	10	36	249
	BAY 1025662	100	16	125	13	38	262
	BAY 1025662	250	14	115	12	34	276
	BAY 1025662	500	16	134	13	39	218
	BAY 1025662	1000	16	119	11	38	247
	BAY 1025662	2500	13	119	11	36	222
	BAY 1025662	5000	14	140	10	37	287
	2AA	2.5	163	1123	88	811	-
	2AA	10	-	-	-	-	1075
	BP	2.5	-	495	-	279	-
	CP	400	442	-	-	-	-

With Activation	Test Article	Concentration [µg/plate]	Revertant Colony Counts (Mean Values) TA 1535	TA 100	TA 1537	TA 98	TA 102
Pre-Incubation	Buffer solution	150 µL	17	129	19	38	245
	0.9 % NaCl	150 µL	17	132	17	40	261
	BAY 1025662	100	18	130	19	36	261
	BAY 1025662	250	14	138	17	36	237
	BAY 1025662	500	13	130	19	34	258
	BAY 1025662	1000	16	132	18	42	227
	BAY 1025662	2500	16	137	16	32	229
	BAY 1025662	5000	16	133	15	40	233
	2AA	2.5	106	448	-	467	-
	2AA	5	-	-	114	-	-
	2AA	10	-	-	-	-	745
	BP	2.5	-	-	-	103	-
	CP	400	1483	-	-	-	-
	DMNA	5 µL	-	2277	-	-	-

2.6.7.16.5.6 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) : マウスリンフォーマ TK 試験

Report Title:	Forward cell mutation assay with BAY 1025662 (PEG-Maleimide-Cycteine) at the thymidine kinase locus ($TK^{+/-}$) in mouse lymphoma L5178Y cells
Report No.	A50973
Location in CTD:	4.2.3.7.7.6
Test Article:	BAY 1025662

Test for Induction of:	Gene mutations and chromosome aberrations	GLP Compliance:	Yes
Cells:	Mouse lymphoma L5178Y	Date of Treatment:	Sep 2010
Metabolizing System:	Aroclor 1254-induced male rat liver S9	Study No.:	TOXT2081120
No. of Independent Assays:	2		
No. of Replicate Cultures:	2		
No. of Cells Analyzed/Culture:	Totally approx. 8 x 10^5 cells (in four replicates)		
Vehicles	For Test Article: Buffer solution; For Positive Controls: Nutrient medium		
Treatment:	Assay 1: Pulse treatment for 3 hours without or with S9 mix Assay 2: Continuous treatment for 24 hours without S9 mix; Pulse treatment for 3 hours with S9 mix		
Cytotoxic Effects:	None		
Genotoxic Effects:	None		

Genotoxicity in vitro - Mouse lymphoma assay		Test Article:	BAY 1025662	Report No.:	A50973
Metabolic Activation	**Test article**	**Treatment period**	**Concentration (µg/mL)**	**Relative total growth [a] (%)**	**Mutant colonies per 10^6 cells[a]**
Assay 1	Medium[1]	3 hours	-	100	88
Without S9 mix	Buffer Solution[2]		15 % (v/v)	100	97
	0.9 % NaCl[3]		15 % (v/v)	100	92
	BAY 1025662		150	104	88
	BAY 1025662		500	100	94
	BAY 1025662		1500	98	87
	BAY 1025662		5000	110	100
	Mitomycin C		0.1	47	902
With S9 mix	Medium[1]	3 hours	-	100	107
	Buffer Solution[2]		15 % (v/v)	100	114
	0.9 % NaCl[3]		15 % (v/v)	100	103
	BAY 1025662		150	91	101
	BAY 1025662		500	92	113
	BAY 1025662		1500	88	117
	BAY 1025662		5000	104	129
	Cyclophosphamide		3	51	1559

[a] Mean value of 2 replicate cultures
[1] Solvent control positive controls
[2] Solvent control test article (150, 500 and 1500 µg/mL)
[3] Solvent control test article (5000 µg/mL)

Genotoxicity in vitro - Mouse lymphoma assay **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: A50973**

Metabolic Activation	Test article	Treatment period	Concentration (µg/mL)	Relative total growth [a] (%)	Mutant colonies per 10^6 cells[a]
Assay 2	Medium[1]	24 hours	-	100	71
Without S9 mix	Buffer Solution[2]		15 % (v/v)	100	84
	0.9 % NaCl[3]		15 % (v/v)	100	78
	BAY 1025662		150	108	66
	BAY 1025662		500	97	79
	BAY 1025662		1500	116	63
	BAY 1025662		5000	105	73
	Mitomycin C		0.05	12	2007
With S9 mix	Medium[1]	3 hours	-	100	89
	Buffer Solution[2]		15 % (v/v)	100	70
	0.9 % NaCl[3]		15 % (v/v)	100	88
	BAY 1025662		150	92	77
	BAY 1025662		500	92	95
	BAY 1025662		1500	92	81
	BAY 1025662		5000	90	104
	Cyclophosphamide		3	44	1152

[a] Mean value of 2 replicate cultures
[1] Solvent control positive controls
[2] Solvent control test item (150, 500 and 1500 µg/mL)
[3] Solvent control test item (5000 µg/mL)

2.6.7.16.5.7 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) :ラット小核試験

Report Title : (partial report)	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 Results of Peripheral blood micronucleus test
Report No:	A50211
Location in CTD:	4.2.3.7.7.3
Test Article:	BAY 1025662

Test for Induction of:	Micronuclei in peripheral blood	Study No.:	TOXT2081111
Treatment schedule:	every second day from day 1 to day 27 (14 doses)	GLP Compliance:	Yes
Species/Strain/Sex:	Rat/ HSD: Sprague Dawley SDmale	Date of Dosing:	13/14 Jul 2010 (start)
Initial age:	approximately 8 weeks		
Method of Administration:	intravenous		
Sampling time:	Study day 24		
Cells Evaluated:	Reticulocytes		
No of Cells Analyzed /Animal:	20.000		
Vehicle/Formulation:	0.08 mg Tween 80, 2.92 mg NaCl, 0.37 mg CaCl2x2H2O ad 1 mL sterile water for injection		
Toxic/Cytotoxic Effects	Symptoms and mortality see main report		
Results	There were no biologically relevant or a statistically significant increase of MN in either reticulocytes (RET) or normochromatic erythrocytes (NCE)		

Genotoxicity in vivo - Micronucleus Test **Test Article:** **BAY 1025662** **Report No.:** **A50211**

Test Article	Dose [mg/kg]	Number of Evaluated RET	Evaluated Study Day	SEX	RET [%]			MN-RET [%]			MN-NCE [%]		
					Mean		SD	Mean		SD	Mean		SD
0.9% NaCl	0	≥20000	24	male	1.36	±	0.22	0.08	±	0.04	0.01	±	0.01
Vehicle	0	≥20000	24	male	1.52	±	0.15	0.04	±	0.02	0.00	±	0.01
BAY 1025662	0.045	≥20000	24	male	1.52	±	0.28	0.07	±	0.01	0.01	±	0.00
BAY 1025662	0.7	≥20000	24	male	1.56	±	0.44	0.05	±	0.02	0.00	±	0.01
BAY 1025662	11.0	≥20000	24	male	1.59	±	0.26	0.05	±	0.02	0.00	±	0.01

*	statistically significant
RET	reticulocytes
MN-RET	micronucleated reticulocytes
NCE	normochromatic erythrocytes
MN-NCE	micronucleared erythrocytes
Mean	mean value
SD	standard deviation

2.6.7.16.5.8 BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine) : 幼若ラットにおける 4 週間反復投与毒性試験

Report Title:	Repeated Dose Toxicity Study in Neonatal Wistar Rats after Intravenous Administration Two Times per Week for 30 Days
Report No.:	PH-37891
Location in CTD:	4.2.3.7.7.7
Test Article:	BAY 1025662 (PEG-60-Maleimide-Cysteine)

Species/Strain:	Rats/Strain HsdRCCHan:Wist	Study No.:	T100467-8
Initial age:	PND 17 -	GLP compliance:	Yes
Duration of Dosing:	30 days (administration twice weekly, every third and fourth day)	Date of 1st dose:	28 May2013
Duration of Postdose:	n.p.		
Method of Administration:	Intravenous		
Vehicle/Formulation:	0.9% NaCl solution		
Special features:	n.p.		
NOAEL	2.0 mg/kg		

Repeat-Dose Toxicity (Juvenile Toxicity) – 30 Days Toxicity Study **Test Article: BAY 1025662** **Report No.: PH-37891**

Dose [mg/kg] Twice weekly Gender	**0 Control M**	**D1 0.4 M**	**D2 2.0 M**
Number of Animals	10	10	10
Toxicokinetics [Dosing Day 22 (post-natal Day 38)]			
No. of Animals/Time Point	3	3	3
AUC (0-144) [mg·h/L]	-	767	3810
AUC $(0\text{-}144)_{norm}$ [kg·h/L]	-	1920	1900
AUC (0-72)* [mg·h/L]	-	497	2510
C_{max} [mg/L]	-	12.1	57.0
$C_{max,\,norm}$ [kg/L]	-	30.3	28.5
t_{max} [h]	-	0.500	0.500

$C(144)/C_{max}$ [%]	-	23.9	24.3
Noteworthy Findings			
Died/Sacrificed Moribund	-	-	-
Body Weight (%[a])	210.8	-0.6	-4.9
Clinical Observations	-	-	-
Hematology	-	-	-
Serum Chemistry	-	-	-
Organ Weights [b](%)	-	-	-
Gross Pathology			
Number examined	10	10	10
Histopathology			
Number examined	10	10	10
Organ	-	-	-
Finding	-	-	-

- No noteworthy finding

* Concentrations at 72h for calculation of AUC(0-72) estimated by interpolation

a At end of dosing period. For controls, group means are shown. For treated groups, percent differences from controls are shown. Statistical significance is based on actual data (not on the percent differences)

b Both absolute and relative weights differed from controls in the direction indicated. Number indicate percent difference for the absolute organ weights