イスパロクト静注用 500/1000/1500/2000/3000
（ツロクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え））に関する資料

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はノボ ノルディスク ファーマ株式会社に
帰属するものであり、当該情報を適正使用以外の営利目的に利用することはできません。

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

ツロクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え）

2.4 非臨床試験の概括評価

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 4
表目次 4
略語一覧 6
2.4.1 非臨床試験計画概要 10
2.4.1.1 分子 10
2.4.1.2 臨床適応 11
2.4.1.3 臨床製剤処方 12
2.4.1.4 非臨床試験プログラム 12
2.4.1.5 規制当局との協議 13
2.4.2 薬理試験 13
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 14
2.4.2.1.1 *In vitro* 薬理試験 15
2.4.2.1.1.1 von Willebrand 因子への結合 15
2.4.2.1.1.2 N8-GP の補因子活性・活性化速度及び不活化速度の特性解析 15
2.4.2.1.1.3 トロンビン生成能の特性解析 16
2.4.2.1.1.4 トロンボエラストグラフィー法による用量反応関係の特性解析 17
2.4.2.1.1.5 *In vitro* 特性の結論 19
2.4.2.1.2 *In vivo* 薬理試験 19
2.4.2.2 副次的薬理作用 21
2.4.2.2.1 非臨床安全性評価に適格性が確認されている動物種 21
2.4.2.2.2 [redacted] 実生産工程への変更を支持するための N8-GP の VWF 結合能の検討 21
2.4.2.2.3 血友病 A 血漿中における N8-GP の *in vitro* 安定性 21
2.4.2.2.4 クリアランス受容体との結合 21
2.4.2.3 安全性薬理試験 22
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用 22
2.4.3 薬物動態試験 22
2.4.3.1 分析法 22
2.4.3.2 吸収 24
2.4.3.2.1 単回投与 PK 24
2.4.3.2.2 反復投与 PK 26
2.4.3.3 重要な非臨床安全性試験と臨床試験結果の PK の種間比較 29

2.4.3.4 分布、代謝及び排泄 30
2.4.3.4.1 分布 31
2.4.3.4.2 代謝 32
2.4.3.4.3 排泄 32
2.4.3.5 薬物相互作用 33
2.4.3.6 その他の薬物動態試験 33
2.4.4 毒性試験 34
2.4.4.1 毒性試験の概要 34
2.4.4.2 単回投与毒性 35
2.4.4.3 反復投与毒性 35
2.4.4.4 局所刺激性 37
2.4.4.5 遺伝毒性 37
2.4.4.5.1 2種類の遺伝毒性不純物の評価 37
2.4.4.6 がん原性 37
2.4.4.6.1 血液凝固第 VIII 因子 38
2.4.4.6.2 ポリエチレングリコール（PEG） 38
2.4.4.6.3 N8-GP－反復投与毒性試験 38
2.4.4.6.4 文献検索 41
2.4.4.7 生殖発生毒性 41
2.4.4.7.1 幼若動物を用いた試験 41
2.4.4.8 その他の毒性試験 42
2.4.4.8.1 製造工程の最適化を裏付ける非臨床試験 42
2.4.4.9 重要な非臨床試験に用いた原材料及び規格限度値の比較 43
2.4.5 PEG 安全性 47
2.4.6 総合的考察及び結論 50
2.4.6.1 概要 50
2.4.6.2 総括 51
参考文献 52

図目次

ページ

図 2.4-1 活性化前後の N8-GP の概略 10
図 2.4-2 FXIa による誘発時の血友病 A 血漿における N8 及び N8-GP のトロンビン生成量 17
図 2.4-3 F8-KO マウスの全血に対するトロンボエラストグラフィー法（ROTEM®）を用いたアドベイト®及び N8-GP の比較 18
図 2.4-4 尾静脈切断後の N8-GP 及び N8 における総出血時間及び総出血量の用量反応曲線 19
図 2.4-5 F8-KO マウスを用いた尾静脈切断出血モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®（200 IU/kg）の効果持続時間 20
図 2.4-6 F8-KO マウスを用いた膝関節出血モデルにおける N8-GP の効果 20
図 2.4-7 血友病 A イヌにおける N8-GP 及び N8 の PK プロファイル比較 24
図 2.4-8 F8-KO マウスに用量範囲 35～280 IU/kg で N8-GP を静脈内投与した場合の用量比例性 26
図 2.4-9 中和抗薬物抗体によるサルの経時的曝露減少 27
図 2.4-10 Rowett ヌードラットを用いた 52 週間長期毒性試験における曝露 28
図 2.4-11 N8-GP におけるクリアランス（mL/h）及び分布容積のアロメトリックスケーリング 29
図 2.4-12 分布及び排泄試験に用いた[^{3}H]-N8-GP 放射能標識トレーサー 30
図 2.4-13 選択した組織及び時点における PEG 濃度の時間推移 31
図 2.4-14 工程の最適化前（[redacted]実生産工程）及び最適化後（[redacted] 実生産工程）における N8-GP 原薬を F8-KO マウスに静脈内投与後の FVIII 活性の経時変化 43

表目次

ページ

表 2.4-1 IU 及び対応する投与量（μg 又は pmol） 11
表 2.4-2 N8-GP の市販用製剤に使用された添加物 12
表 2.4-3 薬理試験の概要 14
表 2.4-4 補因子活性、活性化速度及び不活性化速度に関する *in vitro* 特性解析 16
表 2.4-5 薬物動態試験の概要 22
表 2.4-6 生体試料中薬物濃度測定法及び抗薬物抗体測定法の概要 23
表 2.4-7 125～280 IU/kg の用量範囲における rFVIII 製剤（N8 又は ReFacto®）及び N8-GP の単回静脈内投与時の推定平均 PK パラメータ 25
表 2.4-8 Wistar 系ラット及びカニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ 27

表 2.4-9　Rowett ヌードラットを用いた 26 及び 52 週間反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ 28
表 2.4-10　非臨床毒性試験（雄性動物）における曝露と成人／青年患者を対象とした第 3 相臨床試験における単回投与曝露とのデータ比較 29
表 2.4-11　分布及び排泄試験と臨床試験で用いた用量比 30
表 2.4-12　PEG 部分を放射能標識した N8-GP を単回静脈内投与後の推定排泄回収率 32
表 2.4-13　毒性試験の概要 34
表 2.4-14　非臨床投与量と小児及び成人への臨床投与量の比較 36
表 2.4-15　Rowett ヌードラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験で認められた腫瘍 39
表 2.4-16　Rowett ヌードラットを用いた 52 週間反復投与毒性試験で認められた腫瘍 40
表 2.4-17　反復投与毒性試験に用いた動物種の年齢及びヒト相当年齢 42
表 2.4-18　重要な毒性試験（GLP 適用）及び製造工程の変更を支持する試験において用いた非臨床試験ロットの概要 44
表 2.4-19　重要な非臨床試験ロットにおける原薬の許容基準及び含量 45
表 2.4-20　重要な非臨床試験ロットにおける目的物質関連不純物、申請有効期間内規格案及び含量 46
表 2.4-21　N8-GP 及び承認済み PEG 化生物製剤における 1 週間あたりの推定 PEG 用量 48

略語一覧

^{125}I	:	iodine-125（^{125}ヨード）
^{3}H	:	tritium/hydrogen-3（トリチウム/水素-3）
40 kDa PEG	:	40 kilodalton methoxypolyethylene glycol polymer（40 キロダルトンメトキシポリエチレングリコールポリマー）
40 kDa PEGylated FIX	:	nonacog beta pegol（ノナコグ ベータ ペゴル）
40K	:	40 kilodalton（40 キロダルトン）
ADME	:	absorption, distribution, metabolism and excretion（吸収、分布、代謝、排泄）
AMD	:	age-related macular degeneration（加齢黄斑変性）
ANOVA	:	analysis of variance（分散分析）
APC	:	activated protein C（活性化プロテイン C）
APTT	:	activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AS	:	ankylosing spondylitis（強直性脊椎炎）
AUC	:	area under the curve（曲線下面積）
$AUC_{0\text{-}24h}$	:	area under the curve from time zero to 24 h（投与開始時から投与後 24 時間の AUC）
$AUC_{0\text{-}72h}$	:	area under the curve from time zero to 72 h（投与開始時から投与後 72 時間の AUC）
BLA	:	biologics license application（生物学的製剤承認申請）
C57Bl/6	:	C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice（C57 ブラック、バックグラウンド系統として遺伝子改変マウスの作製に広く使用される一般的な近交系実験用マウス）
CD	:	Crohn’s disease（クローン病）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human Use（ヒト用医薬品委員会）
CHO	:	Chinese hamster ovary cells（チャイニーズハムスター卵巣細胞）
Chrom. Act.	:	chromogenic activity assay（発色性合成基質法）
CI	:	confidence interval（信頼区間）
CL	:	clearance（クリアランス）
C_{max}	:	maximum concentration（最高血中濃度）
[redacted]	:	[redacted]
CNS	:	central nervous system（中枢神経系）
CSF	:	cerebrospinal fluid（脳脊髄液）
CV	:	cardiovascular（循環器系）
DNA	:	deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
DP	:	drug product（製剤）
DS	:	drug substance（原薬）
ECG	:	Electrocardiography（心電図検査）
ELISA	:	enzyme-linked immunosorbent assay（酵素免疫吸着測定法）

EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EOSL	:	end-of-shelf-life（有効期間内）
EPAR	:	European Public Assessment Report（公開医薬品審査報告書）
eq	:	equivalent（等価量）
EU	:	European Union（欧州連合）
F	:	female(-s)（雌）
F8-KO	:	coagulation factor eight gene knockout (mouse)（血液凝固第 VIII 因子ノックアウト（マウス））
FDA	:	U.S. Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
$FeCl_3$	:	ferric chloride（塩化鉄）
FIX	:	coagulation factor nine（血液凝固第 IX 因子）
FIXa	:	activated coagulation factor nine（活性型血液凝固第 IX 因子）
FVIII	:	coagulation factor eight（血液凝固第 VIII 因子）
FVIIIa	:	activated coagulation factor eight（活性型血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	coagulation factor ten（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	activated coagulation factor ten（活性型血液凝固第 X 因子）
FXIa	:	activated coagulation factor eleven（活性型血液凝固第 XI 因子）
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の非臨床安全性試験の実施の基準）
h	:	hour(-s)（時間）
HA	:	haemophilia A（血友病 A）
HCP	:	host cell protein（宿主細胞タンパク質）
HED	:	human equivalent dose（ヒト等価用量）
HMWP	:	high molecular weight protein（高分子タンパク質）
HPLC	:	high performance liquid chromatography（高速液体クロマトグラフィー）
i.a.	:	intra-arterial(-ly)（動脈内）
ICH	:	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）
IHC	:	immunohistochemistry（免疫組織化学的検査）
INN	:	international nonproprietary name（国際一般名）
IU	:	international unit（国際単位）
i.v.	:	intravenous(-ly)（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）
K_{cat}	:	first-order rate constant（一次速度定数）
K_d	:	dissociation constant（解離定数）
kDa	:	kilodalton（キロダルトン）
K_m	:	Michaelis constant（ミカエリス定数）
LLOQ	:	lower limit of quantification（定量下限値）
M	:	male(-s)（雄）
min	:	minute(-s)（分）
MRT	:	mean residence time（平均滞留時間）

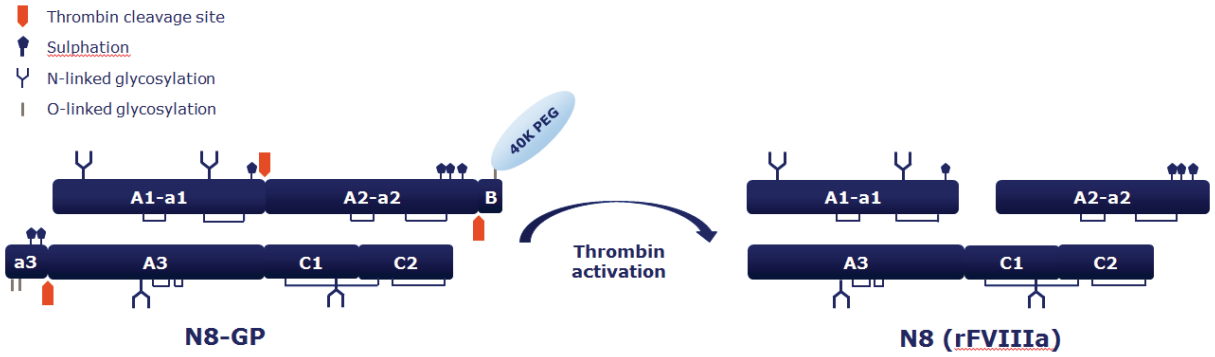
N, n	:	number（番号）
N7-GP	:	eptacog alfa pegol (activated), 40 kDa PEGylated rFVIIa（エプタコグアルファ ペゴル（活性型）、40 kDa PEG 化 rFVIIa）
N8	:	turoctocog alfa, NovoEight®（ツロクトコグ アルファ、ノボエイト®）
N8-GP	:	turoctocog alfa pegol, 40 kDa PEGylated rFVIII（ツロクトコグ アルファ ペゴル、40 kDa PEG 化 rFVIII）
N9-GP	:	nonacog beta pegol, 40 kDa PEGylated rFIX（ノナコグ ベータ ペゴル、40 kDa PEG 化 rFIX）
N/A	:	not applicable（該当なし）
nAb	:	neutralising antibody（中和抗体）
NC	:	not calculable （計算不可）
NCA	:	noncompartmental analysis（ノンコンパートメント解析）
ND	:	not detected（不検出）
NHP	:	normal human plasma（正常ヒト血漿）
nM	:	Nanomolar（ナノモル）
NMR	:	nuclear magnetic resonance（核磁気共鳴法）
NOAEL	:	no observed adverse effect level（無毒性量）
NZW	:	New Zealand White (rabbit)（ニュージーランド白色種（ウサギ））
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
PD	:	pharmacodynamic(-s)（薬力学）
PDCO	:	Paediatric Committee（小児委員会）
PEG	:	polyethylene glycol（ポリエチレングリコール）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PK	:	pharmacokinetic(-s)（薬物動態）
pmol	:	Picomol（ピコモル）
ppm	:	parts per million（百万分率）
PsA	:	psoriatic arthritis（乾癬性関節炎）
[redacted]	:	[redacted]
QWBA	:	quantitative whole body autoradiography（定量的全身オートラジオグラフィ）
R^2	:	coefficient of regression（回帰係数）
RA	:	rheumatoid arthritis（関節リウマチ）
rFIX	:	recombinant coagulation factor nine（遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子）
rFVIIa	:	recombinant activated coagulation factor seven（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
rFVIII	:	recombinant coagulation factor eight（遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）

rFVIIIa	:	activated recombinant coagulation factor eight（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）
RIA	:	Radioimmunoassay（ラジオイムノアッセイ）
RP-HPLC	:	reversed phase high performance liquid chromatography（逆相高速液体クロマトグラフィー）
s	:	second(-s)（秒）
SBA	:	Summary Basis of Approval（新医薬品承認審査概要）
SD	:	standard deviation（標準偏差）
SE-HPLC	:	size exclusion high performance liquid chromatography（サイズ排除高速液体クロマトグラフィー）
sec	:	second(-s)（秒）
SEM	:	standard error of the mean（標準誤差）
SPRD	:	Sprague Dawley (rat)（Sprague Dawley（ラット））
SWP	:	safety working party（安全性ワーキング・パーティー）
$t_{1/2}$	:	terminal half-life（終末相半減期）
TGA	:	thrombin generation assay（トロンビン生成測定法）
TK	:	toxicokinetic(-s)（トキシコキネティクス）
TTC	:	threshold of toxicological concern（毒性学的懸念の閾値）
turoctocog alfa	:	Novo Nordisk recombinant coagulation factor eight (NovoEight®)（ノボ ノルディスク社製遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（ノボエイト®））
turoctocog alfa pegol	:	Novo Nordisk 40 kilodalton PEGylated recombinant coagulation factor eight (N8-GP)（ノボ ノルディスク社製 40 キロダルトン PEG 化遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（N8-GP））
U	:	unit（単位）
μCT	:	micro-computed tomography（マイクロコンピュータ断層撮影）
USP	:	United States Pharmacopeia（米国薬局方）
V_{ss}	:	volume of distribution at steady state（定常状態分布容積）
VWF	:	von Willebrand factor（von Willebrand 因子）
WBCT	:	whole blood clotting time（全血凝固時間）
WHO	:	World Health Organization（世界保健機関）

2.4.1　非臨床試験計画概要

2.4.1.1　分子

一般名（国際一般名（INN）；turoctocog alfa pegol）ツロクトコグ アルファ ペゴルを本文書では N8-GP と呼ぶ。N8-GP 製剤は既承認のノボ ノルディスク社製品であるノボエイト®（ツロクトコグ アルファ、N8）に基づいている。N8 は野生型 B ドメインのアミノ酸 21 個を含有する、無血清の B ドメイン切断型遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）である。N8-GP は単一の 40 kDa ポリエチレングリコール（PEG）分子が結合したツロクトコグ アルファ（N8）分子であり、PEG は主としてグリシンリンカーを介して切断型 B ドメイン内の O 型糖鎖と結合している。N8-GP がトロンビンにより活性化されると、PEG 分子及び a3 領域を含有する B ドメインが開裂し、内因性の活性型 FVIII（FVIIIa）と同様の構造を有する活性型 rFVIII（rFVIIIa）が生成される（図 2.4-1）。



Note: The heavy chain (A1-a1 and A2-a2) and light chain (A3-C1-C2) are held together by non-covalent interactions.
Abbreviations: 40K = 40 kilodalton; rFVIIIa = activated recombinant coagulation factor eight.

図 2.4-1　　活性化前後の N8-GP の概略

N8-GP は遺伝子組換え製剤であり、細胞株〔チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞〕以外の動物由来の成分は製造過程において使用していないことから、ウイルス性疾患及び他の血液媒介感染性疾患のリスクは除かれている。N8-GP 製剤内のウイルスを含む動物起源の物質を除去し、不活性化するために、製造過程において精製手順が実施される。したがって、感染性物質伝播のリスクは除かれている。

N8-GP の分子量は 216 kDa である。N8-GP 分子のタンパク質部分（rFVIII、ツロクトコグ アルファ又は N8）は分子量 166 kDa のポリペプチド（翻訳後の糖鎖附加を含有しない）であり、非共有相互作用により結合した分子量 87 kDa の H 鎖及び 79 kDa の L 鎖を含有する。N8-GP 分子の PEG 部分は分子量

40 kDa である。N8-GP は 1 mol あたり 1 mol の N8 及び 1 mol の PEG を含有し、N8-GP 製剤 1 mg は 9500 IU を含有する。IU、μg 及び pmol の換算を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1　　IU 及び対応する投与量（μg 又は pmol）

N8-GP (IU)	N8 (μg)	PEG (μg)	Corresponding (pmol)
9500	1000	241[b]	6024[a]
150	16	3.8	96
100	11[c]	2.5	66
75	8	2	48
50	5	1.3	30

[a](1000 μg divided by 166000 μg/μmol) = 0.006 μmol = 6.024 nmol = 6024 pmol. [b](40 kDa divided by 166 kDa) multiplied by 1000 μg = 241 μg. [c](100 IU divided by 9500 IU/mg) multiplied by 1000 = 11 μg.

N8-GP の力価は欧州薬局方（Ph. Eur.）に従って[redacted]法で測定し、WHO の第 8 次国際標準物質を用いて IU で表記される。

N8-GP は半減期延長型 rFVIII であり、標準的な FVIII 製剤に対して治療の有効性を高め、負担を軽減することを目的として開発された。

2.4.1.2　臨床適応

N8-GP の効能又は効果、並びに用法及び用量を以下のように設定した。

［効能又は効果］

血液凝固第 VIII 因子欠乏患者における出血傾向の抑制

［用法及び用量］

本剤を添付の専用溶解液全量で溶解し、1～2mL/分で緩徐に静脈内に注射する。

通常、1 回体重 1kg 当たり 10～30 国際単位を投与するが、患者の状態に応じて適宜増減する。

定期的に投与する場合、12 歳以上の患者には、通常、1 回体重 1kg 当たり 50 国際単位を 4 日毎に投与する。なお、患者の状態に応じて、1 回体重 1kg 当たり 50 国際単位を週 2 回、又は 1 回体重 1kg 当たり 75 国際単位を週 1 回投与することもできる。

12 歳未満の小児には、通常、1 回体重 1kg 当たり 60 国際単位を週 2 回投与する。なお、患者の状態に応じて、1 回体重 1kg 当たり 50～75 国際単位を週 2 回又は 3 日毎に投与することもできる。

2.4.1.3 臨床製剤処方

N8-GP は含量の異なる 5 製剤（500 IU/バイアル、1000 IU/バイアル、1500 IU/バイアル、2000 IU/バイアル及び 3000 IU/バイアル）が開発されている。本剤は凍結乾燥粉末であり、溶解し静脈内注射に使用する。5 製剤（500～3000IU）は、有効成分含量を除き、同一組成である。

臨床製剤に使用された添加物は、他の静脈内投与用医薬品で使用前例がある（表 2.4-2）。

表 2.4-2　　N8-GP の市販用製剤に使用された添加物

Excipient	**Quantity per mL after reconstitution (mg/mL)**	**Function**	**Reference to standards**
L-histidine	1.5	Buffer	Ph. Eur., USP, JP
Sucrose	3	Stabiliser	Ph. Eur., USP, JP
Polysorbate 80	0.1	Surfactant	Ph. Eur., USP, JP
Sodium chloride	18	Stabiliser	Ph. Eur., USP, JP
L-methionine	0.055	Antioxidant	Ph. Eur., USP, JP
Calcium chloride dehydrate	0.25	Stabiliser	Ph. Eur., USP, JP
Hydrochloric acid	-	pH adjustment to 6.9[a]	Ph. Eur., USP, JP
Sodium hydroxide	-	pH adjustment to 6.9[a]	Ph. Eur., USP, JP
Water for injections	To final volume	Solvent	Ph. Eur., USP, JP

[a]The pH of the formulated drug product is adjusted by adjusting the pH of the buffer solution used for dilution of N8-GP during preparation.
Abbreviations: JP = Japanese Pharmacopoeia; Ph. Eur. = European Pharmacopoeia; USP = United States Pharmacopeia.

2.4.1.4 非臨床試験プログラム

N8-GP の非臨床安全性評価プログラムは、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）のバイオテクノロジー応用医薬品に関する ICH S6(R1)ガイドライン[1]、ICH M3(R2)ガイドライン[2]及び欧州医薬品庁（EMA）のヒト用医薬品委員会（CHMP）- Safety Working Party（SWP）の”recommendation to the Paediatric Committee (PDCO) for use of PEGylated drugs in children”[3]に従って策定した。N8-GP の非臨床試験には効力を裏付ける試験、安全性薬理試験、薬物動態・代謝・分布・排泄試験、毒性試験及びその他の試験が含まれている。薬理試験、薬物動態及び毒性試験の概要を表 2.4-3、表 2.4-5 及び表 2.4-13 に示す。重要な *in vivo* 安全性試験は、ラットにおいて 52 週間まで、カニクイザルにおいて 2 週間まで実施した。N8-GP のトロンビン産生試験の結果に基づき、正常な凝固能を有するラット及びカニクイザルを毒性試験に使用した。さらに、N8-GP の長期毒性試験を評価するため、Rowett ヌードラットを

導入して免疫系を回避した。遺伝毒性及びがん原性試験は、N8-GP 分子の特質を考慮すると意味のあるものとは考えられなかった。血栓形成は過剰な薬理作用、すなわち、凝固カスケードの活性化と一致する。複数の文献から、血栓形成は、胎児の流産等のリスク要因の一つとなることが知られている。非常に高用量の N8-GP を正常動物に投与する生殖発生毒性試験を実施した場合には、上記の有害影響が想定されると考えられることから、生殖発生毒性試験は実施しなかった。局所刺激性は、Rowett ヌードラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験ならびにウサギにおける局所刺激性試験において評価された。臨床適用経路が静脈内であることから、非臨床試験の投与経路を静脈内とした。重要な反復投与毒性試験は、経済協力開発機構(OECD)の指針及び「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）に準拠し、OECD の指針を順守する国において実施した。非臨床試験（GLP 適用）においては、臨床用製剤である 50～2000 IU/mL を使用した。

本非臨床試験の概要において、“FVIII replete”は正常な凝固系を有する動物に対して用い、“FVIII deplete”は FVIII 欠損動物（例：FVIII 遺伝子ノックアウト（F8-KO）動物）に対して用いる。

2.4.1.5 規制当局との協議

ツロクトコグ アルファ ペゴルの開発期間中、米国、EU の保健関係規制当局と同様に、医薬品医療機器総合機構（PMDA）との相談（[redacted]PMDA 相談、[redacted]年[redacted]月[redacted]日）を実施し、新薬の承認申請（NDA）における非臨床プログラムの適切性について議論した結果、日本での[redacted]及び NDA にあたり、非臨床試験に特段の不足はないことを確認した。

2.4.2 薬理試験

N8-GP の薬理学的特性を解析し明らかにすることを目的とし、複数の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。薬力学的特性について他の非 PEG 化 rFVIII 製剤〔アドベイト®又はノボエイト®（N8）〕と比較した。雄性カニクイザルを用いた反復投与毒性試験（GLP 適用）に安全性薬理試験の評価項目を組み入れた（表 2.4-3）。臨床適用経路が静脈内であることから、すべての *in vivo* 試験において投与経路を静脈内とした。

表 2.4-3　　薬理試験の概要

Discipline	Type of studies
Primary pharmacodynamics	
In vitro	Binding to von Willebrand factor (VWF)
	Characterisation of cofactor activity and rates of activation and inactivation
	Characterisation of the thrombin generation capacity
	Characterisation of dose response by thromboelastography
In vivo	Acute dose response relationships in bleeding models (tail bleeding, tail vein transection and vena saphena bleeding) in F8-KO (coagulation factor eight gene knockout) mice comparing N8-GP to rFVIII
	Duration of effect in tail bleeding and injury models (tail vein transection, $FeCl_3$-induced injury and joint bleeding) in F8-KO mice comparing N8-GP to rFVIII
	The prophylactic effect of N8-GP in a knee bleeding model in F8-KO mice
	PK and PD study of N8-GP and N8 in haemophilia A dogs
Secondary pharmacodynamics	
Species qualification	N8-GP binding to VWF and thrombin generation in plasma from nonclinical species used for pharmacodynamics (PD), pharmacokinetics (PK) and toxicology
Others	Binding of VWF to N8-GP produced for the pivotal trial and in commercial scale
	In vitro stability of N8-GP in haemophilia A plasma
	Binding to clearance receptors
Safety pharmacology	Safety pharmacology end points (respiratory, CV, CNS and kidney) included in pivotal 2-week GLP repeat-dose toxicity study in cynomolgus monkeys
Pharmacodynamic drug interactions	No studies performed

Note: Further details can be found in Module 2.6.2.

2.4.2.1　効力を裏付ける試験

血友病 A は、補因子である FVIII の欠乏又は欠損に起因する出血性疾患である。FVIII は血液凝固に不可欠であるため、その欠乏により再発性の出血が引き起こされる。トロンビンは、活性化血小板表面において活性型血液凝固第 IX 因子（FIXa）の補因子である FVIIIa を活性化し、FVIIIa/FIXa 複合体が血液凝固第 X 因子（FX）を活性型 FX（FXa）へと変換させる。FVIII は大型糖タンパク質であり、肝臓で合成され、von Willebrand 因子（VWF）と非共有結合による複合体を形成し循環している。VWF と複合体を形成することにより FVIII はクリアランス受容体及びリン脂質表面との結合から保護されている。VWF と複合体を形成した FVIII の血漿中半減期は、ヒトにおいて約 12 時間である。

血管損傷部位における活性化後、PEG 化された切断型 B ドメインが遊離し、N8-GP は完全な機能を有する FVIIIa に変換される（図 2.4-1）。薬理試験の目的は、rFVIII との比較における N8-GP の薬理学的特性及び効果持続時間の特性を明らかにすることである。

2.4.2.1.1 *In vitro* 薬理試験

2.4.2.1.1.1 von Willebrand 因子への結合

VWF は循環中の FVIII の安定性及び半減期に重要であることから、PEG 化による影響を評価するため、N8-GP と VWF の相互作用を解析した。精製ヒト VWF を用いた結合分析〔酵素免疫吸着測定法（ELISA）〕により、非 PEG 化 rFVIII 製剤（N8 及びアドベイト®）と VWF の相互作用、又は N8-GP と VWF の相互作用に関する試験を実施した。

N8-GP、N8 及びアドベイト®の解離定数はそれぞれ 0.30 ± 0.03 nmol/L、 0.20 ± 0.02 nmol/L、0.23 ± 0.05 nmol/L であった。このことから、N8-GP はヒト VWF に対して nmol/L 以下の解離定数という高い結合親和性を有することが示され、循環中において投与後の N8-GP は N8 及びアドベイト®と同様に内因性 VWF と結合することが示唆された。

2.4.2.1.1.2 N8-GP の補因子活性・活性化速度及び不活化速度の特性解析

In vitro 生化学的特性から、FIXa 触媒による FX 活性における N8-GP の補因子活性と rFVIII（N8 及びアドベイト®）の活性が同様であることが示された。また、N8-GP 及び rFVIII における活性化プロテイン C（APC）触媒の阻害度も同様であった。VWF の有無に関わらず、トロンビン触媒の N8-GP と rFVIII の活性化速度は同様であった（表 2.4-4）。これらの解析から、PEG 化は N8-GP の補因子機能に影響を及ぼさず、N8-GP と VWF の相互作用を妨害しないことが示された。

表 2.4-4　　補因子活性、活性化速度及び不活性化速度に関する *in vitro* 特性解析

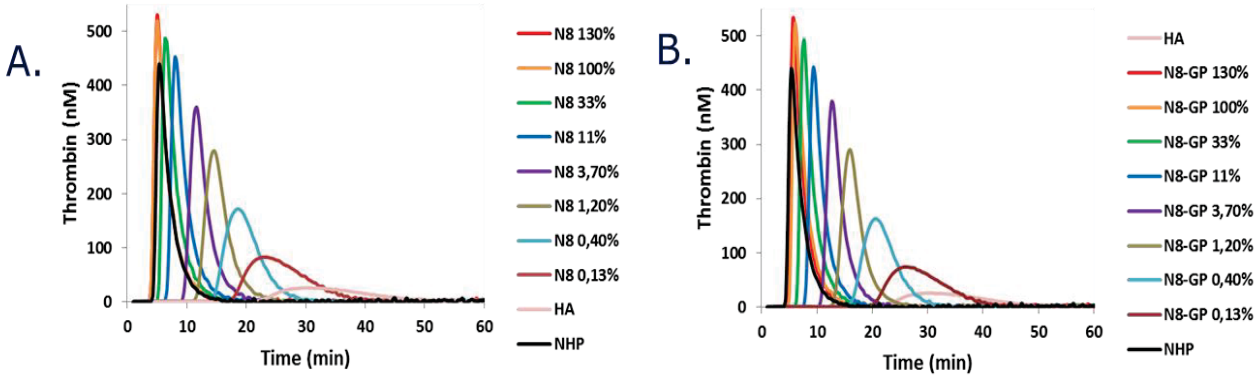
Test	N8-GP (activated)	N8 (activated)	Advate® (activated)
K_d of FVIIIa binding to FIXa (nmol/L)[a]	0.94 (0.66 – 1.22)	0.78 (0.64 – 0.93)	0.76 (0.60 – 0.92)
K_m of FX activation (nmol/L)[a]	4.9 (4.8 – 5.0)	5.1 (4.8 – 5.5)	4.8 (4.5 – 5.1)
K_{cat} of FX activation (s^{-1})[a]	5.0 (4.1 – 6.0)	6.5 (5.2 – 7.8)	5.5 (4.9 – 6.2)
Rate of FVIIIa inactivation by APC (min^{-1})[a]	0.22 (0.19 – 0.24)	0.23 (0.20 – 0.25)	0.19 0.17 – 0.21)
Rate of thrombin-mediated FVIII activation without VWF (pmol/L x min^{-1})[b]	5.3 ± 3.6	4.0 ±0.5	3.9 ± 0.5
Rate of thrombin-mediated FVIII activation with 50 nM VWF (pmol/L x min^{-1})[b]	17.7 ± 2.8	14.7 ± 1.3	14.5 ± 3.4

[a]Means and 95% CI; n=10−13. [b]Means ± SD; n=10.

Abbreviations: APC = activated protein C; CI = confidence interval; FVIII = coagulation factor eight; FVIIIa = activated coagulation factor eight; FIXa = activated coagulation factor nine; FX = coagulation factor ten; VWF = von Willebrand factor; K_d = dissociation constant; K_m = Michaelis constant; K_{cat} = first-order rate constant.

2.4.2.1.1.3　　トロンビン生成能の特性解析

N8-GP 及び N8 のトロンビン生成能を、血友病 A 患者血漿を用いた添加試験でトロンビン生成測定法（TGA）により評価した。最大トロンビン生成時間及び最大トロンビン生成量のいずれにおいても、N8-GP の濃度依存的な効果は N8 と同様であることが認められた。このことから、N8-GP 及び N8 が FXIa 及び組織因子による誘発時の N8-GP のトロンビン生成時間及びトロンビン生成量は、N8 と同程度であることが示された（図 2.4-2）。

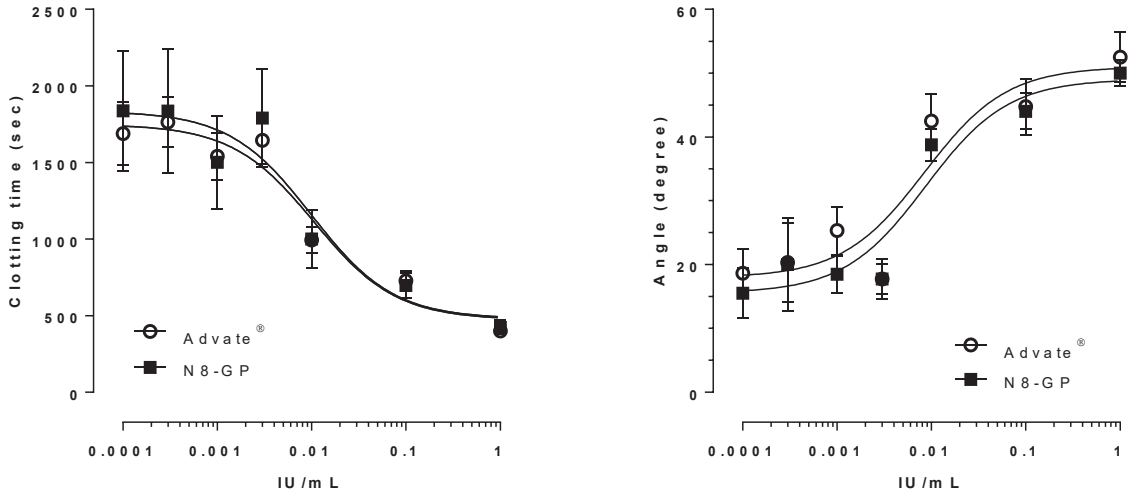


Note: Representative thrombin generation curves for N8 (A) and N8-GP (B), respectively. 100% equals 1 IU/mL N8 or N8-GP.
Abbreviations: FXIa = activated coagulation factor eleven; HA = haemophilia A; NHP = normal human plasma.

図 2.4-2　　FXIa による誘発時の血友病 A 血漿における N8 及び N8-GP のトロンビン生成量

2.4.2.1.1.4　　トロンボエラストグラフィー法による用量反応関係の特性解析

F8-KO マウスの全血中における N8-GP 及びアドベイト®の濃度反応関係についてトロンボエラストグラフィー法（TEG、ROTEM®）を用いて検討したところ、N8-GP 及び rFVIII（アドベイト®）は同等の力価を示した。全血を用いた TEG から、血栓形成、凝固時間及び凝固安定性の動態に関する情報が得られた（図 2.4-3）。



Note: Concentration response relationship on clot formation parameters (clotting time - left) and rate of clot propagation (angle - right) comparing Advate® and N8-GP. Data are means ± SEM; n=4.
Abbreviations: F8-KO = coagulation factor eight gene knockout.

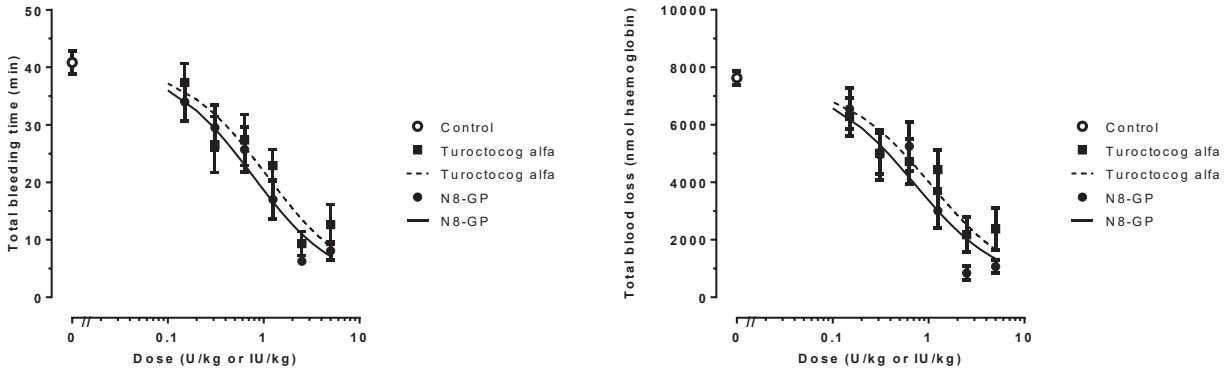
図 2.4-3　F8-KO マウスの全血に対するトロンボエラストグラフィー法（ROTEM®）を用いたアドベイト®及び N8-GP の比較

2.4.2.1.1.5 *In vitro* 特性の結論

要約すると、各種 *in vitro* 系における評価結果から、N8-GP の補因子活性は rFVIII と類似していることが確認され、PEG 化は N8-GP の生物学的機能に影響を及ぼさないことが示唆された。トロンビン生成測定法（TGA）及び TEG を用いて評価した N8-GP の FVIII 活性から、N8-GP と rFVIII の力価及び活性が類似していることが示された。

2.4.2.1.2 *In vivo* 薬理試験

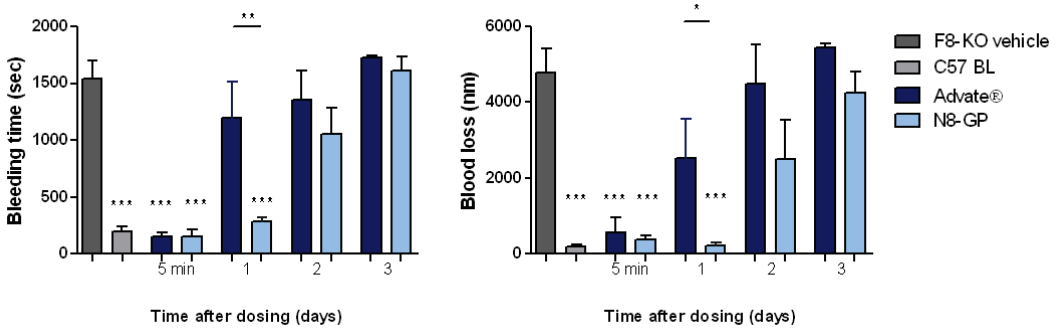
N8-GP の *in vivo* 効果は、3 種類の F8-KO マウス出血モデル（尾切断出血モデル、尾静脈切断出血モデル、伏在静脈出血モデル）を用いて評価した。これらの出血モデルにおいて急性効果の用量反応曲線は、N8-GP 及び rFVIII（N8 又はアドベイト®）で同様であった。急性効果の例として、尾静脈切断出血モデルで得られた結果を図 2.4-4 に示す。これらの急性期モデルにおいて、N8-GP 及び rFVIII の力価及び効果に差異は認められなかった。



Note: Data are means ± SEM; n=12. Control = vehicle group.
Abbreviations: Turoctocog alfa = N8.

図 2.4-4　尾静脈切断後の N8-GP 及び N8 における総出血時間及び総出血量の用量反応曲線

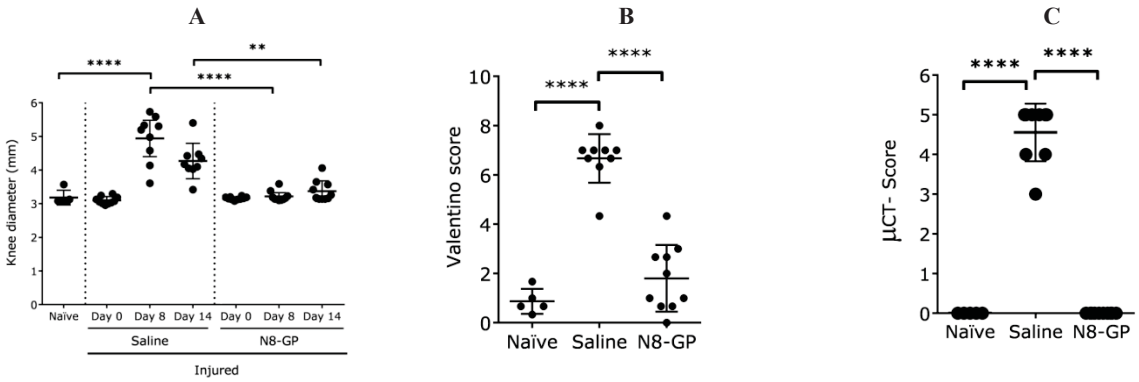
3 種類の出血モデル（尾静脈切断出血モデル、$FeCl_3$ 損傷出血モデル、膝関節出血モデル）を用いて、効果持続時間を検討した。各モデルにおいて N8-GP と rFVIII（N8 又はアドベイト®）の効果持続時間を比較した。N8-GP の急性効果は rFVIII と同様であったが、効果持続時間が rFVIII と比較して延長されたことが示された。効果持続時間の例として、尾静脈切断出血モデルで得られた結果を図 2.4-5 に示す。



Note: Data are means ± SEM; n=6-12. Left figure shows bleeding time, and right figure shows blood loss compared to F8-KO control/wild-type mice (C57 BL) at 5 min as well as between N8-GP or Advate® at specific time points.
p<0.05 (*). p<0.01 (**). p<0.001 (***).

図 2.4-5　　F8-KO マウスを用いた尾静脈切断出血モデルにおける N8-GP 及びアドベイト®（200 IU/kg）の効果持続時間

F8-KO マウスを用いた膝関節出血モデルにおいて N8-GP の予防効果を検討した。このモデルに対する N8-GP の予防投与により、生理食塩水対照群と比較して膝関節の腫脹及び滑膜炎が減少し、病理学的な骨変化が完全に抑制されたことが示された（図 2.4-6）。



Note: (A) Knee diameter days 0, 8 and 14. Design: On days 0 and 7, F8-KO mice were anesthetised and received an i.v. injection of 500 IU/kg N8-GP (n=9) or saline (n=10, negative control) followed by needle puncture through the infrapatellar ligament to induce a knee bleed. Knee diameter was measured on days 0, 8 and 14 after injection of N8-GP or saline (negative control). Data are single observations, data are means ± SD, one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. (B) Histopathological Valentino score on day 14. Valentino score is a composite score measuring synovial hyperplasia, vascularity, hemosiderin, presence of blood, villus formation and cartilage erosion applied to coronal sections. Data are single observations, mean ± SD unpaired t-test with Welch's correction. (C) Visual scanning by micro-computed tomography (µCT) of injured joints at day 14 (20 µm resolution).
Data are single observations, mean ± SD, unpaired t-test with Welch's correction. **p<0.01. ****p<0.0001.

図 2.4-6　　F8-KO マウスを用いた膝関節出血モデルにおける N8-GP の効果

薬物動態試験の一部として、血友病 A イヌに対し全血凝固時間（WBCT）測定及び TEG による評価を実施し、N8-GP 及び rFVIII の薬力学的作用をさらに評価した。血友病 A のイヌに N8-GP を単回投与

した結果、*In vivo* での終末相半減期の延長と一致して、TEG 及び WBCT のいずれの評価でも rFVIII を単回投与した結果と比較して明らかな効果持続時間の延長が認められた。

結論として、*in vivo* での効力を裏付ける試験から、N8-GP は急性期の効果は rFVIII と同様であるが、rFVIII と比較して効果持続時間の延長が示された。

2.4.2.2 副次的薬理作用

2.4.2.2.1 非臨床安全性評価に適格性が確認されている動物種

動物における *in vivo* 試験の結果を解釈するためには、N8-GP が内因性 VWF への結合及び使用した動物種において薬理学的作用を示すことが不可欠である。ラット、イヌ、カニクイザル及びヒトの血漿試料において、N8-GP は類似した VWF 結合能を示した。FVIII ノックアウト（F8-KO）マウスの血漿は野生型マウスの血漿より多くの N8-GP を吸収したと考えられる。このことは、F8-KO マウスにおいては VWF が内因性 FVIII に占有されていないことに起因するものと推測された。また、ラット、カニクイザル及びヒトの血漿中で N8-GP が薬理作用を示すことがトロンビン生成測定法（TGA）によって示された。

結論として、薬理試験、薬物動態試験及び毒性試験に用いた動物モデルの関連性が認められた。

2.4.2.2.2 [redacted] 実生産工程への変更を支持するための N8-GP の VWF 結合能の検討

N8-GP の VWF への最適な結合には[redacted]の[redacted]が必要であることから、[redacted]実生産工程及び[redacted]実生産工程で製造された N8-GP における VWF への結合能及び[redacted]を検討したところ、いずれも同等であった。

2.4.2.2.3 血友病 A 血漿中における N8-GP の *in vitro* 安定性

クエン酸を添加したヒト血友病 A 血漿に対し、37°C で 24 時間反応させて N8-GP の安定性を検討した結果、アドベイト®の安定性と同様であった。

2.4.2.2.4 クリアランス受容体との結合

N8-GP とクリアランス受容体〔低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）及び超低密度リポタンパク質受容体（VLDLR）〕との結合は、N8 と比較して約 1/3 倍低下した。このことから、PEG 化により N8-GP とクリアランス受容体間の相互作用が遮蔽され、結果としてクリアランスが減少し、循環中の N8-GP の半減期が延長することが示唆された。

2.4.2.3 安全性薬理試験

カニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）において、安全性薬理評価項目〔血圧（カフ）、心電図（ECG、固定四肢誘導）、呼吸数（数及び深度）、体温、神経学的／中枢神経系（CNS）評価項目（行動、神経学的ならびに自律神経系の測定）及び尿検査〕を組み込んだ。最高用量である 2500 IU/kg まで安全性薬理評価項目に及ぼす影響は認められなかった。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用

薬力学的薬物相互作用試験は実施しなかった（2.4.3.5 を参照）。

2.4.3 薬物動態試験

開発中、N8-GP の薬物動態（PK）特性が十分に明らかにされている。PK 及び臨床開発を裏付けるため実施した分布、代謝、排泄試験の概要を表 2.4-5 に示す。臨床適用経路が静脈内であることから、PK 試験の投与経路を静脈内とした。N8-GP 及び rFVIII 製剤（N8、ReFacto®又はアドベイト®）における単回投与時の PK を比較した。

表 2.4-5 薬物動態試験の概要

Discipline and type of study	Species	Dose range tested (IU/kg)
Single-dose PK	Mouse[a,b], rat[b], rabbit[b], dog[a] and monkey[b]	35−280
Repeat-dose PK		
2 (GLP) and 4 weeks	Rat (Wistar)[b]	50−2500 (every 2nd day)
6 weeks	Rat (Rowett nude rat)[b]	50−1500 (twice weekly)
26 and 52 weeks (GLP)	Rat (Rowett nude rat)[b]	50−1200 (every 4th day)
2 weeks (GLP)	Cynomolgus monkey[b]	100−2500 (every 3rd day)
4 weeks	Cynomolgus monkey[b]	250 (twice weekly)
Distribution	Rat (Wistar)[b]	28000 (single dose)
Metabolism	No studies performed, justification provided in Section 2.4.3.4.2	
Excretion	Rat (Wistar)[b]	1160 and 28000 (single dose)
Other pharmacokinetics		
Red blood cells partitioning	*In vitro* (blood - rat)	4 and 100 µg/mL
Other distribution studies	*In vivo/in situ/in vitro* (rat)	190−220 IU/kg / 4 IU/mL

[a]FVIII deplete, [b]FVIII replete. Further details can be found in Module 2.6.4.
Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; PK = pharmacokinetic(-s).

2.4.3.1 分析法

N8-GP の PK を評価するため、各種の生体試料中薬物濃度測定法が開発・使用された（表 2.4-6）。

表 2.4-6　　生体試料中薬物濃度測定法及び抗薬物抗体測定法の概要

Method	Matrix
Bioanalysis	
Chromogenic activity	Plasma (mouse, rat, rabbit, dog and monkey)
ELISA	Plasma (mouse, rat, rabbit, dog and monkey)
One-stage clotting assay[a]	Plasma (rat, dog and monkey)
Anti-drug antibody analysis	
RIA, N8-GP binding antibody	Plasma (rat and monkey)
Chromogenic N8-GP nAb	Plasma (rat and monkey)
PEG-specific radiolabel	
Tritium (^{3}H) N8-GP radio tracer	Plasma, urine, faeces and tissue (rat)
Protein-specific radiolabel	
^{125}I radio tracer in protein backbone	Tissue (rat)
PEG-specific analysis	
Nuclear magnetic resonance (NMR)	Plasma and cerebrospinal fluid (CSF)

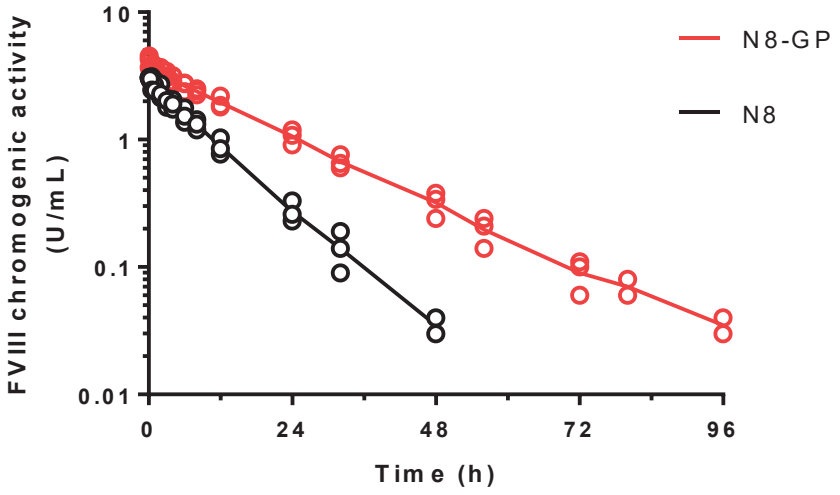
[a]The lower limit of quantification (LLOQ) of the assays were high due to the high endogenous FVIII activity in the FVIII replete rats and monkeys. Further details can be found in Module 2.6.4.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FVIII = coagulation factor eight; LLOQ = lower limit of quantification; nAb = neutralising antibody; NMR = nuclear magnetic resonance; RIA = radioimmunoassay.

いくつかの分析法（発色性合成基質法、凝固一段法、又は FVIII 抗原（ag）に対する酵素免疫吸着測定法（ELISA））が、GLP 非適用の単回投与時の PK 試験及び効力を裏付ける試験でのマウス、ラット、ウサギ、イヌ、及びサルの血漿への使用のために適格性が確認された。GLP 適用の毒性試験では、凝固一段法がサル及びラット血漿への使用のためにバリデートされた。これらの分析法に共通することは、分子のタンパク質部分の曝露を示すことである。発色性合成基質法及び凝固一段法では、N8-GP と動物の内因性 FVIII とを区別できない。FVIII replete 動物では内因性 FVIII 活性が高いことから、ラット及びサルにおいて使用が認められている凝固一段法の定量下限値（LLOQ）は高くなった（250 IU/dL +内因性 FVIII、すなわち LLOQ 範囲：582~773 IU/dL）。したがって、FVIII replete 動物においては、150 IU/kg 以下の用量では曝露は測定できなかった。ラット及びカニクイザル血漿における抗 N8-GP 抗体のスクリーニングはラジオイムノアッセイ（RIA）を用いて実施した。ラット及びカニクイザル血漿のうち、抗 N8-GP 抗体が陽性であった試料について、中和抗体測定法を用いて分析を行った。血漿、組織、尿、及び糞便における分子の PEG 部分の曝露を評価するため、代謝及び排泄試験においてトリチウム（^{3}H）による放射能標識体を使用した。また、組織中におけるタンパク質部分の生体内運命を評価するために、タンパク質骨格に組み込まれたヨウ素（^{125}I）トレーサーを用いた。慢性毒性試験における血漿中及び脳脊髄液（CSF）中 PEG 濃度は、核磁気共鳴法（NMR）を用いて分析した（血漿検体における LLOQ：0.38 μg/mL）。

2.4.3.2 吸収

2.4.3.2.1 単回投与 PK

全体的に、評価した全動物種において、rFVIII と比較して N8-GP の曝露の延長が認められた。イヌにおける結果の例を表 2.4-7 に示す。



Note: Individual (dots) and mean (solid line) plasma FVIII activity versus time profile, n=3, dose 125 IU/kg.
Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight.

図 2.4-7 血友病 A イヌにおける N8-GP 及び N8 の PK プロファイル比較

N8-GP の静脈内投与後、全動物種において血漿中 FVIII 活性が 1 次関数的に低下し、PK は 1 コンパートメントモデルで記述された。

N8-GP のクリアランスが非 PEG 化 rFVIII 製剤と比較して約 1/2 に減少した結果、N8-GP の終末相半減期が約 2 倍延長した。一方、分布容積については非 PEG 化 rFVIII と同様であった（表 2.4-7）。

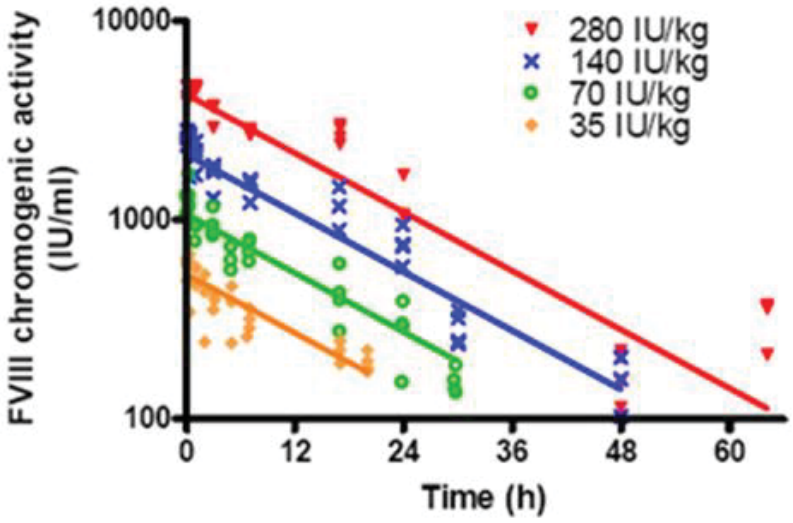
表 2.4-7　125～280 IU/kg の用量範囲における rFVIII 製剤（N8 又は ReFacto®）及び N8-GP の単回静脈内投与時の推定平均 PK パラメータ

Species	Compound	Dose (IU/kg)	Assay	$t_{½}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (mL/kg)	MRT (h)
F8-KO mice	rFVIII	280	Chrom. Act.	7.8	11	58	11
	N8-GP	280	Chrom. Act.	15	3.18	64	21
C57Bl/6 mice	rFVIII	280	ELISA	2.5	36	130	3.6
	N8-GP	280	ELISA	6.8	15	134	8.8
SD rats	rFVIII	200	ELISA	5.8	9.4	69	7.3
	N8-GP	200	ELISA	7.9	5.4	61	11
Wistar rats[a]	N8-GP	250	ELISA	6.9	10	86	8.5
			Chrom. Act.	10	4.6	60	13
NZW rabbits	rFVIII	200	ELISA	7.8	4.8	48	10
	N8-GP	200	ELISA	14	2.8	56	21
Haemophilia A dogs	rFVIII	125	Chrom. Act.	7.3	4.2	43	10
	N8-GP	125	Chrom. Act.	14	3.1	62	19
Cynomolgus monkeys[a]	N8-GP	250	Chrom. Act.	21	1.2	33	30
			ELISA	18	1.5	35	25

[a]First day of a multiple dose pharmacokinetic study.

Abbreviations: C57Bl/6 = C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice; Chrom. Act. = chromogenic activity assay; CL = clearance; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; MRT = mean residence time; NZW = New Zealand White; rFVIII = recombinant coagulation factor eight; SD = Sprague Dawley; $t_{½}$ = terminal half-life; V_{ss} = volume of distribution at steady state.

F8-KO マウス（35～280 IU/kg）を用いて用量比例性を検討した。投与に伴って曝露（AUC 及び C_{max}）の増加がみられ、用量補正した PK パラメータに用量による差異は認められなかった。このことから、F8-KO マウスに静脈内投与した場合、35～280 IU/kg の範囲において N8-GP の PK は用量比例性であることが示された（表 2.4-8）。

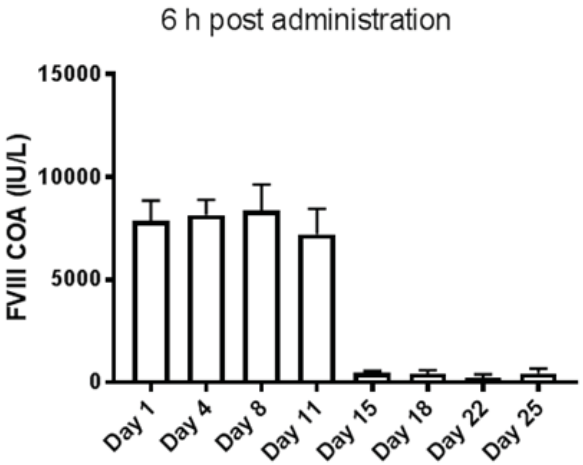


Note: Semi-logarithmic plot of the measured FVIII chromogenic activity and the predictions based on the population approach.
Abbreviations: F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; FVIII = coagulation factor eight.

図 2.4-8　　F8-KO マウスに用量範囲 35～280 IU/kg で N8-GP を静脈内投与した場合の用量比例性

2.4.3.2.2　　反復投与 PK

中和抗体は FVIII replete ラット及びサルのいずれにおいても形成され、それぞれ 25 日後及び 11～15 日後の曝露に影響を及ぼした（図 2.4-9）。したがって、毒性試験における標準的な動物種を用いた長期毒性試験（2～4 週間超）の実施意義はないものと考えられた。



Note: Chromogenic activity versus time 6 h post-dose. Cynomolgus monkeys were given 250 IU/kg i.v. twice weekly over a period of 4 weeks. Each column shows mean and vertical bars ± SD; n=2−3.
Abbreviations: COA = chromogenic activity assay; FVIII = coagulation factor eight.

図 2.4-9　　中和抗薬物抗体によるサルの経時的曝露減少

Wistar 系ラット及びカニクイザルにおける 2 種類の重要な反復投与毒性試験（2 週間）（GLP 適用）において、1 日目に投与に伴う曝露の増加がみられた。反復投与後、中和抗体の形成によりラット及びサルのいずれにおいても曝露は通常経時的に減少した（表 2.4-8）。

表 2.4-8　　Wistar 系ラット及びカニクイザルを用いた 2 週間反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

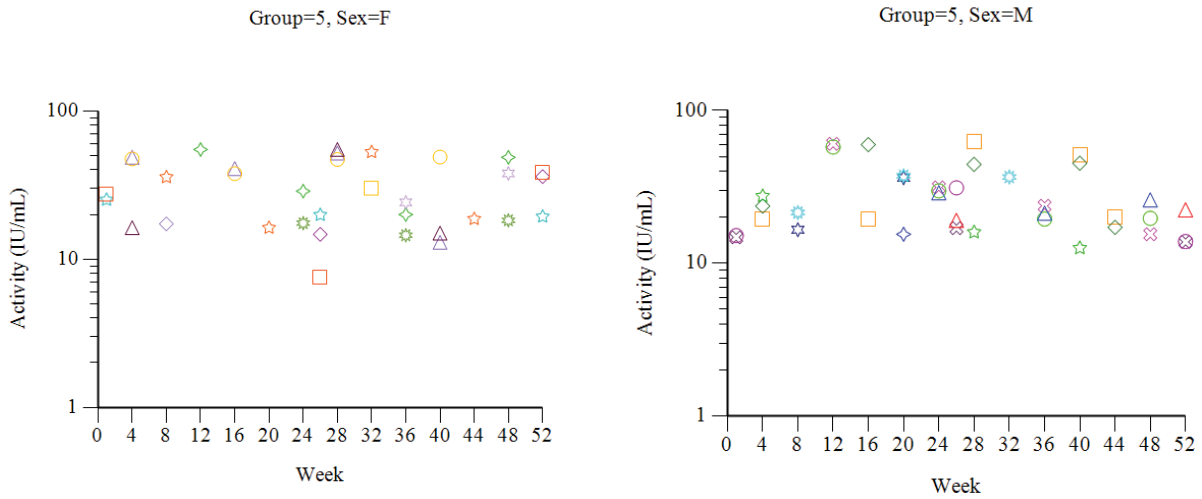
Study	Dose interval	Dose (IU/kg)	Exposure day	C_{max} (IU/mL)		$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)		$t_{½}$ (h)	
				Males	Females	Males	Females	Males	Females
2-week rat	2 days	500	Day 1	15.2	16.2	49.4	149	NC	22.5
		500	Day 13	7.91	NC	NC	NC	NC	NC
		2500	Day 1	89.5	72.3	725	381	12.4	7.35
		2500	Day 13	33.5	12.1	98.6	NC	NC	NC
2-week monkey	3 days	500	Day 1	10.2	-	158[a]	-	39.8	-
		500	Day 13	10.4	-	75.6[a]	-	24.9	-
		2500	Day 1	36.8	-	904[a]	-	32.4	-
		2500	Day 13	15.7	-	25.0[a]	-	2.36	-

[a]$AUC_{0\text{-}72\ h}$

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the curve from time zero to 24 h; $AUC_{0\text{-}72\ h}$ = area under the curve from time zero to 72 h; C_{max} = maximum concentration; NC = not calculable; $t_{½}$ = terminal half-life, - = no data.

N8-GP（PEG を含む）の長期毒性を評価可能にするため、Rowett ヌードラットを導入して免疫系を回避した。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており T 細胞依存性の抗薬物抗体を形成しない。Rowett ヌードラットが使用可能か（すなわち、抗薬物抗体がなく、6 週間の投与期間終了時点において単回投与時と同様の $t_{½}$及び曝露がみられること）確認するため、6 週間の反復投与 PK 試験で評価した。

Rowett ヌードラットへの 26 及び 52 週間の投与期間で実施した 2 種類の重要な毒性試験（GLP 適用）において、動物の大多数に曝露が確認された（図 2.4-10）。500 及び 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）の用量では、用量に関連した曝露の増加が認められた（表 2.4-9）。試験中に中和抗薬物抗体を形成した動物は 4%以下とわずかであった。凝固一段法の LLOQ が高いため、2 つの最高用量でしかトキシコキネティクスが評価できなかったことから、Rowett ヌードラットにおける用量比例性及び累積性に関する正確な結論は出せなかった。



Note: Dose 1200 IU/kg every 4th day. Females are shown to the left, and males are shown to the right. Exposures 4 h after dosing. Symbols represent individual animals that were sampled (n=3/sex, sparse sampling).
Abbreviations: F = females; M = males.

図 2.4-10　Rowett ヌードラットを用いた 52 週間長期毒性試験における曝露

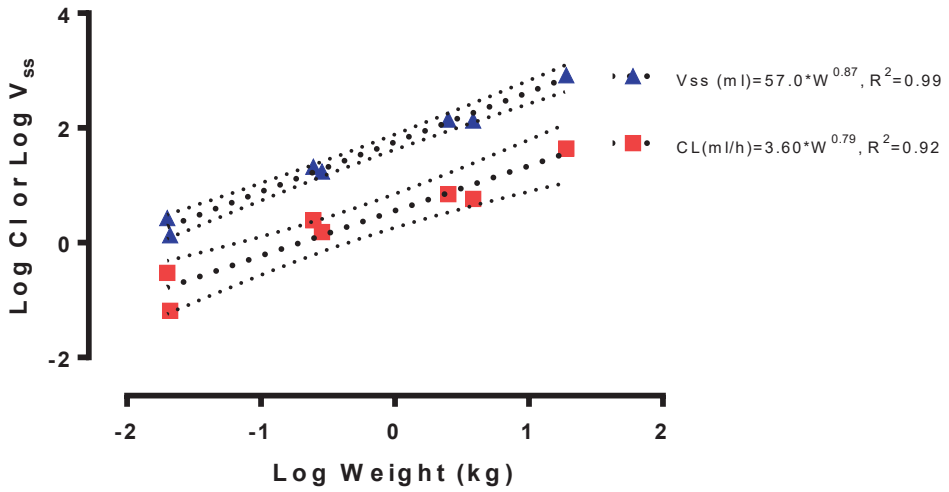
表 2.4-9　Rowett ヌードラットを用いた 26 及び 52 週間反復投与毒性試験におけるトキシコキネティクスパラメータ

Study	Dose interval	Dose (IU/kg)	Exposure week	C_{max} (IU/mL)		AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	
				Males	Females	Males	Females
26-week Rowett nude rat	4 days	500	Week 1	11.0	9.62	NC	NC
		500	Week 26	12.5	NC	111	NC
		1200	Week 1	25.3	15.3	371	81.4
		1200	Week 26	23.2	14.3	356	205
52-week Rowett nude rat	4 days	500	Week 1	17.5	18.2	152	77.7
		500	Week 52	15.2	17.1	188	321
		1200	Week 1	43.6	28.0	453	292
		1200	Week 52	36.3	31.4	438	250

Abbreviations: AUC_{0-24h} = area under the curve from time zero to 24 h; C_{max} = maximum concentration; NC = not calculable.

N8-GP の PK はマウス、ラット、ウサギ、サル、イヌにおいてアロメトリックな関係を示した（図 2.4-11）。動物種間のクリアランス及び分布容積は測定可能であり、$R^2 > 0.92$ であった。図に示した関

数に基づき、ヒトクリアランス及び分布容積はそれぞれ 1.7 mL/h/kg、39 mL/kg と予測された（75 kg）。



Note: The species are mouse (C57Bl/6 and F8-KO), rat (Wistar and Sprague Dawley), rabbit, monkey and dog.
Abbreviations: C57Bl/6 = C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice; CL = clearance; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; R^2 = coefficient of regression; V_{ss} = volume of distribution at steady state.

図 2.4-11　N8-GP におけるクリアランス（mL/h）及び分布容積のアロメトリックスケーリング

概して、種々の動物種を用いた N8-GP の PK 特性が十分に明らかにされた。

2.4.3.3　重要な非臨床安全性試験と臨床試験結果の PK の種間比較

重要な反復毒性試験における雄性動物の曝露量比及び成人被験者を対象とした第 3 相試験における 50 IU/kg 単回投与後のヒト曝露量比の比較の概要を表 2.4-10 に示す。

表 2.4-10　非臨床毒性試験（雄性動物）における曝露と成人／青年患者を対象とした第 3 相臨床試験における単回投与曝露とのデータ比較

Species	Duration	Dose (IU/kg)	Dose interval (h)	C_{max} (IU/mL)	AUC (h*IU/mL)	Exposure ratios (animals/human)	
						C_{max}	AUC
Rat	2 weeks	2500[a]	2 days	89.5[b]	725[b]	66	20
Rat (Rowett)	26 weeks	1200[a]	4 days	23.2	356	17	10
Rat (Rowett)	52 weeks	1200[a]	4 days	36.3	438	27	12
Monkey	2 weeks	2500[a]	3 days	36.8[a]	904[a]	27	25

Human[c]	28 weeks	50	4 days	1.358	35.57	-	-

[a]NOAEL. [b]Based on PK day 1 where there was no interference with anti-drug antibodies. [c]Phase 3, trial 3859 single-dose PK (visit 7, 28 ± 1 week), based on FVIII chromogenic activity with product-specific standard.
Abbreviations: AUC = area under the curve; C_{max} = maximum concentration. NOAEL = no observed adverse effect level

2.4.3.4 分布、代謝及び排泄

PEG の生体内運命を追跡するため、N8-GP の PEG 部分を放射能標識し（図 2.4-12）、分布及び排泄試験に用いた。これらの試験で用いた分析法は、血漿及び組織中の経時的な PEG 濃度を定量的に測定可能である。

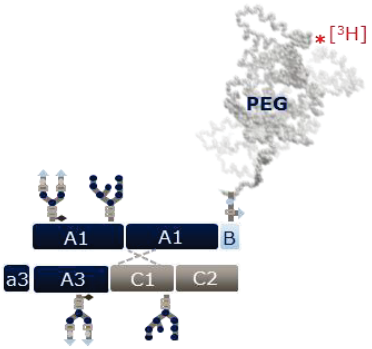


図 2.4-12　　分布及び排泄試験に用いた[^{3}H]-N8-GP 放射能標識トレーサー

40 kDa PEG 関連放射能の分布（PEG 関連放射能又は PEG 単体を以下のとおり用いた）について、単回静脈内投与後 12 週間まで追跡した。最初に実施した分布及び排泄試験では、最大臨床推奨用量に対して非常に高用量（4.1 mg/kg）の N8-GP を用い、投与後 12 週まで PEG を検出可能とした（表 2.4-11）。その後、低用量（0.17 mg/kg）を用いた排泄試験を実施した。これらの分布及び排泄試験データは公表されている[4]。

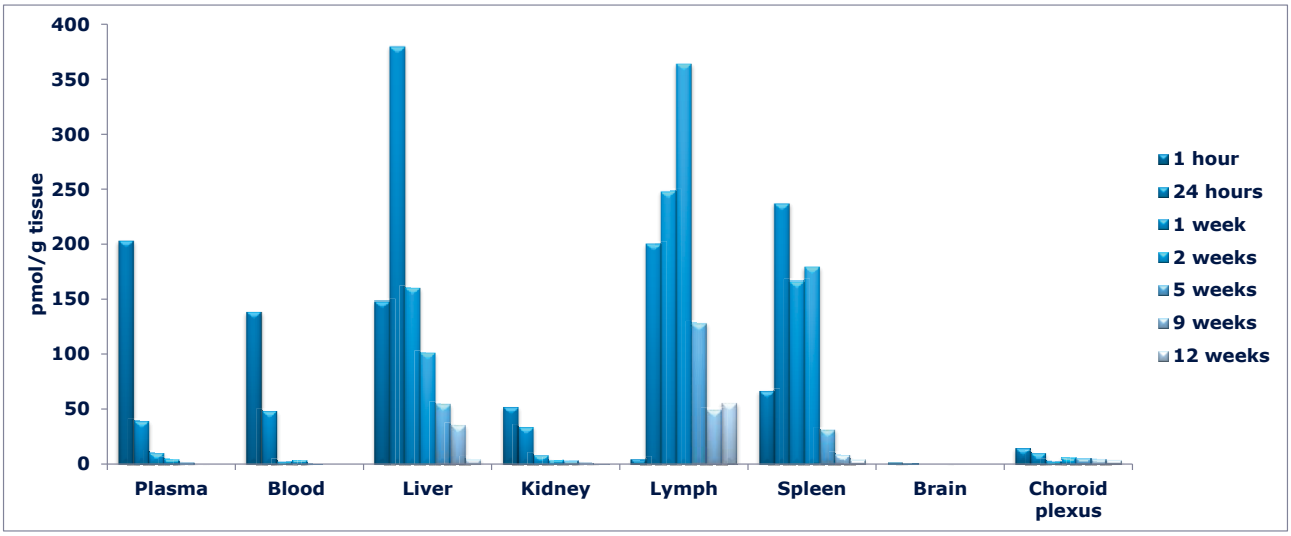
表 2.4-11　　分布及び排泄試験と臨床試験で用いた用量比

	Distribution	**Excretion**	**Excretion**
Dose full molecule (mg/kg)	4.1	4.1	0.17
Corresponding N8-GP dose (IU/kg)	28000	28000	1160
Multiple to a single clinical dose (IU/kg)[a]	370−560	370−560	15−23
Multiple to a single clinical dose (HED)[b]	60−90	60−90	2−4

[a]Clinical dose 50−75 IU/kg every 3−4 days in children, 50 IU/kg every 3−4 days or 75 IU/kg once weekly. Thus for calculating multiples to single clinical dose, 50−75 IU/kg was used. [b]HED: Human equivalent dose on body surface area basis calculated by multiplying rat dose with 0.16.

2.4.3.4.1 分布

組織分布データから、PEG 関連放射能は広く組織中に分布し 12 週間にわたり緩徐に組織から排泄されることが示された（図 2.4-13）。放射能濃度は血流量に富む組織／臓器で最も高く、CNS で最も低かった。このデータから、PEG は組織への取り込まれた後、排出前にリンパ系へ再分布されることが示された。最終採取時点（投与後 12 週）において、約半数の組織に定量化可能なレベルの放射能が含まれていた。



Note: Nine rats received a single i.v. administration of 4.1 mg/kg N8-GP (~28000 IU/kg N8-GP; ~0.7 mg/kg PEG). One rat per time point was euthanised and carcasses were prepared for quantitative whole body autoradiography analysis. Radioactivity was measured by autoradiography (detection limit 0.114 µg eq/g tissue) for blood and tissues versus liquid scintillation counting for plasma (detection limit 0.001 µg eq/g).

図 2.4-13　選択した組織及び時点における PEG 濃度の時間推移

本試験における分布プロファイルは 40 kDa PEG 単体及び他の 40 kD PEG 化タンパク質で報告された分布プロファイルと同等であった[4,5,6,7]。

選択した組織（肝臓、腎臓、脾臓、脳、精巣、心臓、副腎及び骨髄）での選択した測定時点（1、24、96 時間）における顕微鏡レベルでの分布を評価するため、ミクロオートラジオグラフィ試験も実施した。全体として、ミクロオートラジオグラフィにより、同一器官における放射能を検出した定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験の結果が確認された。

2.4.3.4.2 代謝

代謝試験は実施しなかった。N8-GP のタンパク質部分は酵素によってアミノ酸に分解されると予期される。また、ノナコグ ベータ ペゴル（N9-GP、40 kDa PEG 化 rFIX）に関して、前述のとおりリンカーを含む PEG 部分は全体が尿及び糞中に排泄されると予期される[5]。遊離型 PEG を N8-GP の PEG 化重鎖から分離させる方法が確立できなかったことから、排泄物（血漿、尿及び糞便）を用いた代謝に関するデータは得られなかった。

2.4.3.4.3 排泄

ラットに N8-GP 0.17 mg/kg 又は 4.1 mg/kg を単回静脈内投与時の、排泄（マスバランス）に関する検討を行った（表 2.4-11）。

血漿、尿及び糞試料を投与後 12 週間まで採取した。排泄試験から、PEG 関連放射能は 12 週間にわたり尿（34～63%）及び糞便（33～38%）中に排泄されることが示された。内挿した N8-GP の PEG の平均回収率はそれぞれ 78%（4.1 mg/kg 投与群）及び 104%（0.17 mg/kg 投与群）であった（表 2.4-12）。分布試験で示されたように、PEG は 12 週間にわたり組織から緩徐に排泄されたものの、一部の組織では PEG 濃度が依然として定量可能であった。このことから、投与後 12 週時点で 6%の PEG 関連放射能が残屍中に残存していた。

表 2.4-12 PEG 部分を放射能標識した N8-GP を単回静脈内投与後の推定排泄回収率

	4.1 mg/kg N8-GP (~28000 IU/kg, PEG load of 700 µg/kg)	**0.17 mg/kg N8-GP (~1160 IU/kg, PEG load of 30 µg/kg)**
Urine[a]	34.2	62.7
Faeces	37.5	33.4
Carcass	5.9	7.4
Total	77.6	104

[a]Cage wash is included in urine.

高用量及び低用量で総回収率が異なる根拠は、代謝ケージ（特に大多数の PEG が排泄される初期段階）における総採取時間が限定的であったことにより、尿及び糞試料が不十分であったことに関連すると予測される。血漿中 PK データから、PEG 関連放射能の消失が初期段階で速いこと（投与後 1 週間以内に 50%が消失）が示されていることから、排泄物の大きな部分が試験中に失われ、低い回収率となった可能性がある。双方の試験において 12 週時点では同程度の PEG が残屍中に残存しており、いずれの用量でも同様の排泄パターンとなることが示唆された。

N8-GP、アディノベイト®/Adynovi®（20 kDa PEG 化 rFVIII 製剤）及び Bay 94-9027（60 kDa PEG 化 rFVIII 製剤）に用いられる 60 kDa PEG の排泄の回収率は同等である[8,9]。データから、排泄回収率は PEG の分子サイズと相関していることが示されている。アディノベイト®/Adynovi®、N8-GP 及び Bay

94-9027 に用いられる 60 kDa PEG を投与後、それぞれ 6、12、24 週時点の残尿中に 3、6 及び 4%の PEG 関連放射能が残存した。

結論として、N8-GP の 40 kDa PEG 部分は広く分布し、緩徐かつ経時的にすべての組織から尿及び糞中へ排泄されることが示された。

2.4.3.5 薬物相互作用

ヒト FVIII に特異的な薬物動態学的相互作用が認められておらず、予測もされていないことから、非臨床薬物相互作用試験は実施しなかった。N8-GP は薬物代謝 CYP450 酵素による代謝を受けず、かつ血漿タンパク質（アルブミン、α1-酸性糖タンパク質など）に結合しないと予測される。タンパク質／ペプチドに結合した PEG 部分に関連する薬物相互作用について文献報告は確認されていないことから、PEG 部分に起因する薬物相互作用は生じないものと予測される。

2.4.3.6 その他の薬物動態試験

タンパク質骨格を ^{125}I で標識した N8-GP（すなわち、分子のタンパク質部分を追跡する放射能標識体）を用いて、N8-GP タンパク質部分の *in vivo* での解剖学的組織分布及び肝細胞への分布を、いくつかの全身及び生理学的ラット肝灌流モデルで検討した。一部の検討には比較対照として N8 を含めた。

解剖学的組織分布試験において、大多数の放射能が血中で認められた。N8-GP の分布がみられた主たる器官は肝臓であり、1 時間未満の時点において、腸内で確認される放射能もあった。腎臓、脾臓及び肺では、初期の時点で微弱なシグナルが認められた。*In situ* 肝灌流モデルを用いた N8 及び N8-GP のクリアランスを比較すると、N8 は N8-GP の約 2.5 倍の速度で消失した。

肝細胞分画を単離した実験において、肝臓では、N8-GP は主として肝細胞及び肝類洞壁内皮細胞に分布し、クッパー細胞にはほとんど分布しないことが認められた。

In vitro 初代培養肝細胞では、N8-GP の特異的結合及び細胞への取り込みが N8 と比較して約 40%減少していることが確認された。

本データから、N8-GP のタンパク質部分は肝臓（代謝の重要な役割を担う肝細胞及び肝類洞壁内皮細胞を伴う）を介して消失することが示された。N8 と比較して、N8-GP の肝臓における代謝は遅く、N8-GP の血中循環の延長と一致するものであった。

2.4.4 毒性試験

2.4.4.1 毒性試験の概要

非臨床毒性試験プログラムは、薬理作用を有する 2 種類の動物種（ラット及びカニクイザル）を用いて実施した（表 2.4-13）。臨床適用経路が静脈内であることから、毒性試験における投与経路を静脈内とした。

表 2.4-13 毒性試験の概要

Discipline	Species	Doses tested (IU/kg)
Single-dose toxicity[a] (non-GLP)	Wistar rat	0; 20000; 25000
Pivotal repeat-dose toxicity[a] (GLP), NOAEL in bold		
2 weeks	Wistar rat	0; 100; 500; **2500** (every 2nd day)
26 weeks[b]	Rowett nude rat	0; 50; 150; 500; **1200** (every 4th day)
52 weeks[b]	Rowett nude rat	0; 50; 150; 500; **1200** (every 4th day)
2 weeks	Cynomolgus monkey	0; 100; 500; **2500** (every 3rd day)
Genotoxicity	No studies performed, justification provided in Section 2.4.4.5	
Carcinogenicity	No studies performed, justification provided in Section 2.4.4.6	
Reproductive and developmental toxicity	No studies performed, justification provided in Section 2.4.4.7	
Local tolerance (GLP)	Rabbit	20 (i.a., i.v., perivenous)
Other toxicity		
Immunogenicity (non-GLP)		
4-week PK and immunogenicity	Wistar rat	250 (twice weekly)
4-week PK and immunogenicity	Cynomolgus monkey	250 (twice weekly)
6-week PK and immunogenicity	Rowett nude rat	0, 50, 1500 (twice weekly)
Studies supporting an optimised manufacturing process (non-GLP)		
PD	F8-KO	0.25−4
PK	F8-KO	140
Immunogenicity	Rabbit	50 (twice weekly)

[a]Route of administration was i.v. [b]Data published in [10]. Further details can be found in Module 2.6.6. **Abbrevations:** GLP = Good Laboratory Practice; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; i.a. = intra-arterial(-ly); i.v. = intravenous(-ly); N/A = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level (indicated **bold** numbers in the table); PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s).

2.4.4.2 単回投与毒性

N8-GP は 25000 IU/kg までの単回投与に対し、概して良好な忍容性を示した。N8-GP 20000 IU/kg を単回投与したラット 1 例に肺の大血栓形成がみられた。この所見は、N8-GP の実験操作（尾静脈内投与）又は過剰な薬理作用に起因すると考えられた。

2.4.4.3 反復投与毒性

N8-GP は Wistar 系ラットにおける 2500 IU/kg（2 日に 1 回投与）までの 2 週間反復投与及び Rowett ヌードラットにおける 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）までの 26 及び 52 週間反復投与に対し、良好な忍容性を示した。カニクイザルにおいては N8-GP を 2500 IU/kg（3 日に 1 回投与）まで 2 週間投与した。反復投与毒性試験では、免疫原性に対する影響が認められなかったことに基づき、無毒性量（NOAEL）は各試験の最高用量であった。

ラット及びサルにおける反復投与後、抗薬物抗体が形成され、それぞれ投与 25 日及び 11~15 日後の曝露に影響が認められた（図 2.4-9）。このことは、N8-GP のヒト FVIII タンパク質がラット及びサルにおいて外来異種であることと一致している。カニクイザルにおいては抗薬物抗体と内因性 FVIII との交叉反応が認められ、その結果、後天性血友病様の変化が生じた。したがって、Wistar 系ラット及びカニクイザルにおける 2〜4 週間を超える長期毒性試験の実施意義はないものと考えられた。そこで、N8-GP（PEG を含む）の長期毒性を評価可能とするため、Rowett ヌードラットを導入して抗薬物抗体形成を最小限に抑えた。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており、T 細胞依存性の抗薬物抗体を形成しない。26〜52 週間の曝露後に抗薬物抗体を形成したラットが 4%以下とわずかであることから、Rowett ヌードラットが長期毒性試験に使用可能であることが確認された。

ラット及びサルにおける全用量群で N8-GP の薬理作用（APTT の短縮）が認められた。また、生体試料中薬物濃度測定法での LLOQ（250 IU/dL＋内因性 FVIII、LLOQ 範囲：582〜773 IU/dL）を下回る低用量群（150 IU/kg 以下）においても曝露が認められた。

EMA の推奨[3]に準拠し、PEG の分布を評価するため、Rowett ヌードラットを用いた N8-GP の反復投与毒性試験に脳組織の免疫組織化学的染色を組み込んだ。いずれの脳組織（脈絡叢を含む）においても PEG は検出されなかった。1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）を 26 週間及び 52 週間反復投与後、2 週間の回復性を評価した 52 週間長期毒性試験において、NMR を用いて血漿 PEG 濃度を測定した。PEG 濃度の測定値は LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。投与 52 週間後及び回復期間終了後の最終堵殺時に採取した脳脊髄液（CSF）試料においては、PEG は NMR では検出できなかった。

26 週間反復投与毒性試験において、Rowett ヌードラット 11/216 例（3/54 例：0 IU/kg、0/36 例：50 IU/kg、4/36 例：150 IU/kg、1/36 例：500 IU/kg、3/54 例：1200 IU/kg）に死亡がみられた。また、52 週間反復投与毒性試験では、44/258 例（13/66 例：0 IU/kg、6/42 例：50 IU/kg、7/42 例：150 IU/kg、8/42 例：500 IU/kg、10/66 例：1200 IU/kg）の死亡がみられた。免疫不全動物[11]で予期される所見から、これらの死亡の大多数は非特異的な炎症プロセス又は腫瘍発現に関連するものと考えられた。死亡は対照群及び投与群で同様であることから偶発的であり、投与に関連した所見ではないと考えられた。

免疫不全モデルではあるものの、26 週間又は 52 週間反復投与毒性試験を実施した Rowett ヌードラットのうち、少数（4%以下）に抗薬物抗体形成が認められた。抗薬物抗体が陽性であった動物はより APTT の延長及び曝露の低下が認められており、抗薬物抗体形成により N8-GP の薬理作用が減弱したことが示唆された。T 細胞欠損ヌードラットでは、加齢に伴い T 様細胞の増加が確認されており[11]、このことは試験において抗薬物抗体を形成した動物が少数例認められたことに一致するものであった。

免疫不全動物で予測されたとおり[11,12,13]、偶発的な腫瘍が全群（すなわち、対照群及び N8-GP の投与を受けた Rowett ヌードラットの双方）で認められた。投与に関連した所見は認められず、腫瘍の大部分は他のラット系統においても通常認められる自然発生性の所見であった（表 2.4-15 及び表 2.4-16）。

非臨床反復投与毒性試験の NOAEL における週 1 回投与量と小児及び成人における週 1 回の臨床予防投与量との比較を表 2.4-14 に示す。

表 2.4-14　非臨床投与量と小児及び成人への臨床投与量の比較

Study	Species	NOAEL	Corresponding weekly dose at NOAEL (IU/kg/week)	Children[a]		Adults[b]	
				Multiples of clinical dose 150 IU/kg/week	Multiples of clinical dose based on HED[c]	Multiples of clinical dose 100 IU/kg/week	Multiples of clinical dose based on HED[c]
2 weeks	Rat	2500 IU/kg every 2nd day	8750	58	9	88	14
26 weeks	Rat (nude)	1200 IU/kg every 4th day	2100	14	2	21	3
52 weeks	Rat (nude)	1200 IU/kg every 4th day	2100	14	2	21	3
2 weeks	Monkey	2500 IU/kg every 3rd day	5833	39	12	58	19

[a]Weekly prophylactic dose in children of 60 (50−75) IU/kg twice weekly is up to ~150 IU/kg/week. [b]Weekly prophylactic dose in adults with 50 IU/kg every 3−4 days is ~100 IU/kg/week. [c]HED: Human equivalent dose based on body surface area basis is calculated by multiplying dose with 0.32 (monkey) and 0.16 (rat).
Abbreviations: NOAEL = no observed adverse effect level.

2.4.4.4 局所刺激性

局所刺激性は、反復静脈内投与毒性試験の一部として、ウサギにおける静脈内投与、動脈内投与、静脈周囲投与による局所刺激性試験で評価した。N8-GP 投与の結果、局所反応は軽度であるか又は認められなかった。

2.4.4.5 遺伝毒性

ICH S6（R1）の推奨に準拠して、*in vivo* 又は *in vitro* 遺伝毒性試験は実施しなかった[1]。N8-GP（216 kDa）のような非常に大きな分子が DNA 又は他の染色体物質と相互作用を起こす可能性は非常に低いと考えられている[14]。

N8-GP では、シアル酸にリンカーであるグリシンを介して分岐した 40 kDa PEG が rFVIII に附加されている。グリシン及びシアル酸は内因性構造であることから、変異原性を有することは考えられない[1]。リンカー（グリシン）、シアル酸及び PEG 部分に関し、[redacted]及び[redacted]〔[redacted]〕が Ames 試験で検討されており、陰性の結果であった[15]。加えて、リンカーであるグリシンについて Derek 解析を行ったが、危険性は警告されなかった[16]。

さまざまな市販製品において、5～40 kDa PEG 部分の変異原性及び染色体異常誘発能が評価されている。これらの市販製品又は PEG に変異原性又は染色体異常有誘発性の兆候は認められなかった[17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27]。

2.4.4.5.1 2 種類の遺伝毒性不純物の評価

Derek 解析により、N8-GP 製造工程で使用されている 2 種の試薬[redacted]（[redacted]）及び[redacted]（[redacted]）からそれぞれ生じた残留不純物の染色体損傷能[28]が示唆された。このことは、チミン、シトシン又はこれらの構造内の誘導体群に起因するものと考えられる。これらの潜在的遺伝毒性不純物の臨床曝露は、DNA 反応性不純物に対する毒性学的懸念の閾値（TTC、1.5 µg／ヒト／日[29]）以下であると評価され、安全性上の懸念はないと考えられた。詳細は Module 3.2.S.4.5 を参照のこと。

2.4.4.6 がん原性

N8-GP のがん原性に関する懸念は確認されていない。

2.4.4.6.1 血液凝固第 VIII 因子

FVIII の変異原性又は細胞増殖能を示唆する作用機序データはみられない。N8-GP の rFVIII が内因性 FVIII と異なる生物学的特性を持つことを示唆する *in vitro* 又は *in vivo* の証拠は認められていない。さらに、N8-GP は慢性的欠乏患者の補充療法での適用を目的としており、予防治療に適用される週 2 回投与時の血漿中活性レベルは生理的な正常範囲内又はそれよりも低くなる。

2.4.4.6.2 ポリエチレングリコール（PEG）

多数の PEG 化製剤が承認されているが、承認された製品の大半で *in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験が実施されており、すべて陰性の結果であった [17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27]。Omontys®（40 kDa PEG 赤血球生成促進剤）について実施したがん原性試験では、がん原性陰性の結果であった [17,27]。Somavert®（5 kDa PEG ヒト成長ホルモンアナログ）では、2 年間の連日皮下投与後、注射部位に腫瘍が認められたが、局所刺激性により生じたものと考えられた [19]。これらの試験結果から、5～40 kDa PEG は変異原性又はがん原性リスクを有さないことが示された。

2.4.4.6.3 N8-GP－反復投与毒性試験

がん原性リスク増加を示唆する兆候は反復投与毒性試験では示されなかった。適切な動物モデルにおける標準的な反復投与毒性試験は、がん原性リスク増加の兆候を見出す上で有用である[30]。器官重量の増加、組織過形成、細胞増殖、免疫抑制又は内分泌／ホルモン変化の観察から、がん原性の懸念の増加が示唆される場合がある。26 週間又は 52 週間投与の Rowett ヌードラットにおける毒性試験ではいずれにおいても、そのような所見は認められなかった。対照群との比較による群間差は、すべて軽微又は用量相関性のない正常な変動の範囲内であった。免疫不全動物については予期されたとおり [12,13]、多数の偶発的腫瘍が全群（対照群及び N8-GP 投与群）でみられた。投与に関連した兆候はなく、腫瘍は他のラット系統においても通常認められる自然発生性の所見であった（表 2.4-15 及び表 2.4-16）。Rowett ヌードラット系統では Hanes によって報告されているが [11]、得られる背景データが限られていることから、他のラット系の背景データを参考として使用する。

表 2.4-15　Rowett ヌードラットを用いた 26 週間反復投与毒性試験で認められた腫瘍

Tumour type	Control	50 IU/kg	150 IU/kg	500 IU/kg	1200 IU/kg	Literature reference for background finding in rats
Brain, M-astrocytoma	-	1	-	-	-	[31,32,33]
Brain, B-haemangioma	1	-	-	-	-	[31,34]
Adrenal, B-cortical adenoma	1	-	-	-	-	[34]
Mammary gland, M-adenocarcinoma	-	-	-	-	1	[32,34,35]
Ovary, B-luteoma	-	-	1	-	-	[36,37]
Hemopoietic system, M-lymphoma	1	-	-	-	-	[32,33,34]
Total no. of tumours	3	1	1	0	1	N/A
Total no. of animals examined	54	36	36	36	54	N/A

Abbreviations: B = benign tumour; M = malignant tumour; N/A = not applicable.

表 2.4-16　Rowett ヌードラットを用いた 52 週間反復投与毒性試験で認められた腫瘍

Tumour type	Control	50 IU/kg	150 IU/kg	500 IU/kg	1200 IU/kg	Literature reference for background finding
Brain, M-oligodendroglioma	-	2	-	-	-	[31,32,33,35]
Brain, M-sarcoma	1	-	-	-	-	[32]
Adrenal, B-pheochromocytoma	2	-	-	-	-	[34]
Hemopoietic system, M-lymphoma	-	3	2	-	-	[32,33]
Pituitary, B-adenoma pars distalis	1	-	-	-	1	[32,33,34,35]
Oesophagus, M-squamous cell carcinoma	-	-	-	-	1	[38]
Tongue, M-squamous cell carcinoma	-	-	1	-	-	[34]
Skin/subcutis, M-sarcoma	1	-	1	-	-	[33,34]
Thyroid, B-follicular cell adenoma	1	1	-	-	-	[34]
Thyroid, B-c-cell adenoma	-	-	-	-	1	[34]
Mammary gland, B-fibroadenoma	-	1	-	-	-	[32,33,34,35]
Ovary, B-granular cell tumour	1	-	-	-	-	-
Uterus, B-endometrial polyp	1	1	-	-	2	[34,39]
Ear, B-melanoma	-	-	-	-	1	[40]
Total no. of tumours	8	8	4	0	6	N/A
Total no. of animals examined	66	42	42	42	66	N/A

Abbreviations: B = benign tumour; M = malignant tumour; N/A = not applicable.

2.4.4.6.4 文献検索

PEG 及び FVIII について、がんに関連する以下の検索条件[cancer（がん）、oncology（腫瘍学）、neoplasm（新生物）、tumour（腫瘍）、metastasis（転移）、angiogenesis（血管形成）、leukemia（白血病）、lymphoma（リンパ腫）、sarcoma（肉腫）、adenoma（腺腫）、mitogenicity（有糸分裂促進性）、pre-cancer（前がん状態）、multiplication（増殖）、proliferation（増殖）、malign（悪性）]で、2017 年に文献検索を行った[41,42]。文献検索は、Embase®、MEDLINE®、BIOSIS Previews®、Current Contents® search のデータベースに基づいて行った。FVIII 又は PEG のいずれにもがん発現リスクの増加に関連する懸念要因は認められなかった。

PEG 化製剤に関連する検索における大半の文献では、検索条件〔cancer（がん）〕に関係するものは製剤のタンパク質部分の作用機序又は化合物の適用に関するものであった。タンパク質に附加された PEG 部分に関連する懸念要因は認められなかった。

FVIII に関連する文献検索では、血友病 A 患者に対する血漿又は rFVIII による補充療法における懸念要因は示されなかった。

2.4.4.7 生殖発生毒性

N8-GP について生殖発生毒性試験は実施しなかった。血栓形成は過剰な薬理作用、すなわち、凝固カスケードの活性化と一致する。複数の文献から、血栓形成は、流産等のリスク要因の一つとなることが知られている[43,44]。N8-GP の 20000 IU/kg を単回投与したラットの 1 例に肺の大血栓形成が認められていることから、非常に高用量の N8-GP を正常動物に投与する生殖発生毒性試験を実施した場合には、上記の有害影響が想定されると考えられる。なお、性成熟した雌雄 Rowett ヌードラットを用いて 4 日に 1 回、最大 1200 IU/kg の用量で 26 及び 52 週間反復毒性試験を実施したが、病理組織学的検査で生殖器官における有害影響は認められなかった。また、複数の毒性試験に用いる標準的な動物種において、FVIII 製剤の曝露により抗 FVIII 抗体が形成されることが知られている。N8-GP の試験から、サル及びラットでは、曝露の検出を阻害する抗 FVIII 抗体の増加が投与 10 日付近で認められることが明らかにされた。

以上のことから、正常動物モデルを用いて N8-GP の生殖発生毒性試験を実施する意義はないと考える。

2.4.4.7.1 幼若動物を用いた試験

ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験において標的器官が特定されなかったため、小児への関連性を示唆する毒性は確認されていない。PEG に関連する可能性のある安全性の懸念については、N8-

GP を 52 週間まで投与した長期毒性試験において確認された；高感度 IHC による検査で脳組織（脈絡叢を含む）に PEG は検出されず、いずれの組織中においても投与に関連する空胞形成はみられなかった。反復投与毒性試験は小児、青年及び成人年齢を網羅していた（表 2.4-17）。したがって、幼若動物を用いた試験は必要ないと考えられた。

表 2.4-17　　反復投与毒性試験に用いた動物種の年齢及びヒト相当年齢

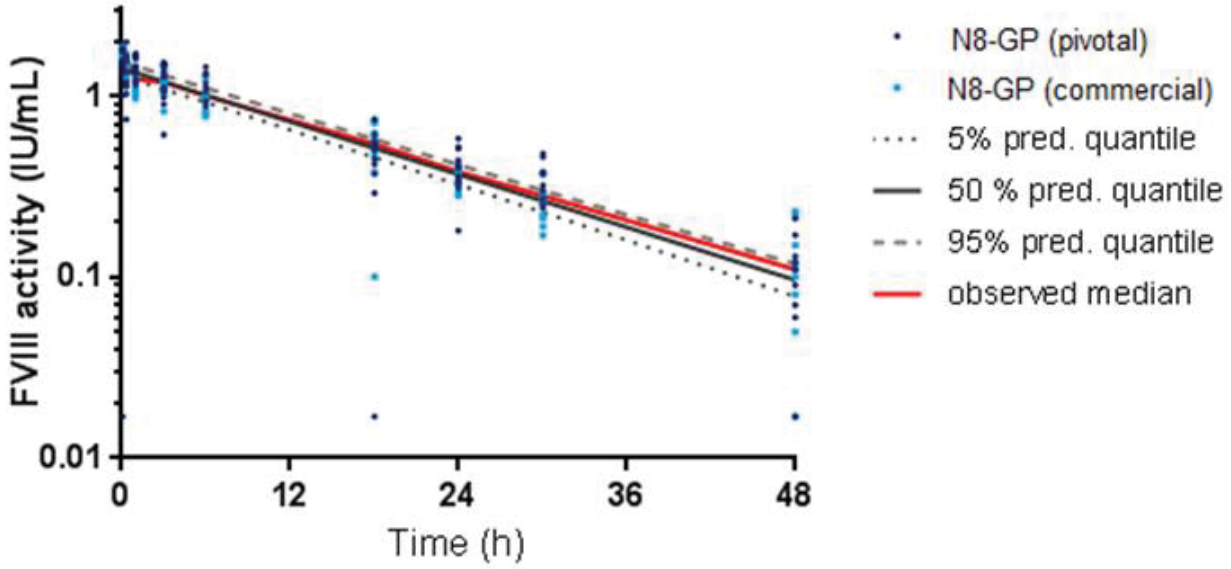
Study	Species	Age of initiation	Age at end of study	Corresponding human age
2 weeks	Wistar rat	10 weeks	15 weeks	Adolescent
26 weeks	Rowett nude rat	7−11 weeks	59−63 weeks	Adolescent and adult
52 weeks	Rowett nude rat	8−16 weeks	72−80 weeks	Adolescent and adult
2 weeks	Cynomolgus monkey	2−3 years	2−3 years	Juvenile (8−12 years)

Note: *Cynomolgus monkey:* Infant up to 8 month, juvenile up to 3 years, adolescent 3−5 years, adult > 5 years [45,46]. A general rule of thumb is that 1 monkey year corresponds to 4 human years. *Rat:* Infant 0−3 weeks, juvenile 3−6 weeks, adolescent 6−26 weeks, ½−1 year ~18−30 years, 1−1.5 years ~30−45 years [46,47].

2.4.4.8　その他の毒性試験

2.4.4.8.1　　製造工程の最適化を裏付ける非臨床試験

N8-GP の臨床開発期間中、原薬製造工程を変更し、[redacted]から[redacted]へ[redacted]した。3 種の非臨床試験（薬効、PK 及び免疫原性）を実施し、変更前後における N8-GP 製剤の比較を行った。薬効、PK 及び免疫原性について、製造工程の最適化前後において同等であることが確認された。工程を最適化した製剤を第 3 相試験に導入した。変更前後における F8-KO マウスの PK を図 2.4-14 に示す。品質の同等性・同質性パッケージの詳細は Module 3.2.S.2.6 を参照のこと。



Note: Observed FVIII activity versus time after i.v. administration of 140 IU/kg N8-GP in F8-KO mice, including 90% CI for the median prediction. Pivotal: N8-GP for the development phase. Commercial: N8-GP for the commercial phase.
Abbreviations: CI = confidence interval; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; FVIII = coagulation factor eight.

図 2.4-14　工程の最適化前（[redacted]実生産工程）及び最適化後（[redacted]実生産工程）における N8-GP 原薬を F8-KO マウスに静脈内投与後の FVIII 活性の経時変化

2.4.4.9　重要な非臨床試験に用いた原材料及び規格限度値の比較

各開発フェーズの臨床試験を支持する重要な非臨床試験に用いたロットの概要を表 2.4-18 に示す。

重要な非臨床試験に用いたロットにおける不純物含量について、規格限度値の原薬（DS）の許容基準案（表 2.4-19）及び製剤（DP）の申請有効期間内（EOSL）規格案（表 2.4-20）との比較を行った。

非臨床試験に用いたロットは各開発ステージにおける製造工程を反映する。臨床投与量よりも高用量を動物に投与した際の投与量（IU/kg）に基づき、表中の不純物は非臨床試験で安全性が確認された。非臨床データから不純物の毒性が示唆されているが、臨床における免疫原性を予測するものではない[1,48]。表中の不純物の潜在的リスクは免疫原性であると考えられるため、規格限度値の正当性も臨床データに基づくものとする（Module 5.3.5.3 を参照）。非臨床試験において毒性は確認されなかった。

表 2.4-18　重要な毒性試験（GLP 適用）及び製造工程の変更を支持する試験において用いた非臨床試験ロットの概要

Batch	API batch no.	Study ID	Type of study	Other use of batch[a]
[redacted]	[redacted]	209355	2-week repeat-dose toxicity, rat	Only used nonclinical
		209350	2-week repeat-dose toxicity, monkey	
		209355	2-week repeat-dose toxicity, rat	
		212512	26-week repeat-dose toxicity, rat	Clinical trials Stability studies Setting specifications
		213109	52-week repeat-dose toxicity, rat (batch used in weeks 1−50)	
		213109	52-week repeat-dose toxicity, rat (batch used in weeks 51−52)	Clinical trials Stability studies Setting specifications
	[redacted] (before change)	[redacted]	Comparative PD, F8-KO mouse	Clinical trials, Process justification Stability studies Setting specifications
			Comparative PK, F8-KO mouse	
	[redacted] (after change)		Comparative PD, F8-KO mouse	Clinical trials Stability studies Setting specifications
			Comparative PK, F8-KO mouse	

[a]Further details can be found in 3.2.S.2.6 Manufacturing Process Development. [b]DS batch provided for study, DP formulated on site prior to dosing animals. **Abbreviations:** DP = drug product; DS = drug substance; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; N/A = not applicable; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s).

表 2.4-19　重要な非臨床試験ロットにおける原薬の許容基準及び含量

Process-related impurities	Analytical method	Drug substance acceptance criteria[a]	Batch [redacted]	Batch [redacted]	Batch [redacted]	Batch [redacted]	Batch [redacted]	Batch [redacted]
HCP (ppm)	Y9-442	[redacted]						[b]
Anti FVIII antibody leakage (ppm)	Y9-443							
Residual [redacted] (ppm)	M105							
Residual [redacted] (ppm)	M086							
Residual [redacted] (ppm)	M049							

[a]Further details can be found in 3.2.S.4.5 Justification of Specification for Drug Substance. [b]HCP is measured in N8 intermediate, and batch [redacted] consists of three N8 intermediate batches.

Abbreviations: HCP = host cell protein; ND = not detected; ppm = parts per million.

表 2.4-20　重要な非臨床試験ロットにおける目的物質関連不純物、申請有効期間内規格案及び含量

Product-related impurity	Analytical method	DP EOSL specification[a]	Batch [redacted][d]	Batch [redacted][d]	Batch [redacted]	Batch [redacted]	Batch [redacted][b]	Batch [redacted][b]
Purity (%)	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
∗不純物2(%)			[redacted][c]	-	[redacted]			
∗不純物1 (%)			-	-	[redacted]			

[a]Further details can be found in 3.2.P.5.6 Justification of Specification for Drug Product. [b]Information based on DS, DS batch provided for study, which was formulated on site prior to dosing animals. [c] Information from study documentation sheet. [d]3.2.P.5.4 Batch Analysis for Drug Product. **-** = no information.

Abbreviations: DP = drug product; EOSL = end-of-shelf-life; ∗不純物2 [redacted]; [redacted]

[redacted]

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.4.5　PEG 安全性

N8-GP を 52 週間まで投与した長期毒性試験において、PEG に関連した安全性の懸念は認められず、非常に頑健な N8-GP の非臨床安全性評価が示された。さらに、N8-GP の PEG はすべての組織から経時的に消失し、尿及び糞中に排泄されることが示された。

PEG は添加剤又は薬物附加体として、食品、化粧品、医薬品に広く使用されている[49,50,51,52,53,54,55]。PEG 化は十分に確立された技術であり、薬物の循環血中半減期を延長するため一般的に用いられている[49,50,51,52,55]。多数の PEG 化製剤が市販又は開発されており、PEG の非臨床プロファイルが十分明らかになっている[49,50,51,52,54,55]。臨床的に意味のある用量において、PEG は不活性であり機能変化又は毒性学的に意味のある変化は認められない[50,51,52,54,55,56,57]。PEG が附加されている治療用タンパク質は薬理作用及び毒性作用を示すと考えられるが、全身での薬効の延長以外に、PEG の相加作用はほとんどあるいは全くないと考えられる[55]。一部の毒性試験において高用量の PEG を投与した結果、異なるサイズの PEG 部分に起因する細胞内空胞形成が認められた[49,50,55,57]。本所見は主に、種々の組織及び排出器官（腎臓、肝臓、脈絡叢など）のマクロファージにおいてみられた[49,55,57]。PEG に関連した空胞形成が認められたものの、炎症、変性、壊死といった細胞反応は誘発されず、動物における有害作用又は *in vivo* での機能変化にも関連しなかった[49,50,55]。

ラット及びサルを用いた N8-GP の毒性試験において（ラットは 52 週間まで投与）、投与に関連した細胞内空胞形成はみられなかった。52 週間の長期毒性試験を実施した Rowett ヌードラットの脳組織（脈絡叢を含む）に対して、PEG を高感度に検出する IHC 染色技術を用いて、潜在的な N8-GP の PEG 分布を評価したが、いずれの脳組織（脈絡叢を含む）においても PEG は検出されなかった。1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）を 26 週間及び 52 週間反復投与後、2 週間の回復性を評価した 52 週間長期毒性試験において、NMR を用いて血漿中 PEG 濃度を測定した。PEG 濃度の測定値は LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。投与 52 週間後及び回復期間終了後の最終堵殺時に採取した CSF 試料を NMR で測定したが、PEG は検出できなかった。

小児及び成人に対する定期補充投与における N8-GP 投与時の臨床における PEG 用量は 2.5～3.0 µg/kg/週であり、これは複数の承認済み PEG 化製品と比較して低値である（表 2.4-21）。

表 2.4-21　N8-GP 及び承認済み PEG 化生物製剤における 1 週間あたりの推定 PEG 用量

Product	Typical dose	Clinical PEG exposure per week[a]	PEG size	Indication	First approval year in EU, US and Japan
Krystexxa®	8 mg	12000 µg/kg	10 kDa	Chronic gout	2010 (US)
Oncaspar®	4000 IU[b] (~47 mg)	1000 µg/kg	5 kDa	Leukemia	1994 (US), 2016 (EU)
Somavert®	10 mg	980 µg/kg	5 kDa	Acromegaly	2002 (EU), 2003 (US), 2007 (Japan)
Cimzia®	400 mg	725 µg/kg	40 kDa	CD, RA, PsA, AS[c]	2008 (US), 2009 (EU), 2012 (Japan)
Refixia®/Rebinyn®	2400 IU[b]	230 µg/kg	40 kDa	Haemophilia B	2017 (EU and US) 2018 (Japan)
Neulasta®	6 mg	33 µg/kg	20 kDa	Neutropenia	2002 (EU and US), 2014 (Japan)
Adynovate®/ Adnynovi®	4.2 mg[b]	15 µg/kg	20 kDa	Haemophilia A	2015 (US), 2016 (Japan), 2017 (EU)
N8-GP	50-60 IU/kg	2.5−3.0 µg/kg	40 kDa	Haemophilia A	N/A
Pegasys®	0.18 mg	2 µg/kg	40 kDa	Hepatitis C & B	2002 (EU and US), 2003 (Japan)
Macugen®	0.3 mg	0.7 µg/kg	40 kDa	AMD	2004 (US), 2006 (EU), 2008 (Japan)
Plegridy®	125 µg	1 µg/kg	20 kDa	Multiple sclerosis	2014 (EU and US)
Mircera®	0.036 mg[b]	0.1 µg/kg	30 kDa	Renal anemia	2007 (EU and US), 2011 (Japan)
PegIntron®	0.064 mg[b]	0.4 µg/kg	12 kDa	Hepatitis C	2000 (EU), 2001 (US), 2004 (Japan)
Adagen®	1200 IU[b]	Not available	5 kDa	Immunodeficiency	1990 (US)

Note: The list is adopted and modified from Stidl et al., 2016 [50] and Ivens et al., 2015 [55].
[a]Weekly PEG exposure is calculated based on adult with 60 kg body weight [50]. [b]Dose is based on a 60 kg person. [c]Approved for rheumatoid arthritis (RA) in Japan.
Abbreviations: AMD = age-related macular degeneration; AS = ankylosing spondylitis; CD = Crohn's disease; N/A = not applicable; PsA = psoriatic arthritis; RA = rheumatoid arthritis.

組織中の臨床における PEG 濃度は、PEG 部分を放射能標識した N8-GP をラットへ単回投与した分布及び排泄試験において、40 kDa PEG 部分が認められた組織中の PEG 濃度及び PK に基づいて推定された。これらのデータから、組織中の PEG の終末相半減期及び定常状態に至る時間も推定した。組織中の PEG の終末相半減期は、ラット分布試験から得られた消失期の測定データの回帰直線にフィッティ

ングさせる標準的な方法を用いて推定された。定常状態に至る時間は半減期にのみ依存することから、各組織について t½を 3.3 で乗じて算出した[58]。血漿中組織モデルを作成し、ラット及びヒトにおける反復投与後の血漿及び PEG 濃度を予測した（詳細は Module 2.6.4.6.1 を参照）。

ラットでは、52 週間反復毒性試験（有害影響は認められず）の期間中に、すべての組織が定常状態に達すると予測された。

ラットにおける血漿及び組織中の定常状態 PEG 濃度は、小児及び成人への予防治療から得られた定常状態推定濃度の 2～4 倍高値になると考えられた。N8-GP を投与した患者における安全性の懸念は確認されなかった。投与された合計 270 例の被験者のうち、192 例（63 例の小児を含む）は 3 年以上、135 例（12 例の小児を含む）は 4 年以上、16 例（小児を含まず）は 5 年以上投与された。

1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）における非臨床での定常状態の PEG 濃度の測定値は、NMR 法における LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。臨床での PEG 濃度については、非臨床での定常状態の PEG 濃度（すなわち 0.2 µg/mL 未満)より 2～4 倍低値になると予測されたため、現行の NMR 法では検出できない。N8-GP の定期補充療法における定常状態の PEG 濃度は、Rebinyn®/レフィキシア®の小児への投与〔週 1 回投与、4.5 年まで（~5 µg/mL）〕及びシムジア®の妊婦への投与（~30 µg/mL [59]）で測定された PEG 濃度より非常に低くなると予測される。Rebinyn®/レフィキシア®の臨床開発プログラムにおいて、PEG に関連した安全性の問題は確認されなかった[60,61]。163 の対照試験及び 46 の非盲検試験を含むコクランレビューを用いて、シムジア®投与後に報告された有害事象と 4 種の市販されている PEG 非含有の抗 TNFα 製剤（エタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、ゴリムマブ）で報告された有害事象の比較が行われている[62]。評価の結果、有害事象全体の発現率又は有害事象に起因する被験者の試験中断率においてシムジア®と他の 4 種の抗 TNF 薬剤間に顕著な差異は認められなかった。また、シムジア®投与中に報告された有害事象の大多数は軽度又は中程度であり、PEG ではなく TNFα の影響に関連していた [62,63]。したがって、N8-GP の PEG に関連した安全性の所見のリスクは低いと考えられる。

N8-GP 及び N9-GP における非臨床安全性パッケージの総合比較を Study 301507（Module 4.2.3.7.7）に含めた。

2.4.6　総合的考察及び結論

2.4.6.1 概要

血友病 A 患者において、出血時・手術時治療及び出血エピソードへの予防治療における投与頻度を減らし、かつ FVIII 効果持続時間を延長する目的で、N8-GP を開発した。

効力を裏付ける試験から、N8-GP の作用機序及び目的とする作用持続時間の延長が確認された。

2500 IU/kg 以上の投与においても、安全性薬理評価項目（血圧、心電図、呼吸数、体温、神経学的／CNS 評価項目の観察及び尿検査）への影響はみられなかった。

N8-GP は rFVIII と比較してクリアランスが約 2 倍減少した結果、$t_{½}$が約 2 倍延長したことが示された：双方の分布容積は同等であった。35～280 IU/kg の範囲で投与を行った F8-KO マウスにおいて、N8-GP が用量比例性であることが示された。さらに、N8-GP の PK は動物種間でアロメトリックスケーリングが示された。

反復投与後に中和抗体が形成され、Wistar 系ラット及びカニクイザルへの投与期間（2～4 週間）をとおして曝露が減少した。長期曝露後の毒性を評価するため、Rowett ヌードラットを導入して T 細胞依存性の免疫反応を回避した。長期曝露については、Rowett ヌードラットへの最大 52 週間までの投与において確認された。

N8-GP の PEG 部分は広く分布し、緩徐に血漿及び組織から排出され、尿及び糞中へ排泄されることが示された。

N8-GP は Wistar 系ラットにおける 25000 IU/kg までの単回投与及び 2500 IU/kg（2 日に 1 回投与）までの 2 週間反復投与、Rowett ヌードラットにおける 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）までの最長 52 週間反復投与に対し、良好な忍容性を示した。カニクイザルにおいては、N8-GP を 2500 IU/kg（3 日に 1 回投与）まで 2 週間投与した。すべての反復投与毒性試験において、免疫原性に対する影響が認められなかったことに基づき、各試験における最高用量が NOAEL であった。

PEG に関連する可能性のある N8-GP における長期毒性試験において、安全性の懸念は認められなかった。脳組織（脈絡叢を含む）に対して、PEG を高感度に検出する IHC 染色技術を用いて、脳における潜在的な PEG の分布を評価した。1200 IU/kg まで 52 週間反復投与（4 日に 1 回投与）後のいずれの脳組織においても、N8-GP の PEG は検出できなかった。52 週間長期毒性試験において、NMR による血漿中 PEG 濃度の測定値は LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。CSF 試料においては、PEG は検出できなかった。

N8-GP の遺伝毒性又は発がん性における懸念要因は認められなかった。

性成熟に達したラットにおける病理組織学的評価から、生殖器官への有害な影響の兆候はみられなかった。毒性試験は幼若期、青年期及び成熟期の動物を網羅しており、標的器官は特定されなかった。したがって幼若動物を用いた毒性試験は必要ないと考えられ、実施しなかった。

局所刺激性については、ラット及びカニクイザルにおける反復投与毒性試験ならびにウサギにおける局所刺激性試験の一部として評価された。N8-GP 投与の結果、局所反応は軽度であるか、又は認められなかった。

2.4.6.2 総括

ノボ ノルディスク社は、非臨床プログラムから、血友病 A 患者における長期使用を支持するための N8-GP の安全性は十分明らかにされたと考える。

参考文献

[1] ICH S6(R1). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.
[2] ICH M3(R2). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. 11 June 2009.
[3] EMA. CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediactric population. EMA/CHMP/SWP/647258/2012. 16 November 2012.
[4] Bjornsdottir I, Sternebring O, Kappers WA, Selvig H, Korno HT, Kristensen JB, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of 40kDa PEG and PEGylated rFVIII (N8-GP) in rats. Eur J Pharm Sci. 2016;87:58-68.
[5] Sternebring O, Christensen JK, Bjornsdottir I. Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and metabolite profiling of PEGylated rFIX (nonacog beta pegol, N9-GP) in rats. Eur J Pharm Sci. 2016;92:163-72.
[6] Woodburn KW, Fong KL, Wilson SD, Sloneker S, Strzemienski P, Solon E, et al. Peginesatide clearance, distribution, metabolism, and excretion in monkeys following intravenous administration. Drug Metab Dispos. 2013;41:774-84.
[7] Cai Y, Zhang Z, Fan K, Zhang J, Shen W, Li M. Pharmacokinetics, tissue distribution, excretion, and antiviral activity of pegylated recombinant human consensus interferon-alpha variant in monkeys, rats and guinea pigs. Regul Pept. 2012;173:74-81.
[8] Stidl R, Siekmann J, Culbertson S, Kozlowski A, Bossard M, Rottensteiner H et al. Absorption, metabolism, distribution, and excretion of PEGylated varian of recombinant factor FVIII following intravenous administration to rats. In: Haemophilia. Abstracts and poster TU-039 Int Congress of the World Federation of Haemophilia; 2012 July 8-12; Paris, France. p. 34-5, incl. 2 photos of poster.
[9] Baumann A, Schwarz T, Hucke F, Piel I, Sandmann S. Excretion and Distribution of the 60-kDa Moiety Used in BAY 94-9027 in Male Wistar Rats. IN: ASH 59th Annual Meeting and Exposition. 2017 Dec 9-12; Atlanta, USA. [cited 18th Dec 2017]. Available from https://ash.confex.com/ash/2017/webprogram/Paper104181.html.
[10] Rasmussen C, Nowak J, Larsen JM, Moore E, Bell D, Liu KC. Long-Term Safety of PEGylated Coagulation Factor VIII in the Immune-Deficient Rowett Nude Rat. J Tox 2017;1-13.
[11] Hanes MA. The Nude Rat. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. The Laboratory Rat. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2006. p. 733-59.
[12] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991-8.
[13] Mueller BU, Pizzo PA. Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. J Pediatr. 1995;126(1):1-10.
[14] Sawant SG, Fielden MR, Black KA. Evaluation of genotoxicity testing of FDA approved large molecule therapeutics. Regul Toxicol Pharmacol. 2014;70(1):87-97.
[15] Williams L. Reverse mutation in four histidine-requiring strains of *Salmonella typhimurium* and two tryptophan-requiring strains of *Escherichia coli* using a treat and plate methodology. Study No. 665/934, Sponsor's Ref. No. 207397. 2008.
[16] Davies F. DEREK for Windows 11.0.0. FVII Peg Linker. Study No. 8203015. Sponsor's Ref. No. 209089. 2009.
[17] FDA. Omontys®: Pharmacology Reviews. Application Number: 202799Orig1s000. 27 February 2012.
[18] FDA. Somavert®: Pharmacology Reviews. Application Number 21-106. 27 November 2002.
[19] FDA. Somavert®: Highlights of Prescribing Information (Label). Revised: 4/2016.
[20] EMA. PegIntron®: EPAR - Scientific Discussion. EMEA 2005.
[21] EMA. Macugen®: EPAR - Scientific Discussion. EMEA 2006.
[22] FDA. Macugen®: Pharmacology Reviews. Application Number 21-756. 17 March 2004.
[23] EMA. Pegasys®: EPAR - Scientific Discussion. EMEA 2005.
[24] FDA. Pegasys®: Summary Pharmacology/Toxicology Review of PEGASYS® for Hepatitis C. RMS BLA # 103964. 19 February 2001.

[25] FDA. Cimzia®: Pharmacology Reviews. BLA 125160/0. 18 April 2008.
[26] EMA. Cimzia®: Assessment Report. Procedure Number EMEA/H/C/001037. EMEA/664021/2009.
[27] FDA. Omontys®. Highlights of Prescribing Information (Label). Reference ID: 3107278. Revised: 03/2012.
[28] Derek in silico evaluation of [redacted] og [redacted].
[29] ICH M7. Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. 23 June 2014.
[30] Vahle JL, Finch GL, Heidel SM, Hovland DN, Jr., Ivens I, Parker S, et al. Carcinogenicity assessments of biotechnology-derived pharmaceuticals: a review of approved molecules and best practice recommendations. Toxicol Pathol. 2010;38(4):522-53.
[31] Gopinath C. Spontaneous brain tumours in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol. 1986;24(2):113-20.
[32] Son WC, Bell D, Taylor I, Mowat V. Profile of early occurring spontaneous tumors in Han Wistar rats. Toxicol Pathol. 2010;38(2):292-6.
[33] Son WC, Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2004;32(4):371-4.
[34] Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Chu KC, Linhart MS. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1979;48(2):237-48.
[35] Ikezaki S, Takagi M, Tamura K. Natural Occurrence of Neoplastic Lesions in Young Sprague-Dawley Rats. J Toxicol Pathol. 2011;24(1):37-40.
[36] Lewis DJ. Ovarian neoplasia in the Sprague-Dawley rat. Environ Health Perspect. 1987;73:77-90.
[37] Alison RH, Morgan KT. Ovarian neoplasms in F344 rats and B6C3F1 mice. Environ Health Perspect. 1987;73:91-106.
[38] Deschl U, Schaetti P, Krinke G. Spontaneous metastasizing squamous cell carcinoma of the oesophagus in a Sprague Dawley rat. Exp Toxicol Pathol. 1997;49(1-2):123-7.
[39] Davis B. Endometrial stromal polyps in rodents: biology, etiology, and relevance to disease in women. Toxicol Pathol. 2012;40(3):419-24.
[40] Zurcher C, Roholl PJM. Melanocytic Tumors, Rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, ed. Integument and mammary glands. Springer Verlag; 1989. p. 70-86.
[41] CASE 0031848 Search Strategy from ProQuest Dialog Pegylated products 19 june 2017.
[42] CASE 0031848 Search Strategy from ProQuest rFVIII long-acting and pdFVIII search 20 june 2017.
[43] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7 (6): 330-339.
[44] Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2007; 109 (5): 1146-1155.
[45] Morford LL, Bowman CJ, Blanset DL, Bogh IB, Chellman GJ, Halpern WG, et al. Preclinical safety evaluations supporting pediatric drug development with biopharmaceuticals: strategy, challenges, current practices. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2011;92(4):359-80.
[46] Stannard D. Neonatal and Juvenile toxicology - study design considerations based on our experience at Envigo. Dev Lifesci;13(5).
[47] Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 2013;4(6):624-30.
[48] FDA. Guidance for Industry. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. August 2014.
[49] Ivens IA, Bauman A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. Haemophilia. 2013;19:11-20.
[50] Stidl R, Fuchs S, Bossard M, Siekmann J, Turecek PL, Putz M. Safety of PEGylated recombinant human full-length coagulation factor VIII (BAX 855) in the overall context of PEG and PEG conjugates. Haemophilia. 2016;22(1):54-64.
[51] Webster R, Didier E, Harris P, Siegel N, Stadler J, Tilbury L, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies. Drug Metab Dispos. 2007;35:9-16.
[52] Webster R, Elliott V, Park BK, Walker D, Hankin M, Taupin P. PEG and PEG Conjugates Toxicity: Towards an Understanding of the Toxicity of PEG and its Relevance to PEGylated Biologicals. In: Veronese FM, editor. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications; Basel: Birkhäuser Verlag; 2009. p. 127-46.

[53] Fruijtier-Polloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. Toxicology. 2005;214(1-2):1-38.
[54] D'Souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. Expert Opin Drug Deliv. 2016;13(9):1257-75.
[55] Ivens IA, Achanzar W, Baumann A, Brandli-Baiocco A, Cavagnaro J, Dempster M, et al. PEGylated Biopharmaceuticals: Current Experience and Considerations for Nonclinical Development. Toxicol Pathol. 2015;43(7):959-83.
[56] Baumann A, Tuerck D, Prabhu S, Dickmann L, Sims J. Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis? Drug Discov Today. 2014;19:1623-31.
[57] Morrison JP, Sharma AK, Rao D, Pardo ID, Garman RH, Kaufmann W, et al. Fundamentals of translational neuroscience in toxicologic pathology: optimizing the value of animal data for human risk assessment. Toxicol Pathol. 2015;43(1):132-9.
[58] Rowland M, Tozer TN. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics – Concepts and Applications. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. Appendix C, Distribution of Drugs Extensively Bound to Plasma Proteins; p. 695-701.
[59] Mahadevan U, Wolf DC, Dubinsky M, Cortot A, Lee SD, Siegel CA, et al. Placental transfer of anti-tumor necrosis factor agents in pregnant patients with inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2013;11(3):286-92.
[60] FDA. Rebinyn®: Summary Basis for Regulatory Action. STN#: 125611/0. 31 May 2017.
[61] EMA. Refixia®: Assessment Report. Procedure Number EMEA/H/C/004178/0000. EMA/346525/2017. 23 March 2016.
[62] Singh JA, Wells GA, Christensen R, Tanjong Ghogomu E, Maxwell L, Macdonald JK, et al. Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. Cochrane Database Syst Rev. 2011(2):CD008794.
[63] Mease PJ. Certolizumab pegol in the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review of its clinical efficacy and safety. Rheumatology (Oxford). 2011;50(2):261-70.