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）

2.6.4 薬物動態試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 3
表目次 4
略語一覧....6
2.6.4.1 まとめ....10
2.6.4.1.1 動物種の選択....11
2.6.4.2 分析方法....11
2.6.4.2.1 PK 試験（GLP 非適用）において用いられた生体試料中薬物濃度分析法....12
2.6.4.2.1.1 FVIII 発色性合成基質法....12
2.6.4.2.1.2 FVIII 酵素免疫吸着測定法（ELISA）....12
2.6.4.2.1.3 FVIII：C 凝固一段法....12
2.6.4.2.1.4 N8-GP 特異的測定法....13
2.6.4.2.2 GLP 適用非臨床試験に用いた生体試料中薬物濃度分析法....13
2.6.4.2.2.1 FVIII 凝固一段法....14
2.6.4.2.3 抗体測定....15
2.6.4.2.3.1 ラット及びカニクイザルにおける抗 N8-GP 抗体の検出（毒性試験）....15
2.6.4.2.3.2 ラット及びカニクイザルにおける N8-GP 中和抗体の検出（反復投与 PK 試験及び毒性試験）....15
2.6.4.2.4 分布及び排泄試験（GLP 非適用）における放射能の定量....16
2.6.4.2.5 核磁気共鳴法（NMR）....17
2.6.4.3 吸収....18
2.6.4.3.1 マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルにおける単回投与 PK（Table 2.6.5.3A 及び 2.6.5.3.B）....18
2.6.4.3.1.1 F8-KO マウスにおける N8-GP の用量比例性（Table 2.6.5.3.A, [redacted]）....20
2.6.4.3.2 反復投与後 PK....21
2.6.4.3.2.1 反復投与 PK 評価―Wistar 系ラットにおける 2 週間投与（Table 2.6.5.4.A, 209355）....22
2.6.4.3.2.2 反復投与 PK 及び免疫原性試験－Wistar 系ラットにおける 4 週間投与（Table 2.6.5.3.B, [redacted]）....23
2.6.4.3.2.3 反復投与 PK 及び免疫原性試験 - Rowett ヌードラットを用いた 6 週間試験（Table 2.6.5.4.B, 212142）....24
2.6.4.3.2.4 反復投与 - Rowett ヌードラットを用いた 26 週間試験（Table 2.6.5.4.C, 212512）....25
2.6.4.3.2.5 反復投与 PK－Rowett ヌードラットを用いた 52 週間試験（Table 2.6.5.4.D, 213109）....26

2.6.4.3.2.6　反復投与 PK－カニクイザルを用いた 2 週間試験（GLP 適用）（Table 2.6.5.4.E, 209350）...27
2.6.4.3.2.7　反復投与 PK 及び免疫原性試験－カニクイザルを用いた 4 週間探索（GLP 非適用）（Table 2.6.5.3.B, [redacted]）...28
2.6.4.3.3　PK の動物種間比較...29
2.6.4.3.4　重要な非臨床安全性試験及び臨床試験結果における曝露比較...30
2.6.4.3.5　分布及び排泄試験に用いた放射能標識トレーサー...31
2.6.4.4　分布...32
2.6.4.4.1　ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験（Table 2.6.5.5.A, 212398）...32
2.6.4.4.2　補助的な免疫組織化学的検討（Table 2.6.5.5.B, 213038）...34
2.6.4.5　代謝...34
2.6.4.5.1　*In vivo* 代謝...34
2.6.4.6　排泄...35
2.6.4.6.1　PEG 成分を放射能標識化した N8-GP における雄性ラットへの静脈内単回投与後の排泄（Table 2.6.5.13.A, 212174 及び Table 2.6.5.13.B, 212399）...35
2.6.4.6.2　分布・排泄試験（Study 213392〔(Module 4.2.2.5)〕に基づく血漿及び組織中 N8-GP の 40 kDa PEG に関する PK...35
2.6.4.6.2.1　N8-GP のタンパク質及び 40 kDa PEG の血漿 PK プロファイル...36
2.6.4.6.2.2　PEG の半減期及び定常状態までの時間の推定...38
2.6.4.6.2.3　反復投与後の PEG 濃度推定のための血漿 - 組織モデル...39
2.6.4.6.2.4　既承認薬からみた N8-GP の臨床上での PEG 曝露...40
2.6.4.7　薬物動態学的相互作用...41
2.6.4.8　その他の薬物動態試験...41
2.6.4.8.1　*In vitro* – [^{3}H-PEG]-N8-GP ラットにおける血球分配（Table 2.6.5.16.A, 214153）...41
2.6.4.8.2　タンパク質部分を放射能標識した N8-GP の臓器及び細胞への分布...42
2.6.4.9　考察及び結論...43
2.6.4.9.1　N8-GP の PK...43
2.6.4.9.2　PEG 成分の分布排泄及び PK...43
2.6.4.9.3　結論...45
参考文献...46

図目次

ページ

図 2.6.4-1　分布及び排泄試験に用いたトリチウム（[^{3}H]）N8-GP 放射能標識トレーサー...16

図 2.6.4-2　血友病 A イヌにおける個体別及び平均血漿中濃度―時間プロファイル.....18
図 2.6.4-3　F8-KO マウスに 4 種の用量の N8-GP （35、70、140 又は 280 IU/kg）を投与時の個体別及び平均血漿中濃度―時間プロファイル.....20
図 2.6.4-4　ポピュレーション PK アプローチに基づく FVIII 発色性活性測定値及び予測値の片対数プロット（Study ID [redacted]）.....21
図 2.6.4-5　ラット - FVIII 抗原濃度 - 時間プロファイル.....24
図 2.6.4-6　雌雄 Rowett ヌードラットへの 1200 IU/kg （グループ 5）26 週間投与（4 日に 1 回投与）における曝露.....26
図 2.6.4-7　雌雄 Rowett ヌードラットへの 1200 IU/kg（グループ 5）52 週間投与（4 日に 1 回）における曝露.....27
図 2.6.4-8　サル - FVIII 凝固性活性－時間プロファイル（8 回の投与における投与前、投与後 0.25 時間及び 6 時間後試料）.....28
図 2.6.4-9　サル - FVIII 凝固性活性－時間プロファイル（片対数プロット）.....29
図 2.6.4-10　N8-GP のクリアランス及び分布容積のアロメトリックスケーリング.....30
図 2.6.4-11　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の構造.....31
図 2.6.4-12　ラットにおいて選択した組織及び時点における PEG 濃度の時間推移.....33
図 2.6.4-13　投与後 12 週間までの PEG 及び FVIII タンパク質の血漿濃度－時間プロファイル.....37
図 2.6.4-14　N8-GP 28000 IU/kg 静脈内投与後の選択組織における PEG 関連物質濃度（pmol/g）の時間推移.....38
図 2.6.4-15　血漿からの移行速度及び排出速度（すなわち組織からの消失）が平衡状態となったとき組織中において定常状態値に達する.....40

表目次

ページ

表 2.6.4-1　PK 試験の概要.....10
表 2.6.4-2　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.....12
表 2.6.4-3　GLP 非適用試験における PK 評価に用いた分析法の概要.....13
表 2.6.4-4　GLP 適用の試験に用いられた生体試料中薬物濃度分析法の主要なバリデーションパラメータ.....14
表 2.6.4-5　ISR 試験一覧.....14
表 2.6.4-6　ラット及びサル血漿における FVIII 活性の長期保存時安定性.....15
表 2.6.4-7　抗体測定法における主要なバリデーションパラメータ.....16
表 2.6.4-8　放射性標識 N8-GP の定量法.....17

表 2.6.4-9　125～280 IU/kg の用量範囲における rFVIII〔ノボエイト®（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 19
表 2.6.4-10　血友病 A イヌに対し N8 又は N8-GP 投与後のポピュレーションアプローチによる推定 PK パラメータ 19
表 2.6.4-11　F8-KO マウスへの N8-GP 投与後におけるノンコンパートメント解析（NCA）又はポピュレーション PK アプローチを用いた PK パラメータ推定 21
表 2.6.4-12　重要な 2～52 週間毒性試験における用量 500～2500 IU/kg 静脈内反復投与後のトキシコキネティクスパラメータ推定値（ヒト血漿を検量線試料として用いた FVIII 凝固一段法、雄性動物のみ） 22
表 2.6.4-13　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 30
表 2.6.4-14　放射能標識トレーサーへの換算に用いた分子量 31
表 2.6.4-15　ラットにおける分布及び排泄試験と臨床試験で用いた用量の比 31
表 2.6.4-16　[^{3}H-PEG]-N8-GP 単回静脈内ボーラス投与後の推定排泄回復率 35
表 2.6.4-17　ラットへの N8-GP 投与後における PEG 関連放射能の推定血漿 PK パラメータ 37
表 2.6.4-18　血漿中 PEG の終末相半減期 38
表 2.6.4-19　N8-GP の血漿、腎臓、肝臓、脈絡叢における PEG 終末相半減期 39
表 2.6.4-20　PEG 化タンパク質及び PEG に関するラットにおける排泄回収率の概要 44

略語一覧

略語一覧は Module 2.6 を通して用いられる。したがって、略語の中には本 Module には関連しないものも含まれる可能性がある。

^{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）
μ CT	:	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）

2.6.4.1 まとめ

ツロクトコグ アルファ ペゴル（本概要では N8-GP と呼ぶ）の薬物動態（PK）、分布、代謝、排泄については、各種の非臨床試験に用いた動物種において十分に特性が明らかにされている（表 2.6.4-1 参照）。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 及び遺伝子組換え型血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）製剤〔ノボエイト®（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。以下、“FVIII replete”は正常な凝固系を有する動物に対して用い、“FVIII deplete”は血液凝固第 VIII 因子（FVIII）欠損動物〔例えば FVIII 遺伝子ノックアウト（F8-KO）マウス又は血友病 A のイヌ〕に対して用いる。

表 2.6.4-1　PK 試験の概要

Discipline and type of study	Species	Dose range tested (IU/kg)
Absorption – single-dose PK	Mouse[a,b], rat[b], rabbit[b], dog[a] and monkey[b]	35−80
Absorption – 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 2.6.4.5	
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 (animals deficient in FVIII), [b]FVIII replete (animals with a normal FVIII levels).
Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; PK = pharmacokinetic(-s).

N8-GP の PK プロファイルは rFVIII と比較して延長されていることが示された。各種動物で、rFVIII と比較して N8-GP のクリアランスが約 2 倍減少し、半減期が約 2 倍に延長した。一方で、rFVIII と N8-GP の分布容積は同様であった。F8-KO マウスにおいて N8-GP は、35～280 IU/kg の用量範囲で用量比例性を示した。

Wistar 系ラット及びカニクイザル双方において抗薬物抗体が形成され、N8-GP の曝露への影響が、それぞれ投与 25 日及び 11～15 日後に認められた。このことは、N8-GP のヒト FVIII タンパク質が動物において外来異種タンパク質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。そのため毒性試験の標準

的な動物種を用いた長期毒性試験を実施する意義はないものと考えられた。そこで、免疫不全動物モデル（Rowett ヌードラット）を用いて免疫系反応を回避することにより、長期曝露及び長期毒性評価を可能とした。52 週までの反復投与を行った本モデルにおいて長期曝露が確認された。

N8-GP（PEG 成分を放射能標識化）は体内に広範に分布し、経時的に消失し、尿及び糞中へ排泄されることが示された。

2.6.4.1.1　　動物種の選択

動物種の選択については Module 2.6.2.3.1 に記述している。

2.6.4.2 分析方法

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確立・使用された。いくつかの分析法〔発色性合成基質法、凝固一段法、又は FVIII 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。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）放射性標識化 N8-GP を使用した。加えて、血漿中及び脳脊髄液（CSF）中 PEG 濃度を核磁気共鳴法（NMR）により測定した。

表 2.6.4-2　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	Plasma (rat[a], dog and monkey[a])
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.
Abbreviations: CSF = cerebrospinal fluid; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; FVIII = coagulation factor eight; nAb = neutralising antibody; NMR = nuclear magnetic resonance; RIA = radioimmunoassay.

2.6.4.2.1　PK 試験（GLP 非適用）において用いられた生体試料中薬物濃度分析法

2.6.4.2.1.1　FVIII 発色性合成基質法

FVIII 凝固活性を、Chromogenix Coatest® SP FVIII〔Instrumentation Laboratory Company （以下 IL）, Bedford, USA, catalogue no. 82408663〕の発色性合成基質法試薬を用いて測定した。市販の正常ヒト検量線用血漿（IL）、N8-GP の 2 次標準物質（SRM）又は N8 の SRM を検量線試料として用いて、血漿試料中の FVIII 活性を測定した（表 2.6.4-3）。

2.6.4.2.1.2　FVIII 酵素免疫吸着測定法（ELISA）

FVIII 抗原を市販のサンドイッチ ELISA キット〔Asserachrom VIIIC:Ag （Diagnostica Stago, Asniéres-Sur-Seine, France）〕を用いて測定した。使用した検量線試料を表 2.6.4-3 に示す。ELISA 法はヒト FVIII 特異性を有し、動物の内因性 FVIII と投与されたヒト FVIII とが識別される。

2.6.4.2.1.3　FVIII：C 凝固一段法

イヌにおける PK 試験（Module 2.6.5.3.B、[redacted]）では、FVIII 凝固活性法を用いてクエン酸血漿中 FVIII 活性を定量した。測定法として、製剤特異的な検量線試料を用いた FVIII 凝固一段法を用いた。

2.6.4.2.1.4　N8-GP 特異的測定法

2 種の GLP 非適用反復投与 PK 試験〔Wistar 系ラットにおける 4 週間反復投与試験（Module 2.6.5.3.B、[redacted]）及びカニクイザルにおける 4 週間反復投与試験（Module 2.6.5.3.B、[redacted]）〕では、N8-GP 特異的な適格性が確認された ELISA 法及び発色性合成基質法を用いた。使用した検量線試料を表 2.6.4-3 に示す。

N8-GP の捕捉及び検出のために、抗 PEG 抗体及び抗 FVIII 抗体を N8-GP 特異的サンドイッチ ELISA で使用した。

N8-GP 特異的発色性合成基質法において、抗 PEG 抗体を用いて N8-GP を捕捉し、捕捉された N8-GP を発色性合成基質法により測定した。

各種の GLP 非適用試験における生体試料中薬物濃度測定法及び検量線試料の概要を表 2.6.4-3 に示す。

表 2.6.4-3　GLP 非適用試験における PK 評価に用いた分析法の概要

Study ID	Species	Compound	Comparator	Assay 1	Calibrator 1	Assay 2	Calibrator 2
[redacted]	F8-KO mice	N8-GP	-	Chrom. Act.	N8-GP	-	-
[redacted]	F8-KO mice	N8	ReFacto®, Advate®	Chrom. Act.	Plasma	ELISA	Plasma
[redacted]	F8-KO mice	N8-GP	-	Chrom. Act.	Plasma	ELISA	N8-GP
[redacted]	C57Bl/6 mice	N8-GP	ReFacto®	Chrom. Act.	Plasma	ELISA	N8-GP
[redacted]	SPRD rats	N8-GP	N8	Chrom. Act.	Plasma	ELISA	N8-GP
[redacted][a]	Wistar rats	N8-GP	-	Chrom. Act.	Plasma	ELISA	N8-GP
[redacted]	NZW rabbits	N8-GP	ReFacto®	-	-	ELISA	N8-GP
[redacted][b]	HA dogs	N8-GP	N8	Chrom. Act.	N8 N8-GP	ELISA	N8 N8-GP
[redacted][a]	Cynomolgus monkeys	N8-GP	-	Chrom. Act.	Plasma	ELISA	N8-GP

Note: The plasma is normal human plasma (commercial calibration plasma).
[a] A PEG-specific ELISA and a PEG-specific chromogenic activity assay were also included using N8-GP as calibrator. [b] An FVIII clot activity assay was also included using product-specific calibrators (i.e., N8 or N8-GP).
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; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; FVIII = coagulation factor eight; HA = haemophilia A; NZW = New Zealand White; SPRD = Sprague Dawley.

2.6.4.2.2　GLP 適用非臨床試験に用いた生体試料中薬物濃度分析法

GLP 適用の毒性試験では、ラット及びカニクイザルのクエン酸加血漿における使用のために国際的に認知されている指針及びリガンド結合法に関する推奨事項に従って、凝固一段法をバリデートした[1,2,3]。生体試料中薬物濃度分析法の概略は以下のとおりである。

2.6.4.2.2.1 FVIII 凝固一段法

臨床状態を模倣しノボエイト®（N8）の過去データと比較可能にするため、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）を基にした凝固一段法を確立及びバリデートし、ラット及びカニクイザルにおける GLP 適用の試験での FVIII 活性の定量化に用いることが開発の初期段階において決定した。これらの測定法では FVIII 活性を測定するため、動物の内因性 FVIII と N8-GP は区別できない。

APTT 試薬として Instrumentation Laboratory（IL）社製 SynthASil が用いられた。測定検量線試料として FVIII 血漿 WHO 国際規格に対し校正された市販の正常ヒト血漿を用いた。血漿、測定試料及び QC 試料中の FVIII 活性は血漿による検量線に対して測定した。本システムによってフィブリン凝結塊形成時間を測定したところ、試料中 FVIII 活性に対し反比例することが認められた。

ラット及びサルの血漿試料における本測定法での定量下限（LLOQ）次のとおりである：250 IU/dL + 各試験で測定された内因性 FVIII 活性最高値（LLOQ 範囲：582～773 IU/dL）。血液凝固能が正常である FVIII replete 動物における内因性 FVIII 活性値が高かったことから、LLOQ は高くなった。したがって、150 IU/kg 以下の用量では N8-GP 活性は測定できなかった。本分析法での性能を表 2.6.4-4 に示す。

表 2.6.4-4　GLP 適用の試験に用いられた生体試料中薬物濃度分析法の主要なバリデーションパラメータ

Assay	Species	LLOQ calibration	LLOQ samples	Precision (QC CV%)	Accuracy (QC RE%)	Accuracy (RE% at LLOQ)	Accuracy in individuals (RE%)	Study ID
Clotting assay	Rat	1.25 IU/dL	250 IU/dL + endogenous FVIII activity	< 20	± 20	± 25	± 30[a]	209408 (M 4.2.2.1)
	Monkey			< 20	± 20	± 25	± 30[a]	209407 (M 4.2.2.1)

[a]Accuracy in spiked plasma samples from some individual animals was to some extent outside the guideline recommended ± 20% acceptance criteria for selectivity. This may be explained by this particular choice of clot assay reagents leading to a difference in the specific activity between endogenous animal FVIII and human FVIII used for calibration.
Abbreviations: CV% = coefficient of variation; LLOQ = lower limit of quantification; QC = quality control; RE% = relative error.

実試料の測定値における再現性評価（ISR）の結果を表 2.6.4-5 に示す。

表 2.6.4-5　ISR 試験一覧

Assay	Species	Acceptance criteria	Study ID
Clotting assay	Rat	Passes: 2/3 of samples within 30% of original	210321 (M 4.2.2.1)
	Monkey	Passes: 2/3 of samples within 40% of original	210320 (M 4.2.2.1)

FVIII 活性の長期保存時の安定性について表 2.6.4-6 に示す。

表 2.6.4-6　ラット及びサル血漿における FVIII 活性の長期保存時安定性

Assay	Species	Stability at ≤ -70°C (months)	Study ID
Clotting assay	Rat	24	210263 (M 4.2.2.1)
	Monkey	24	210264 (M 4.2.2.1)

Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight.

全体として、測定法はいずれも目的に適していると考えられる。

2.6.4.2.3　抗体測定

2.6.4.2.3.1　ラット及びカニクイザルにおける抗 N8-GP 抗体の検出（毒性試験）

ラット及びカニクイザルの血漿における抗 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。バリデーション報告書（Study 209384 [M 4.2.2.1]）に記述したとおりに、国際的に認知されている指針及び推奨事項[4,5]に従って測定法がバリデートされた。主要なバリデーションパラメータを表 2.6.4-7 に示す。

RIA においてヨウ素 125（^{125}I）で標識された N8-GP で試料を培養したところ、抗 N8-GP 抗体が検出された。抗 IgM/IgA 抗体と結合したタンパク質 G セファロースビーズを用いたことで、免疫グロブリン及び抗原抗体複合物が形成された。複合体の形成はガンマカウンターで計測され、放射能量は試料中の抗 N8-GP 抗体量に比例していた。

カットポイントを超える結果が出た試料に関して、非放射性（非標識）N8-GP 及び rFVIII の過剰附加による確認分析において、抗 N8-GP 抗体の形成が確認された。非放射性 N8-GP によって阻害された可能性のあるシグナルのみが抗体陽性と考えられた。非放射性 rFVIII によって阻害された可能性のある抗体陽性試料については、FVIII 交叉反応であると考えられた。

2.6.4.2.3.2　ラット及びカニクイザルにおける N8-GP 中和抗体の検出（反復投与 PK 試験及び毒性試験）

抗 N8-GP 抗体が陽性であったラット及びカニクイザルの血漿試料について、中和抗体測定法を用いて分析した。中和抗体測定法は Chromogenix 社製 Coamatic® FVIII を用いる発色性合成基質法であり、血漿試料による N8-GP（1000 mU/mL）活性阻害の程度を測定するものである。本測定法は、国際的に認知されている指針及び推奨事項[4,5]に従って、バリデーション報告書〔ラット：Study 209489（Module 4.2.2.1）及びサル：Study 209490（Module 4.2.2.1）〕に記述したとおりにバリデートされた。主要なバリデーションパラメータを表 2.6.4-7 に示す。測定値がカットポイント未満の試料は、中和活

性が陽性と考えられた。休薬期間を設けることで、いずれの試料も薬物による妨害が生じないようにした。

表 2.6.4-7　抗体測定法における主要なバリデーションパラメータ

Assay	Parameter	Rat plasma	Cynomolgus plasma
Radioimmunoassay	Sensitivity	30 ng/mL antibody	60 ng/mL antibody
	Cut point	Dynamic cut point based on min. 10 pre-dose samples	Dynamic cut point based on min. 10 pre-dose samples
	Drug tolerance	2000 ng/mL N8-GP at 656 ng/mL anti-N8-GP antibody	10000 ng/mL N8-GP at 656 ng/mL anti-N8-GP antibody
	Assay variation	10−24 %CV	10−18 %CV
Chromogenic neutralising assay	Sensitivity	500 ng/mL	1000 ng/mL
	Cut point	Dynamic cut point based on min. 10 pre-dose samples	Dynamic cut point based on min. 10 pre-dose samples
	Drug tolerance	5 IU/mL N8-GP at 1000 ng/mL anti-N8-GP antibody	2.5 IU/mL N8-GP at 1000 ng/mL anti-N8-GP antibody
	Assay variation	24 %CV at 1000 ng/mL anti-N8-GP antibody	21 %CV at 500 ng/mL anti-N8-GP antibody

Note: 1 IU/mL ~100 ng/mL N8-GP (9500 IU/mg).
Abbreviations: %CV = coefficient of variation.

2.6.4.2.4　分布及び排泄試験（GLP 非適用）における放射能の定量

PEG 部分の PK はラットにおける分布及び排泄試験の一部として評価され、PEG 部分の末端に取り込ませたトリチウム原子（^{3}H）による放射能標識トレーサーが用いられた（図 2.6.4-1）。PEG 関連放射能について血漿、尿及び糞試料を液体シンチレーション計数法（LSC）によって分析した。また、組織中放射能は定量的全身オートラジオグラフィによって評価した。

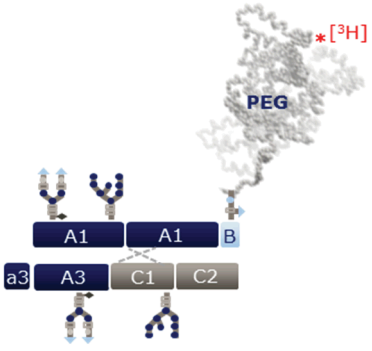


図 2.6.4-1　分布及び排泄試験に用いたトリチウム（[^{3}H]）N8-GP 放射能標識トレーサー

[^{3}H] 標識 N8-GP トレーサー（[^{3}H] N8-GP）をラットに投与し、種々の試験における放射能を定量した（表 2.6.4-8）。

表 2.6.4-8　放射性標識 N8-GP の定量法

Study ID	Compound	Species	Radio-Isotope	Matrix	Method	LLOQ
212398	N8-GP	Rat	[^{3}H]	Tissue Plasma	QWBA LSC	0.114 µg eq/g tissue (0.521 pmol eq/g tissue) 0.001 µg eq/g (LOD) (0.007 pmol eq/g) plasma
212174	N8-GP	Rat	[^{3}H]	Plasma Urine Faeces	LSC LSC LSC	0.37 ng eq/mL 0.011 ng eq/mL 1.21 ng eq/g
212399	N8-GP	Rat	[^{3}H]	Plasma Urine Faeces	LSC LSC LSC	Value not reported [a] Value not reported [a] Value not reported [a]

Note: All values in this table are based on total radioactivity recalculated to µg full molecule (N8-GP) using the known ratio between unlabelled versus labelled compound.
[a] LLOQ was defined as two times the mean background of a control sample (plasma, urine, faeces) containing the liquid scintillant.
Abbreviations: eq = equivalent; LLOQ = lower limit of quantification; LOD = limit of detection; LSC = liquid scintillation counting; QWBA = quantitative whole body autoradiography.

2.6.4.2.5　核磁気共鳴法（NMR）

Rowett ヌードラットの血漿及び CSF における総 PEG 濃度（結合型又は遊離型）測定のため、^{1}H-NMR による分析が検討された。本法は、PEG 鎖中に多数の[redacted]、これらが、[redacted]において、特異的かつ強力な ^{1}H-NMR 共鳴シグナル（PEG 濃度上昇に伴い増加）を発することを利用したものである。

ブランクの血漿である Rowett ヌードラットのプール血漿に、標準品として 40 kDa PEG を添加して調整した二次検量線に基づいて、血漿試料中 PEG 濃度の測定を行った。すべての試料タイプ（検量線試料、対照試料及び試験試料）について、分析前に簡単な試料調製を実施した。血漿を NMR 緩衝液（重水中 0.56 mol/L リン酸ナトリウム、0.3%アジ化ナトリウム pH 7.4）と混合 （比率： 90 µL NMR 緩衝液：165 µL 試料）し、分析直前に NMR チューブへ移した。

Rowett ヌードラットの血漿中 PEG の定量下限（LLOQ）は 0.38 µg/ml（RSD = 6.9%）であり、0.38～3 µg/mL 範囲（R^2 =0.9989）の二次検量線を得た。また、すべての検量線濃度における真度は名目値の 15%未満であった。

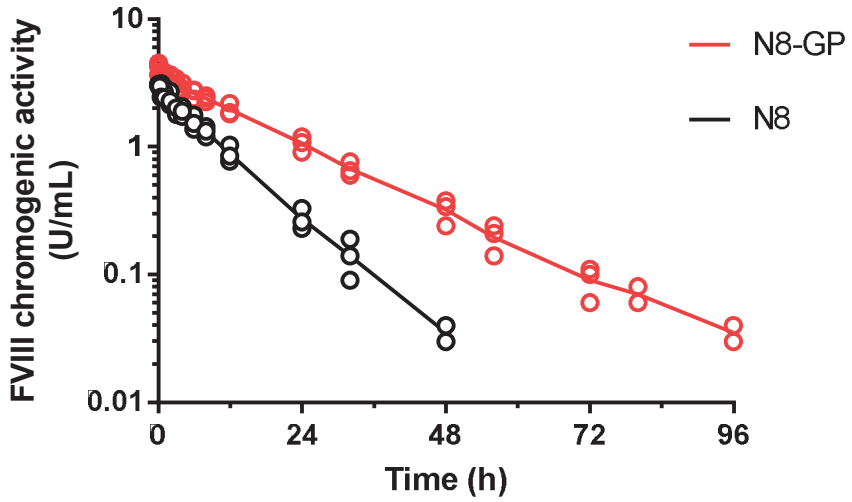
CSF 試料から発生した NMR シグナルはいずれも、溶媒投与ラットの試料と同様（背景値レベル）であった。そのため、CSF 試料中の PEG 測定には選択した NMR 法は使用できなかった。これらに含まれる検量線は、CSF における陽性及び陰性（ブランク）対照群として用いた。PEG 添加対照試料について、0.5 µg/mL の CSF では明瞭な PEG のピークが検出された一方、0.1 µg PEG/mL ではバックグラウンドと区別できなかった。

2.6.4.3 吸収

N8-GP の PK は、予定している臨床適用経路を反映して静脈内投与により評価した。単回投与 PK 試験はマウス、ラット、ウサギ、イヌを用いて行い、反復投与 PK 試験はラット及びサルを用いて行った（表 2.6.4-1）。F8-KO マウスにおいて、35～280 IU/kg の用量範囲で用量比例性が評価された。

2.6.4.3.1 マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルにおける単回投与 PK（Table 2.6.5.3A 及び 2.6.5.3.B）

全体として、評価されたすべての動物種において rFVIII と比較して N8-GP で曝露の延長が示された（表 2.6.4-9）。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。血友病 A イヌの単回投与 PK プロファイルを例として図 2.6.4-2 に示す。



Note: A single i.v. of 125 IU/kg N8-GP or N8 (NovoEight®, turoctocog alfa) was administered to six (n=3 per compound) haemophilia A dogs, and plasma samples were analysed by chromogenic activity assay. After i.v. administration of 125 IU/kg N8-GP and N8 to haemophilia A dogs, a mean C_{max} was obtained of 4.2 ± 0.4 IU/mL and 3.1 ± 0.04 IU/mL, respectively (mean ± SD). The graph has been optimised from the report (Study ID [redacted]).
Abbreviations: C_{max} = maximum concentration; FVIII = coagulation factor eight; i.v. = intravenous(-ly).

図 2.6.4-2 血友病 A イヌにおける個体別及び平均血漿中濃度—時間プロファイル

rFVIII と比較して N8-GP の終末相半減期が約 2 倍延長したことが認められた。N8-GP のクリアランスが rFVIII と比較して約 1/2 に減少したことよると考えられた。分布容積は N8-GP 及び rFVIII で同様であった（表 2.6.4-9）。

表 2.6.4-9　125～280 IU/kg の用量範囲における rFVIII〔ノボエイト®（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)	Study ID
F8-KO mice	rFVIII	280	Chrom. Act.	7.8	11	58	11	[redacted]
	N8-GP	280	Chrom. Act.	15	3.18	64	21	
C57Bl/6 mice	rFVIII	280	ELISA	2.5	36	130	3.6	[redacted]
	N8-GP	280	ELISA	6.8	15	134	8.8	
SPRD rats	rFVIII	200	ELISA	5.8	9.4	69	7.3	[redacted]
	N8-GP	200	ELISA	7.9	5.4	61	11	
Wistar rats[a]	N8-GP	250	ELISA	6.9	10	86	8.5	[redacted]
			Chrom. Act.	10	4.6	60	13	
NZW rabbits	rFVIII	200	ELISA	7.8	4.8	48	10	[redacted]
	N8-GP	200	ELISA	14	2.8	56	21	
Haemophilia A dogs	rFVIII	125	Chrom. Act.	7.3	4.2	43	10	[redacted]
	N8-GP	125	Chrom. Act.	14	3.1	62	19	
Cynomolgus monkeys[a]	N8-GP	250	ELISA	18	1.5	35	25	[redacted]
			Chrom. Act.	21	1.2	33	30	

[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; CL = clearance; Chrom. Act. = chromogenic activity assay; 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; SPRD = Sprague Dawley; $t_{½}$ = terminal half-life; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

内因性 FVIII 及び投与された（ヒト）FVIII を区別できることから、マウス、ラット、ウサギ、サルにおいて追加的に抗原に基づく測定法（ELISA 法）を使用して、血漿中 FVIII 濃度が測定された。ELISA 法による PK においても発色性合成基質法での PK と同様にクリアランスの低下による、N8-GP の終末相半減期の延長が rFVIII と比較してみられた。

イヌを用いた試験における発色性合成基質法及び FVIII 凝固一段法に基づいて PK を評価した。後者は PK-PD 関係（Module2.6.2.2.6, [redacted] の要約参照）を示す目的で使用された。データの概要を表 2.6.4-10 に示す。

表 2.6.4-10　血友病 A イヌに対し N8 又は N8-GP 投与後のポピュレーションアプローチによる推定 PK パラメータ

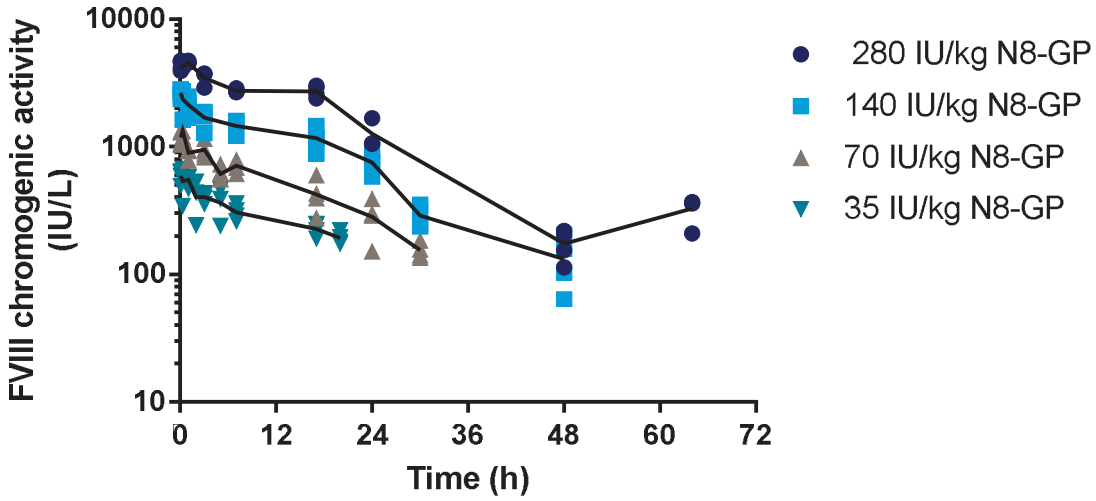
Compound	Dose (IU/kg)	n	Population approach (FVIII clot)		
			$t_{½}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_z (mL/kg)
N8	125	3	8	6.0	70
N8-GP	125	3	13	3.7	71

Note: V_z is based on terminal phase.
Abbreviations: CL = clearance; FVIII = coagulation factor eight; $t_{½}$ = terminal half-life; V_z = volume of distribution.

2.6.4.3.1.1　F8-KO マウスにおける N8-GP の用量比例性（Table 2.6.5.3.A, [redacted]）

F8-KO マウスにおいて、35～280 IU/kg の範囲で N8-GP の PK が用量比例的であることが示された。

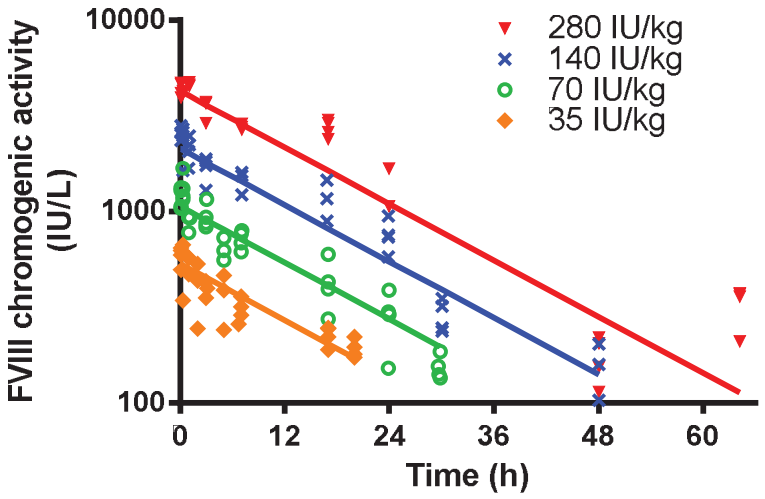
48 例の F8-KO において N8-GP の用量比例性を検討した。4 種の用量の N8-GP（35、70、140 又は 280 IU/kg）をマウスに静脈内投与し、FVIII 凝固活性を測定のため 0～64 時間に間歇的に各動物から少数の血漿試料を採取した（図 2.6.4-3）。



Note: Plasma was sampled in a sparse sample schedule with 3−4 samples per time point (Composite profiles; the graph has been optimised from the report [Study ID [redacted]]).

図 2.6.4-3　F8-KO マウスに 4 種の用量の N8-GP （35、70、140 又は 280 IU/kg）を投与時の個体別及び平均血漿中濃度—時間プロファイル

静脈内投与後において N8-GP の終末相半減期は、N8 と比較して約 2 倍延長した。マウスの平均分布容積（V_{ss}）は 58 mL/kg と推定され、マウスの平均血液量（72 mL/kg）と同様又はやや低かった[6]。データセットに対し、クリアランスの個体間変動を伴う 1 コンパートメントデルが適合した。分布容積に関する個体間変動を説明するためには本データセットは小さく、母平均は 66 mL/kg と推定された。FVIII 凝固活性の測定値及び近似曲線を図 2.6.4-4 に示す。また、ノンコンパートメント解析及びポピュレーション PK アプローチに基づき予測された PK パラメータを表 2.6.4-11 に示す。



Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight.

図 2.6.4-4　ポピュレーション PK アプローチに基づく FVIII 発色性活性測定値及び予測値の片対数プロット（Study ID [redacted]）

表 2.6.4-11　F8-KO マウスへの N8-GP 投与後におけるノンコンパートメント解析（NCA）又はポピュレーション PK アプローチを用いた PK パラメータ推定

Compound	Dose (IU/kg)	NCA				Population approach[a]		
		C_{max} (IU/L)	$t_{½}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (mL/kg)	$t_{½}$ (h)	CL (mL/h/kg)	V_{ss} (mL/kg)
N8-GP	35	589	17	3.2	77	12±1	3.9±0.5	66
	70	1339	11	3.9	58	12±2	3.9±0.6	66
	140	2636	12	3.5	61	13±2	3.7±0.7	66
	280	4717	15	3.1	64	13±3	3.8±1.1	66

[a]Data are presented as mean ± SD; n=11 or 12.
Abbreviations: CL = clearance; C_{max} = maximum concentration; NCA = noncompartmental analysis; $t_{½}$ = terminal half-life; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

用量増加による $t_{1/2}$ または CL への影響が認められなかったことから、全体として、用量範囲 35～280 IU/kg の F8-KO において N8-GP の曝露は用量比例性であることが示された。さらに、用量補正した AUC 及び C_{max} に用量による差異は認められなかった。

2.6.4.3.2　反復投与後 PK

予期したとおり、Wistar 系ラット及びカニクイザル双方において抗薬物抗体が形成され、曝露への影響が認められた。このことは、N8-GP のヒト FVIII タンパク質が動物種において外来異種であることと一致している。そこで、長期の曝露及び毒性評価を可能にするため、免疫不全動物モデル（Rowett ヌードラット）を導入して免疫系反応を回避した。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ため、抗薬物抗体による妨害がなく N8-GP の長期曝露が可能となる。

試験動物の使用可否及び中和抗体の発現時期を評価するため、3 種の GLP 非適用の反復投与 PK 試験が実施された：Wistar 系ラットを用いた 4 週間試験（Table 2.6.5.3.B, [redacted]）、Rowett ヌードラットを用いた 6 週間試験（Table 2.6.5.4.B, 212142）、カニクイザルを用いた 4 週間試験（Table 2.6.5.3.B, [redacted]）。

TK 評価を含む 4 種の重要な反復投与毒性試験（GLP 適用）が実施された：Wistar 系ラットを用いた 2 週間毒性試験（Table 2.6.5.4.A, 209355）、Rowett ヌードラットを用いた 26 週間及び 52 週間毒性試験（Table 2.6.5.4.C, 212512 及び Table 2.6.5.4.D, 213109）、カニクイザルを用いた 2 週間毒性試験（Table 2.6.5.4.E, 209350）。

重要な試験（GLP 適用）における C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ 推定値の概要を表 2.6.4-12 に示す。

表 2.6.4-12　重要な 2～52 週間毒性試験における用量 500～2500 IU/kg 静脈内反復投与後のトキシコキネティクスパラメータ推定値（ヒト血漿を検量線試料として用いた FVIII 凝固一段法、雄性動物のみ）

Species (strain)	Study length/Tau	Dose (IU/kg)	C_{max} (IU/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)
Rat (Wistar)	2 weeks/48h	*Week 1*		
		500	15.2	49.4
		2500	89.5	725
Rat (Rowett nude)	26 weeks/96h	*Week 1*		
		500	11.0	NR
		1200	25.3	371
		Week 26		
		500	12.5	111
		1200	23.2	356
Rat (Rowett nude)	52 weeks/96h	*Week 1*		
		500	17.5	152
		1200	43.6	453
		Week 52		
		500	15.2	188
		1200	36.3	438
Monkey (cynomolgus)	2 weeks/72h	*Week 1*		
		500	10.2	158[a]
		2500	36.8	904[a]

[a] $AUC_{0\text{-}72h}$.
Abbreviations: $AUC_{0\text{-}24h}$ = area under the curve from time zero to 24h; $AUC_{0\text{-}72h}$ = area under the curve from time zero to 72 h; FVIII = coagulation factor eight; Tau = dosing interval; NR = not reported.

2.6.4.3.2.1　反復投与 PK 評価—Wistar 系ラットにおける 2 週間投与（Table 2.6.5.4.A, 209355）

投与開始 13 日後、中和抗体の形成により、雌雄において N8-GP への曝露の顕著な減少が認められた。

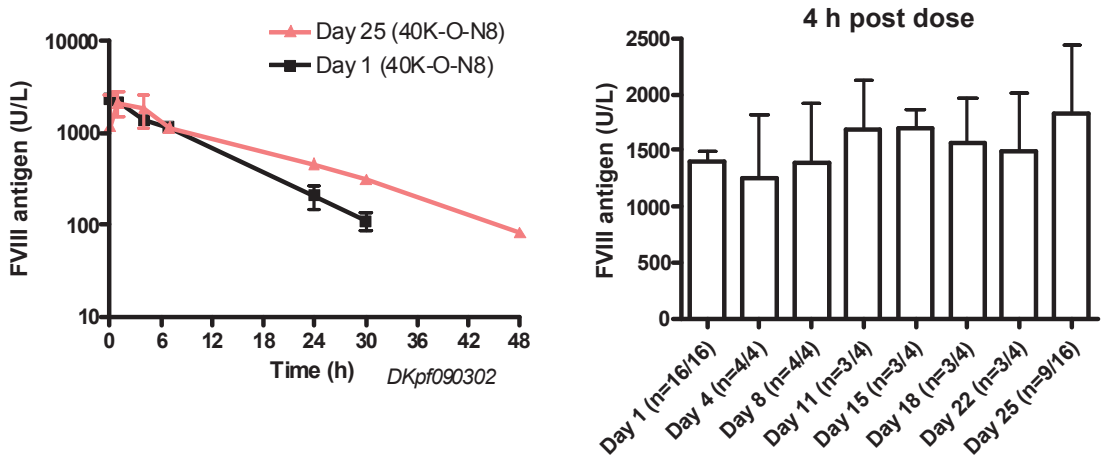
雌雄ラットに対しN8-GPを用量0、100、500、2500 IU/kg（2日に1回）、2週間静脈内投与した。また、用量2500 IU/kgを4週間投与した後3週間の回復期間を設定する群も設けた。PK評価のため、動物1個体あたり、血液試料を第1日、第13日又は第27日の各日の24時間以内に3点を採取する、スパースサンプリングスケジュールに従った採血を実施した。さらに、曝露確認用試料の採取を第3、5、7、9、11日（主試験群）又は第7、13、19、25日（4週間投与群）に実施した。血漿試料中N8-GPは、ヒト血漿標準試料を検量線として用いるバリデートされた、FVIIIに対する凝固一段法により分析された。

100 IU/kg投与群のすべての試料はLLOQ（7.73 IU/mL）未満であった。500又は2500 IU/kg投与群の曝露は、第1日には多数の動物において認められた。C_{max}（15.2～16.2から53.7～89.5 IU/mLまで）及び$AUC_{0\text{-}24h}$（49.4～149から381～725 h*IU/mLまで）により評価したところ、500及び2500 IU/kgを投与した雌雄動物において、第1日での曝露は用量増加に伴って増加していた。静脈内投与（2日に1回）を13日間（500又は2500 IU/kg）又は27日間（2500 IU/kg）行った後では、中和抗体形成により、雌雄においてN8-GPの曝露の顕著な減少が認められた。消失半減期は第1日においては7.4～23時間の範囲であり、第13日及び第27日については推定できなかった。データが限定的であることから、性差に関する結論は出せなかった。

2.6.4.3.2.2　反復投与PK及び免疫原性試験－Wistar系ラットにおける4週間投与（Table 2.6.5.3.B, [redacted]）

第25日以降、約半数の動物において曝露が減少した。このことは中和抗体の検出と相関していた。

16例の雄性Wistar系ラットに対し、N8-GPを250 IU/kg（週に2回）4週間静脈内投与し、血漿試料を発色性合成基質法及びELISA（FVIII抗原）を用いて分析した。N8-GPへの曝露が検出されたラットの数は、投与第1日及び第25日において異なっていた。第1日では、投与後4時間に16例中16例のラットにおいて曝露が認められたが、一方第25日では、投与後4時間に16例中9例のみに曝露が認められた（図 2.6.4-5）。曝露の減少は中和抗体の検出と相関していた。



Note: Animals without exposure have been excluded from the data. *Left panel:* FVIII antigen concentration as a function of time after dosing days 1 and 25 (mean ± SD, day 1: n=4-16, day 25: n=1-9). *Right panel:* 4 h post administration FVIII antigen concentration on the dosing days 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 and 25 (number of rats included in the graph out of the maximum possible).
Abbreviations: 40K-O-N8 = N8-GP; FVIII = coagulation factor eight.

図 2.6.4-5　　ラット - FVIII 抗原濃度 - 時間プロファイル

PK パラメータは単回投与時にのみ推定された。半減期は 6.9 時間（ELISA）及び 10 時間（発色性合成基質法）、また、分布容積（V_{ss}）は 60～86 mL/kg であると推定された。これはラットの血液量とほぼ同等である[6]。結論として、ラットにおける反復投与時において N8-GP に対する中和抗体が形成され、その結果、曝露が減少し、7/16 匹のラットにおいて第 25 日での曝露は検出限界以下であった。

2.6.4.3.2.3　反復投与 PK 及び免疫原性試験 - Rowett ヌードラットを用いた 6 週間試験（Table 2.6.5.4.B, 212142）

Rowett ヌードラットへの 6 週間反復投与後、N8-GP に対する抗体形成は認められず、長期曝露モデルとして使用可能であることが確認された。

N8-GP の PK 及び免疫原性について、Rowett ヌードラット（Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}）への 6 週間静脈内投与（週 2 回）後に評価を行った。3 種の用量、0、50、1500 IU/kg が投与された。動物の血液試料は、スパースサンプリングデザインに従って、第 1 日目、6 週目の投与前及び投与後 24 時間以内に採取され、バリデートされた凝固一段法を用いて分析された。50 IU/kg 投与群については、LLOQ（6.38 IU/mL）を超えるデータが限定的であったことから、PK は算出されなかった。高用量群（1500 IU/kg）から、Rowett ヌードラットにおける N8-GP の半減期が 10～12 時間であることが確認され、これは Wistar 系ラットで確認された時間と同様であった。用量による標準化を行った場合、静脈内単回投与後の Wistar 系ラットで確認された曝露と同等であった。PK の顕著な性差は認められなかった。6 週間反

復投与後（1500 IU/kg）、累積率は 1.7～1.9 であることが認められた。N8-GP に対する抗体は認められなかった。

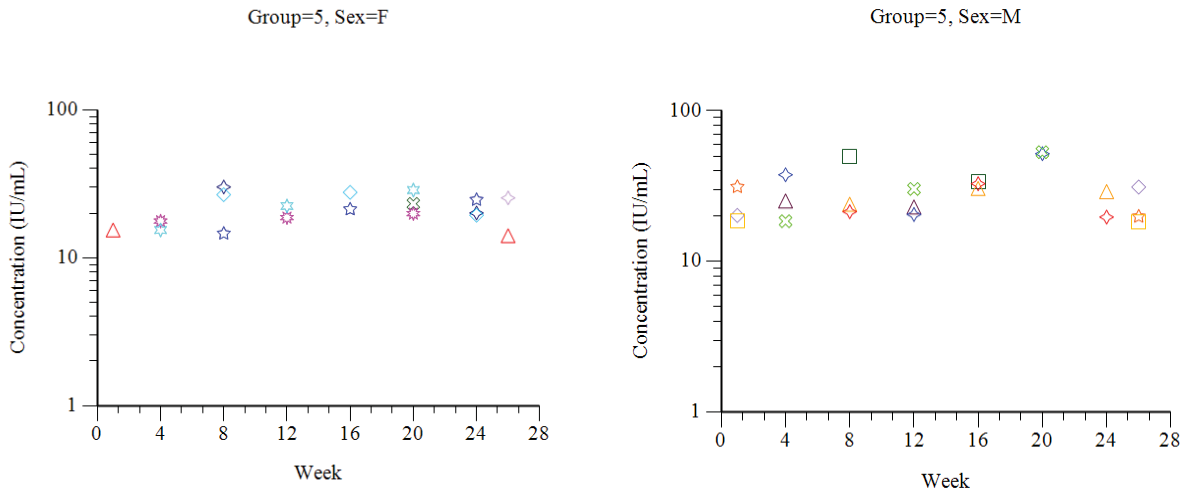
2.6.4.3.2.4　反復投与 - Rowett ヌードラットを用いた 26 週間試験（Table 2.6.5.4.C, 212512）

26 週間投与を行った動物の大多数において曝露が確認され、抗薬物中和抗体が認められたのはわずかであった（3.2%）。

Rowett ヌードラットを用いた 26 週間毒性試験（GLP 適用）において、N8-GP を雌雄動物に 26 週間（4 日に 1 回）、用量 0、50、150、500、1200 IU/kg を静脈内投与した。動物の血液試料は、スパースサンプリングデザインに従って、第 1 日目及び第 26 週目の投与前及び投与後 96 時間以内に採取された。さらに、曝露確認用に、第 4、8、12、16、20、24 週時の投与後 4 時間の血液試料を採取した。血漿試料中 N8-GP は、ヒト血漿標準試料を検量線として用いるバリデートされた FVIII 凝固一段法により測定された。測定された LLOQ（6.51 IU/mL）が高かったことは、マトリックスの影響及び内因性 FVIII への交叉反応性が高いことが組み合わさったことが起因していると考えられた

500 及び 1200 IU/kg 投与群において、用量増加に伴う曝露の増加が確認された。低用量投与群では血漿活性値は LLOQ 付近であるか、又は LLOQ 未満であった。Rowett ヌードラットへの N8-GP の 26 週間（4 日に 1 回）投与後、500 IU/kg 及び 1200 IU/kg 投与群（グループ 4 及び 5）動物の約 60% において FVIII 活性が LLOQ を超えていた。試験期間中 N8-GP に対する中和抗体を形成したのは、すべての投与群の中で抗体を測定した動物 157 匹中 5 匹（3.2%）のみであった。

LLOQ を超える曝露データが限定的であることから、性差、用量比例性及び時間依存性に関する最終的な結論は出せなかった。第 1～26 週の間に月に 1 回、投与後 4 時間で採取した曝露試料について、グループ 3（150 IU/kg）の試料のうち 14%、グループ 4（500 IU/kg）の試料のうち 69%、グループ 5（1200 IU/kg）の試料のうち 89%が LLOQ を超過していた（グループ 5 については図 2.6.4-6 に示す）。



Note: Females are shown to the left, and males are shown to the right. FVIII activity in exposure samples taken 4 hours following dosing. Symbols represent individual animals that were sampled (n=3/sex, sparse sampling). 5-6 out of 6 samples/time point in group 5 were above LLOQ.
Abbreviations: F = female(-s); FVIII = coagulation factor eight; LLOQ = lower limit of quantification; M = male(-s).

図 2.6.4-6　雌雄 Rowett ヌードラットへの 1200 IU/kg （グループ 5）26 週間投与（4 日に 1 回投与）における曝露

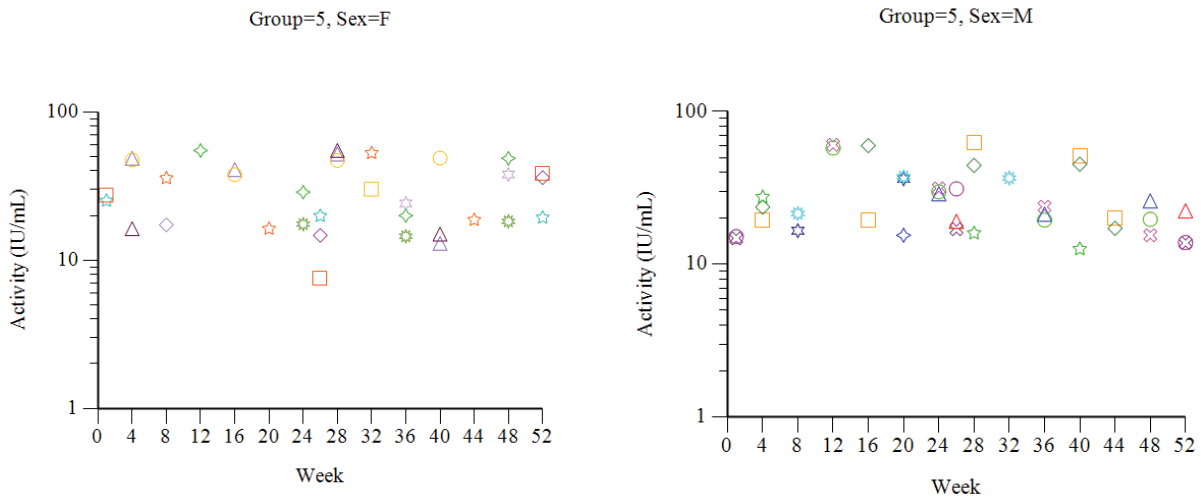
2.6.4.3.2.5　反復投与 PK－Rowett ヌードラットを用いた 52 週間試験（Table 2.6.5.4.D, 213109）

52 週間投与を行った動物の大多数において曝露が認められ、抗薬物中和抗体の形成は少数（3.8%）であった。

Rowett ヌードラットを用いた 52 週間毒性試験において、用量 0、50、150、500、1200 IU/kg の N8-GP を雌雄動物に 52 週間（4 日に 1 回）静脈内投与した。動物の血液試料は、スパースサンプリングデザインにより、第 1 日目、第 26 週目及び第 52 週目の投与前と投与後 96 時間以内に採取された。さらに、曝露確認用に、第 4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 週時の投与後 4 時間の血液試料を採取した。血漿試料中 N8-GP は、ヒト血漿標準を検量線試料として用いるバリデートされた FVIII 凝固一段法により測定された。LLOQ は 6.17 IU/mL であった。

500 及び 1200 IU/kg 投与群において、用量増加に伴う曝露の増加が確認された。低用量投与群では血漿活性値は LLOQ 付近又は未満であった。Rowett ヌードラットへの 52 週間投与後、500 IU/kg（グループ 4）及び 1200 IU/kg 投与群（グループ 5）動物の約 75% において FVIII 活性が LLOQ を超えていた（図 2.6.4-7）。

試験期間中 N8-GP に対する中和抗体を形成したのは、投与群の中で抗体試験をした動物 183 匹中 7 匹（3.8%）のみであった。



Note: Females are shown to the left, and males are shown to the right. FVIII activity in exposure samples taken 4 hours following dosing. Symbols represent individual animals that were sampled (n=3/sex, sparse sampling). 4-6 out of 6 samples/time point in group 5 were above LLOQ.
Abbreviations: F = female(-s); FVIII = coagulation factor eight; LLOQ = lower limit of quantification; M = male(-s).

図 2.6.4-7　雌雄 Rowett ヌードラットへの 1200 IU/kg（グループ 5）52 週間投与（4 日に 1 回）における曝露

2.6.4.3.2.6　反復投与 PKーカニクイザルを用いた 2 週間試験（GLP 適用）（Table 2.6.5.4.E, 209350）

大多数の動物において第 13 日に抗薬物抗体が形成され曝露への影響がみられた。

雄性カニクイザルに対し用量 0、100、500、2500 IU/kg の N8-GP を 14 日間（3 日に 1 回）静脈内投与し、その後 4 週間の回復期間を設けた。各動物から得られた完全な血漿プロファイル、第 1 日の初回投与後及び第 13 日の最終投与後にそれぞれ投与後 72 時間まで評価された。曝露確認用試料は、第 4 日、第 7 日、第 10 日の投与後 6 時間で採取した。追加試料は、回復群の動物（回復期間を経過した動物）から第 21、28、35、42 日に採取した。血漿試料中 N8-GP は、ヒト血漿標準試料を検量線として用いるバリデートされた凝固一段法により測定された（LLOQ 5.82 IU/mL）。

500 及び 2500 IU/kg 投与群のすべての動物において、被験物質の全身曝露がみられた。100 IU/kg 投与群から採取したすべての試料は LLOQ を下回った。第 1 日及び第 13 日の間における曝露は、500 及び 2500 IU/kg 投与群のすべての動物において第 10 日まで確認できた（確認できた曝露が第 7 日までであった動物番号 25（2500 IU/kg）を除く）。第 13 日の最終投与後では、中和抗体形成により、LLOQ

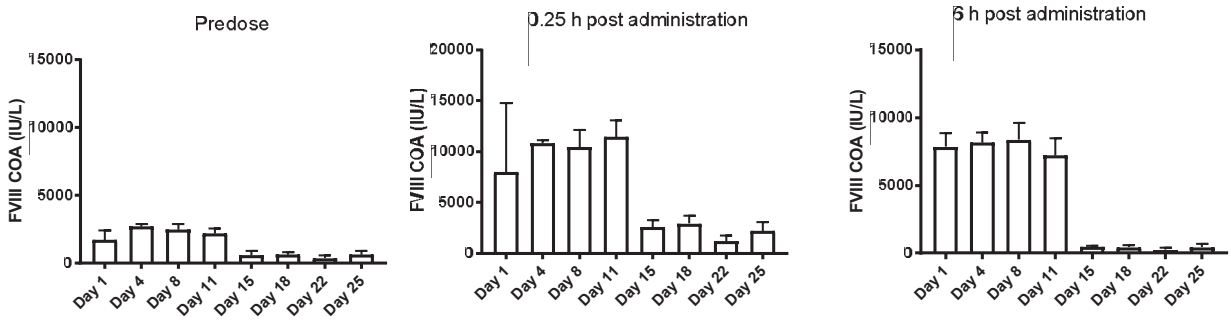
を超える曝露は 500 及び 2500 IU/kg 投与群の動物においてわずかに認められたのみであった。500 及び 2500 IU/kg 投与群への初回投与後の推定 $t_{½}$は、20～49 時間の範囲内であった（平均 $t_{½}$：500 IU/kg において 40 時間、2500 IU/kg において 32 時間）。第 1 日で、500～2500 IU/kg 投与群の $AUC_{0\text{-}72h}$（平均±標準偏差：158 ± 48.2 ～904 ± 237 h*IU/mL）は概して用量比例的に増加した。

2.6.4.3.2.7　反復投与 PK 及び免疫原性試験－カニクイザルを用いた 4 週間探索（GLP 非適用）（Table 2.6.5.3.B, [redacted]）

第 11 日以降、すべての動物において抗薬物抗体が認められ、曝露への影響がみられた（図 2.6.4-8）

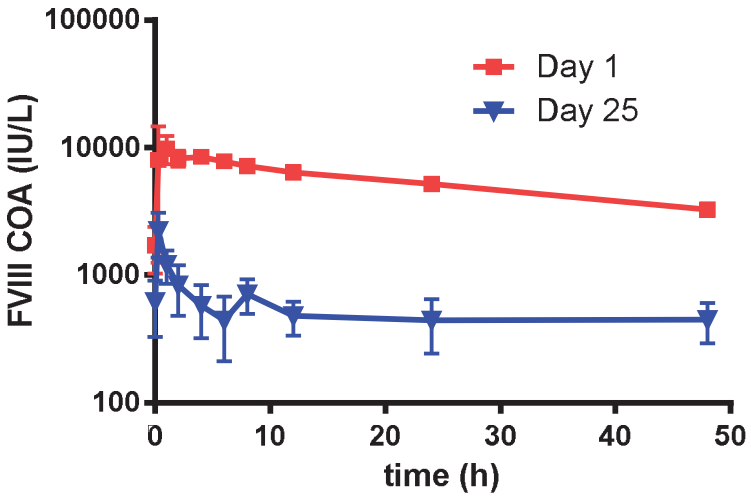
PK 及び中和抗体の形成時期を検討するため、3 頭の健康な雄性カニクイザルへ 250 IU/kg の N8-GP を 4 週間にわたり 8 回（すなわち週に 2 回）静脈内投与した。血液試料はあらかじめ決められた時点で採取し、APTT、PT、フィブリノーゲン濃度を測定し、さらに試料中の中和抗体の形成を分析した。

サルにおいて中和抗体の形成が認められたことから、PK は初回投与に基づいて解析した。ベースラインで標準化した凝固活性データから、平均終末相半減期は 21 時間であり、これは凝固活性に基づくサルに対する rFVIII 投与から得られた約 8 時間という従来の推定半減期と比較して 2.6 倍の長さであった（N8 data from Study ID 207402 [7]）。試験終了時、すべての動物において中和抗体が検出された。各投与後の曝露測定値に基づくと、抗体形成の影響が投与第 15 日以降に検出され、試験終了時では低値の曝露が測定されるのみであった（図 2.6.4-8 及び図 2.6.4-9）。



Note: Each column shows mean and vertical bars ±SD; n=2-3. Graphs optimised from report.
Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight; COA= chromogenic activity.

図 2.6.4-8　サル - FVIII 凝固性活性－時間プロファイル（8 回の投与における投与前、投与後 0.25 時間及び 6 時間後試料）

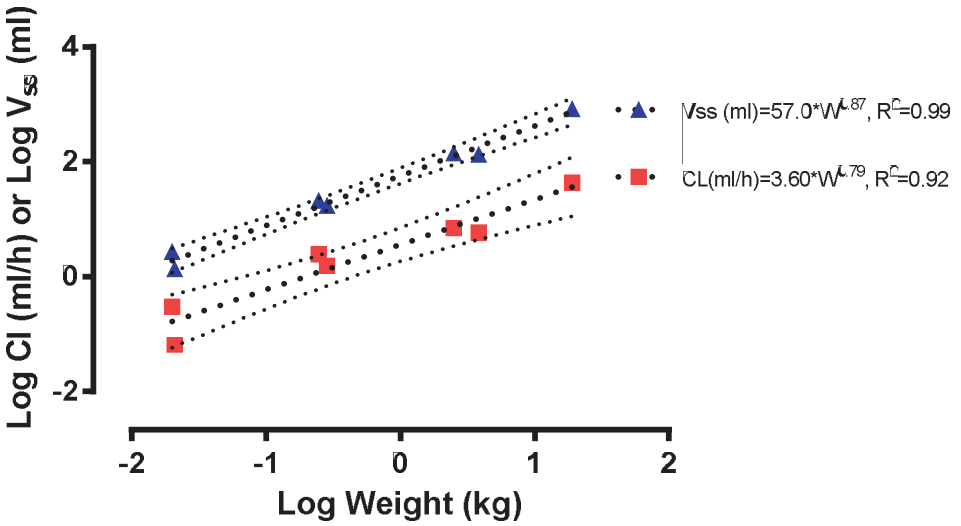


Abbreviations: FVIII = coagulation factor eight; COA= chromogenic activity.

図 2.6.4-9　　サル - FVIII 凝固性活性ー時間プロファイル（片対数プロット）

2.6.4.3.3　　PK の動物種間比較

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。N8-GP の PK は 2.6.4.3.1 に記述のとおり、マウス、ウサギ、サル、血友病 A イヌへの静脈内投与時について検討された。クリアランス（CL）及び定常状態での分布容積（V_{ss}）のアロメトリックスケーリングには、各動物種の体重との経験的な検出力関数が適用された。クリアランス及び分布容積は動物種間のスケーリングが可能で $R^2 > 0.92$ であった。図 2.6.4-10 に記載した関数から、ヒトのクリアランス及び分布容積はそれぞれ 1.7 mL/h/kg 及び 39 mL/kg と予測された（75 kg）。



Species included in figure: mice (mean of 20g, [redacted] and 21 g, [redacted]), rat (mean of 247g, [redacted] and 286 g, [redacted]), rabbit (mean of 2.5 kg, [redacted]), monkey (mean of 3.85 kg, [redacted]) and dog (mean of 19 kg. [redacted]). .

Abbreviations: CL = clearance; R^2 = coefficient of regression; V_{ss} = volume of distribution at steady-state.

図 2.6.4-10　N8-GP のクリアランス及び分布容積のアロメトリックスケーリング

2.6.4.3.4　重要な非臨床安全性試験及び臨床試験結果における曝露比較

重要な反復投与毒性試験での雄性動物の曝露と 50 IU/kg を成人に定期投与した第 3 相試験で得られた曝露の比率についての概要を表 2.6.4-13 に示す。非臨床試験での曝露は凝固一段法、ヒトの曝露は発色性合成基質法に基づいている。

表 2.6.4-13　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

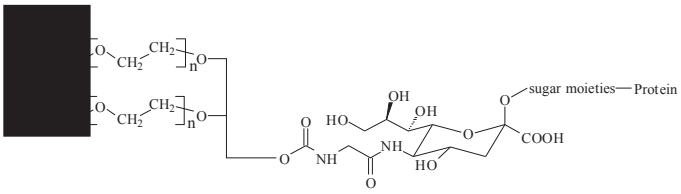
Species	Dose (IU/kg)	Dose interval (h)	C_{max} ratio[a]	AUC ratio[a]
Rat (Rowett nude) (26 weeks)	1200	96	17	10
Rat (Rowett nude) (52 weeks)	1200	96	27	12
Rat (Wistar)	2500	48	66	20
Monkey (cynomolgus)	2500	72	27	25

[a]Ratio of reported C_{max} and AUC from male animals as listed in 表 2.6.4-12 against human C_{max} = 1.358 U/mL and $AUC_{0\text{-}inf}$ = 35.57 h*U/mL (Phase 3, trial 3859 visit 7, adults, dose 50 IU/kg, FVIII chromogenic assay with product-specific standard).

Abbreviations: $AUC/AUC_{0\text{-}inf}$ = area under the curve from time zero to infinity; C_{max} = maximum concentration; FVIII = coagulation factor eight.

2.6.4.3.5　分布及び排泄試験に用いた放射能標識トレーサー

N8-GP の分布及び排泄試験は、同一の ^{3}H 放射能標識トレーサーをすべての試験で用いて実施された（図 2.6.4-11）。PEG 成分中にトリチウム原子を配置し、経時的に PEG の生体内運命を追跡可能とした。



Note: Tritium was incorporated into the end of the PEG moiety as indicated on the detailed structure.

図 2.6.4-11　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の構造

放射能標識トレーサーを用いた試験での用量は、mg タンパク質ではなく、mg 全分子/kg に基づいている。タンパク質及び PEG 用量の推定に用いた分子量を表 2.6.4-14 に示し、推定用量を表 2.6.4-15 に示す。換算係数（1 mg = ～9000 IU）を用いて、IU での活性に相当するよう推定を行った。分布及び排泄データは、40 kDa PEG 単体における同様のデータとともに公表されている[8]。

表 2.6.4-14　放射能標識トレーサーへの換算に用いた分子量

Molecule	Molecular weight (average)
Full molecule (N8-GP) with post-translational glycosylation	219 kDa
Protein with post-translational glycosylation	175 kDa
PEG	40 kDa

Abbreviations: PEG = polyethylene glycol.

表 2.6.4-15　ラットにおける分布及び排泄試験と臨床試験で用いた用量の比

	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 single clinical dose (IU/kg)	370−560	370−560	15−23
Multiple to single clinical dose (HED)	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 in adults, or 75 IU/kg once weekly. Thus for calculating multiples to clinical dose, a single dose range of 50−75 IU/kg was used. Human equivalent dose based on body surface area basis is calculated by multiplying nonclinical dose with 0.32 (monkey) and 0.16 (rat).
Abbreviations: HED = human equivalent dose.

^{3}H 標識トレーサーについて、*in vivo* 安定性及び *in vivo* 活性を検討した。血漿中の *in vivo* 安定性は、生成されたトリチウム水量を特性マーカーとして用いて、経時的に（投与後 12 週間まで）モニターし

た。実際には、血漿試料の凍結乾燥前後の総放射能量を測定した。試験期間（投与後 12 週間まで）を通して、血漿試料中にトリチウム水はほとんど検出されなかったため、トレーサーは安定であり、使用目的に適していると認められ、N8-GP に含まれる PEG 成分の生体内運命に関する有意義な評価が可能であると考えられた。さらに、N8-GP の出発物質（～80%）と比較し、トリチウム水はほぼ完全な *in vitro* 第 IX 因子（FIX）活性を保持することが示された。このことは、放射能標識トレーサーがほぼ完全な *in vitro* FIX 活性を保持することを示唆している（探索的データ）。

トレーサーは O-メチル化非標識 N8-GP とは異なり、O-[redacted]であることに留意する必要がある。この改変により、PEG 成分に最大[redacted]個までのトリチウム原子の導入が可能となった。この改変による分子量の増加は、全分子の分子量と比べてごくわずかである（40.000 Da PEG への約[redacted] Da の追加）。

分布試験である定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験で用いた単回投与での用量は、反復投与毒性試験で検討された量（高用量：1200 IU/kg）に関連し、非常に高かった（4.1 mg/kg 全分子、～28000 IU/kg）。高用量を用いて、投与後 12 週間までの試験延長期間における組織中 PEG 関連放射能の検出を確実に行えるようにした。排泄試験ではより感度の高い検出方法を用いた（LSC）。その結果、高用量（4.1 mg/kg、～28000 IU/kg）及び低用量（0.17 mg/kg、～1160 IU/kg）の双方で放射能が検出可能であった。忍容性について、分布及び排泄試験での高用量単回投与に伴う顕著な問題は認められなかった。

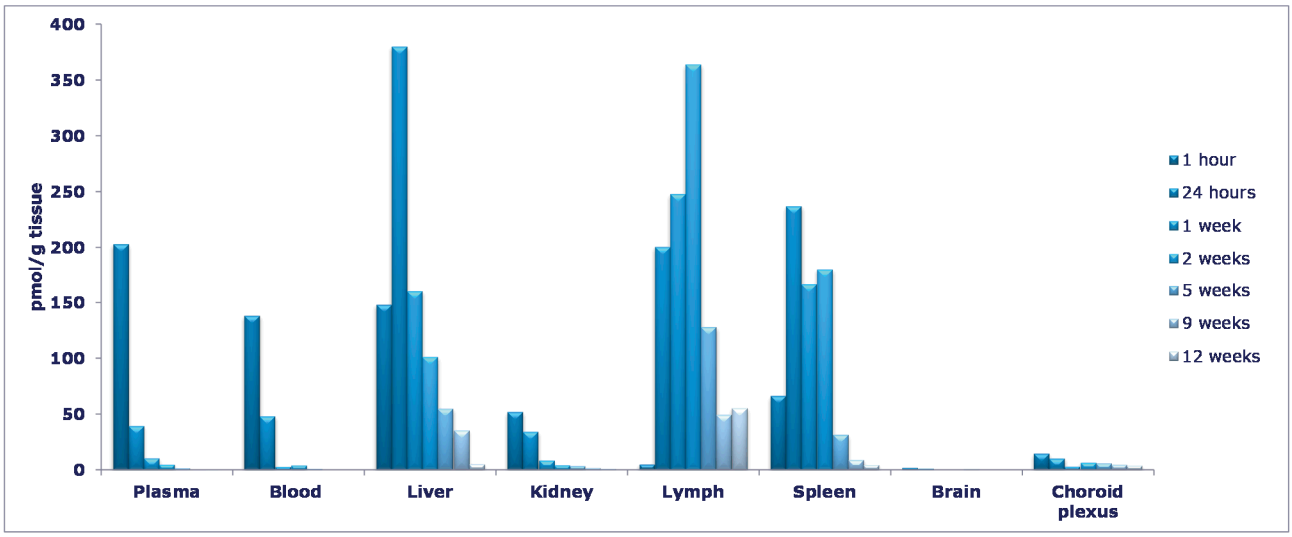
2.6.4.4 分布

N8-GP の PEG 成分の分布を評価するため 3 種の方法が用いられた：定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）、ミクロオートラジオグラフィ、免疫組織化学的染色。QWBA 法は、放射能の測定による経時的な血漿及び組織中の PEG 成分の濃度を定量化するために用いられる。測定した濃度は総 PEG 濃度（結合型及び遊離型）であり、早期時点では N8-GP（結合型）を表し、後期時点は PEG（遊離型）を表している。QWBA 法は血漿、血液及び組織中濃度を経時的に追跡できるため、PEG の薬物動態を説明するために用いることができる（例：終末相半減期、定常状態に至る時間、定常状態での組織濃度）。ミクロオートラジオグラフィ及び免疫組織化学的染色は、局在化を示すために併用されるが、免疫組織化学的染色はミクロオートラジオグラフィより正確性が高い。

2.6.4.4.1 ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）試験（Table 2.6.5.5.A, 212398）

PEG 成分を放射能標識化した N8-GP（4.1 mg/kg、約 28000 IU/kg、PEG 用量として約 0.7 mg/kg）を静脈内単回投与したラットにおける QWBA 試験を実施した。計 9 例のラットに投与がなされ、投与後 1、12、24、96 時間、1、2、5、9、12 週間の時点ごとに 1 例ずつ安楽死させた。PEG 関連放射能はすべての器官に広く分布しており、血流量に富む組織／器官において最も高い放射能が認められ、また、

CNS で最も低かった。データから、PEG は組織へ取り込まれた後、排出前にリンパ系へ再分布することが示された（図 2.6.4-12）。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 QWBA 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). The concentration in the lymph was measured in the thoracic lymph duct.
Abbreviations: PEG = polyethylene glycol; QWBA = quantitative whole body autoradiography.

図 2.6.4-12　ラットにおいて選択した組織及び時点における PEG 濃度の時間推移

すべての組織（57 組織）中の異なる時点における PEG 濃度については Module 2.6.5.5.A 項で示す。

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 3 つ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、細胞及び結合組織における放射能を検出した QWBA の結果が確認された。

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 kDa PEG 化タンパク質で報告された分布プロファイルと同様であった [8,9,10,11]。脳／血液の比は投与後 12 週までのすべての時点において 1 未満であり、脳における PEG 関連放射能は血液中に存在していることが示唆された。他の PEG 化タンパク質においても同様の所見が公表されている [10,11]。脈絡叢において認められた低値の PEG 関連放射能及びその低下は、他の既承認 PEG 化製剤についても確認されている：N9-GP[12]、シムジア® [13]、Peginesatide® [14]（いずれも 40 kDa サイズの PEG と結合）。分布データから、PEG は組織へ取り込まれた後、排出前にリンパ系へ再分布されることが示され、また、リンパ系への取り込みが PEG の排出に

重要な役割を担っていることが示唆された。PEG 化分子の静脈内投与後、同様の所見が確認されている[15,16]。PEG 関連放射能は肝臓及び 腎臓の双方で消失するが、主に肝臓で消失することが示された。このことは、FVIII が肝臓で低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質（LRP）を介して消失する[17,18,19]ことから、rFVIII に附加している PEG も同様の経路を介すると説明できる。

全体として、PEG は経時的にすべての組織から消失すること、また、それにより反復投与時に PEG は累積し続けることなく、定常状態に達することが分布データから示された。

2.6.4.4.2 補助的な免疫組織化学的検討（Table 2.6.5.5.B, 213038）

Study ID 212398 に基づき、選択組織（脳、肝臓、腎臓、心臓、副腎、脾臓及び精巣）について、投与後 1、24、96 時間における免疫組織化学的（IHC）検討を行った。PEG の陽性染色は、投与後 1 時間における肝臓、腎臓及び血管においてのみ認められた。

2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 *In vivo* 代謝

HPLC 法による分析における課題により、N8-GP の代謝に関するデータは得られなかった（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）。しかしながら、これらの試験は 40 kDa PEG 成分及びノナコグ ベータ ペゴル（N9-GP；N8-GP と同様に PEG 成分を放射能標識）について実施されていた。これらの試験から、タンパク質部分は経時的に分解され、40 kDa PEG は尿及び糞中へ排泄されるまで循環していることが示されている [9]。さらに、N9-GP 血漿試料の定性分析から、PEG 成分とタンパク質部分間のリンカー（グリシン）が、タンパク質部分の分解後も PEG 成分上にとどまることが示唆された [9]。同様のグリシンリンカー及び 40 kDa PEG 成分を有すること N8-GP においても同様であると予想される。

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 PEG 成分を放射能標識化した N8-GP における雄性ラットへの静脈内単回投与後の排泄（Table 2.6.5.13.A, 212174 及び Table 2.6.5.13.B, 212399）

PEG 成分の排泄を追跡するため、PEG 成分を放射能標識した N8-GP における排泄及びマスバランス試験を 2 試験実施した。PEG の排泄は、0.17 mg/kg（約 1160 IU/kg、PEG 用量 0.03 mg/kg に相当）又は 4.1 mg/kg（約 28000 IU/kg、PEG 用量 0.7 mg/kg に相当）のいずれかの用量の N8-GP を静脈内単回投与後に検討された。動物（n= 3／投与群）を試験期間の最初の 3 日間は継続的に、以降は 12 週間まで週 1 回 24 時間間隔で代謝ケージ内に収容した。累積回収率のデータを得るため、採取期間と次の採取期間の放射能の回収率を内挿により補完した。用量 0.17 mg/kg を 12 週間投与した後の総放射能の推定平均回収率は 104%であり、そのうち 63%が腎臓に排泄され、33%が糞中から回収され、7%が残屍中に残存した。用量 4.1 mg/kg 投与後の平均回収率は 78%であり、そのうち 34%が腎臓に排泄され、38%が糞中から回収され、6%が残屍中に残存した（表 2.6.4-16）。

表 2.6.4-16 [^{3}H-PEG]-N8-GP 単回静脈内ボーラス投与後の推定排泄回復率

Parameter	[^{3}H]PEG-N8-GP (% of dose)	
	4.1 mg/kg (~28000 IU/kg, PEG load of 0.7 mg/kg)	0.17 mg/kg (~1160 IU/kg, PEG load of 0.03 mg/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.

高用量及び低用量試験で総回収率が異なる根拠は明確ではないが、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、尿及び糞の採取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、高用量を用いた試験において排泄物の大きな部分が失われた可能性がある。しかしながら、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。

2.6.4.6.2 分布・排泄試験（Study 213392〔（Module 4.2.2.5）〕に基づく血漿及び組織中 N8-GP の 40 kDa PEG に関する PK

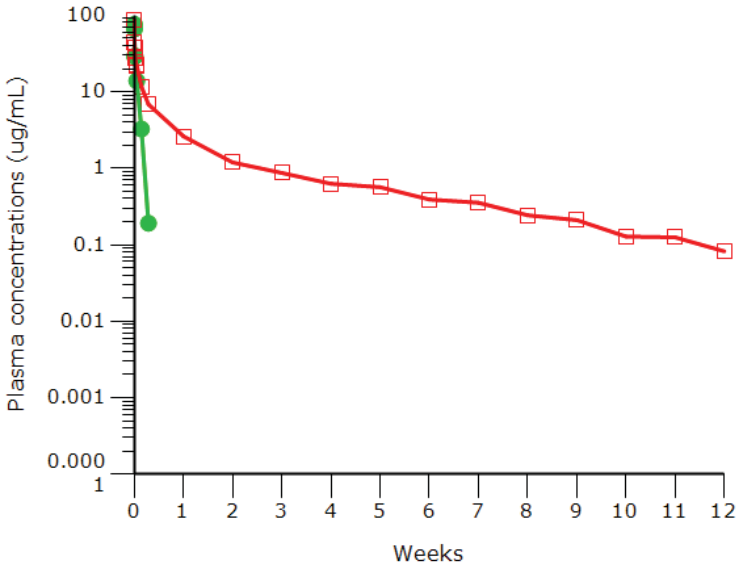
臨床試験及び反復投与毒性試験では組織中 PEG 濃度を測定しなかったため、ラットにおける分布及び排泄試験データを用いて、ノンコンパートメント解析（NCA）による 40 kDa PEG 成分の PK を示し、血漿－組織モデルを作成し反復投与時の血漿及び組織中 PEG 濃度を予測した。これは、以下の目的のために実施した。

- 血漿・組織中 PEG の終末相半減期及び定常状態までの時間の推定。
- ラット及びヒトにおいて血漿・組織中へ達した PEG 濃度の推定。
- 既承認薬からみた臨床的 PEG 曝露についての考察。

2.6.4.6.2.1　N8-GP のタンパク質及び 40 kDa PEG の血漿 PK プロファイル

代謝及び排泄試験の血漿試料は投与後 12 週間まで採取され、PEG 関連総放射能濃度を LSC によって測定した。また、N8-GP のタンパク質部分の生体内運命を追跡するため、血漿中 N8-GP 濃度を ELISA によって評価した。PEG 関連放射能の血漿濃度－時間プロファイルは 2 相性の消失パターンを示し、N8-GP のタンパク質部分は 1 相性のプロファイルを示した（図 2.6.4-13）。タンパク質部分における消失について、$t_{½}$（4.8 時間及び 6.5 時間）は以前単回投与時の PK で示されたものと同様であると推定された（図 2.6.4-9）。N8-GP は 40 kDa PEG 成分を放射能標識しているため、放射能が総 40 kDa PEG（結合型及び遊離型）の生体内運命を表している。そのため、PEG 関連放射能は早期時点では N8-GP の未変化体であり、その後、N8-GP 及び遊離型 PEG の総計（後期時点では遊離型 PEG のみ）となる。したがって、分布試験の後期時点は遊離型 PEG の最終消失を反映している。

血漿プロファイルから、急速に PEG が消失する初期消失相が総曝露量（AUC）の約 50%を占めていることが示された。このことは、投与後第 1 週において用量の約 36～43%が尿及び糞中排泄されるという排泄データと一致している。以降も排泄データと一致しながら、終末相では緩徐な消失が認められた（$t_{½}$：13～19 日）（表 2.6.4-17）。



Note: Single dose 4.1 mg/kg [^{3}H-PEG]-N8-GP corresponding to ~28000 IU/kg N8-GP and 0.7 mg/kg PEG. The red squares show plasma concentration of total PEG radioactivity (measured by LSC), and the green circles show concentration of intact N8-GP (measured by ELISA).
Abbreviations: ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; LSC = liquid scintillation counting; PEG = polyethylene glycol.

図 2.6.4-13　投与後 12 週間までの PEG 及び FVIII タンパク質の血漿濃度ー時間プロファイル

表 2.6.4-17　ラットへの N8-GP 投与後における PEG 関連放射能の推定血漿 PK パラメータ

Study ID	Dose (N8-GP and PEG)	Assay	$t_{½}$ days	V_{ss} (mL/kg)	CL (mL/h/kg)
212174 (excretion study)	0.17 mg/kg ~0.03 mg/kg PEG	LSC	13	300	1.8
212398 (distribution study)	4.1 mg/kg ~0.7 mg/kg PEG	LSC	14	670	2.4
212399 (excretion study)	4.1 mg/kg ~0.7 mg/kg PEG	LSC	19	690	1.8

Abbreviations: CL = clearance; LSC = liquid scintillation counting; PEG = polyethylene glycol; $t_{½}$ = terminal half-life; V_{ss} = volume of distribution at steady-state. Please see 表 2.6.4-8 for information about the used assays.

N8-GP の PEG 成分の血漿中終末相半減期（ラットにおいて 13～19 日）は、他の 20～60 kDa PEG を付加した PEG 化タンパク質又は 40～60 kDa PEG 単体に関する公表論文での結果と一致していた（表 2.6.4-18）。

表 2.6.4-18　血漿中 PEG の終末相半減期

Product	$t_{½}$ (days)
N8-GP (40 kDa PEGylated FVIII)	13−19
Adynovate®/Adynovi® (20 kDa PEGylated FVIII [20])	12−27
Rebinyn®/Refixia® (40 kDa PEGylated rFIX [9])	15−18
Cimzia® (40 kDa PEGylated anti-TNFα [21])	23
40 kDa PEG alone ([8])	19−24
60 kDa PEG alone ([22])	24

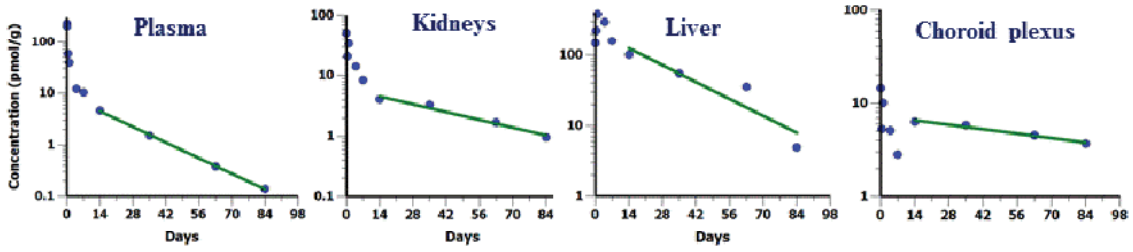
Abbreviations: anti-TNFα = anti-tumour necrosis factor-alpha; FVIII = coagulation factor eight; PEG = polyethylene glycol; rFIX = recombinant coagulation factor nine; $t_{½}$ = terminal half-life.

2.6.4.6.2.2　PEG の半減期及び定常状態までの時間の推定

ラットにおける分布及び排泄データを用い、ノンコンパートメント解析（NCA）によって 40 kDa PEG 成分の PK が示された。

ラットにおける単回投与時での分布及び排泄データから、N8-GP の PEG 成分は経時的に消失することが示されている。PK の基本原理から、PEG は組織中に累積し続けることはなく、一定の定常状態に達する。定常状態までの時間は、各組織中の PEG 消失半減期により決定される。

PEG の組織中終末相半減期は、ラットにおける分布データで確認された終末相に回帰直線を当てはめるという標準的な方法により推定した。これを図 2.6.4-14 に例示する。データはラットの血漿（中心コンパートメント）、腎臓及び肝臓（排泄器官）、脈絡叢（緩徐に消失する組織の代表例）から得られたものである。



Note: PEG concentration versus time plots show actual data (dots) and regression lines (green line).

図 2.6.4-14　N8-GP 28000 IU/kg 静脈内投与後の選択組織における PEG 関連物質濃度（pmol/g）の時間推移

ラットの組織中における PEG 終末相半減期はそれぞれ、血漿（中心コンパートメント）、肝臓及び腎臓（排泄器官）、脈絡叢（緩徐に消失する組織の代表例）について推定された（図 2.6.4-19）。血漿、

腎臓及び肝臓における終末相半減期は同様であったが、脈絡叢においてはより緩徐であった。このことは、他の組織と比べて脈絡叢での細胞代謝が低く、そのため消失は主にエキソサイトーシスに依存することに起因する可能性がある（図 2.6.4-10、[23]）。N8-GP 及び 40 kDa PEG では、動物種間にアロメトリックな関係がみられている（図 2.6.4-10、[23]）。アロメトリックスケーリングを用いて、非臨床分布データから、ヒト組織での PEG の終末相半減期を予測した（表 2.6.4-19）。PK の基本的原理から、定常状態到達までの時間は終末相半減期により決定される。経験則的に、定常状態での濃度 90%を示す 3.3 半減期後に、定常状態に達すると考えられる[24]。

表 2.6.4-19　N8-GP の血漿、腎臓、肝臓、脈絡叢における PEG 終末相半減期

		Plasma	Liver	Kidney	Choroid plexus
Terminal elimination $t_{½}$ (days)	Rat	14	18	33	89
	Human[a]	54	69	128	346
Time to steady-state (month)[b]	Rat	1.5	2	3.6	10
	Human	6	8	14	38

[a]Human $t_{½}$ = rat $t_{½}$ x (BW human/BW rat)^0.25 [24]. [b]3.3 x t½ (90% steady-state) [24].
Abbreviations: BW = body weight; $t_{½}$ = terminal half-life.

ラットにおいて、有害影響が認められなかった 52 週間毒性試験期間中にすべての組織が定常状態値に達すると予測された。

ヒト組織において、定常状態に達するまでの予測時間は 1～3 年と推定された。臨床試験中、N8-GP を投与された患者における安全性の懸念は認められなかった。投与を行った 270 例のうち、192 例（63 例の小児患者を含む）は 3 年超、135 例（12 例の小児患者を含む）は 4 年超、16 例（小児患者なし）が 5 年超投与された（Module 2.5.5.6 及び 2.5.6）。

2.6.4.6.2.3　反復投与後の PEG 濃度推定のための血漿 - 組織モデル

ラットの分布データを用いて血漿 - 組織 PK モデルを作成し、ラット及びヒトへの反復投与後の血漿・組織中 PEG 濃度を予測した。血漿 - 組織モデルの原理は Study ID 213392（Module 4.2.2.5）に詳述している。血漿は、組織に対して PEG が分布する際の中心コンパートメントである。静脈内投与後における血漿への移行速度は、用量及び投与頻度の組み合わせで表される。組織中においては、血漿からの移行速度は血漿中濃度により、組織からの排出速度は組織消失速度により決定される（ラットでの分布試験における規定どおり）。移行速度及び排出速度が平衡状態となったとき、組織中において定常状態に達する（図 2.6.4-15）。

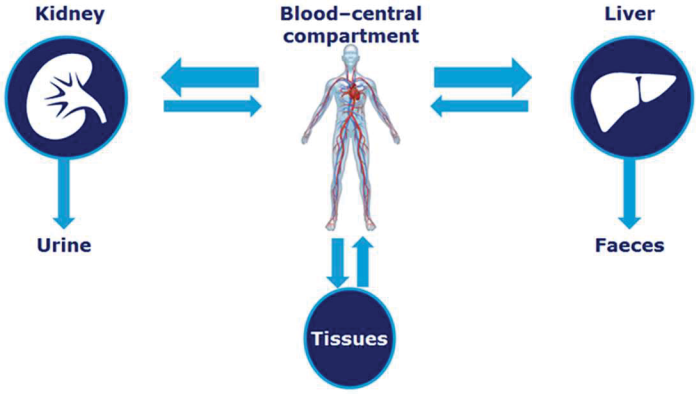


図 2.6.4-15　血漿からの移行速度及び排出速度（すなわち組織からの消失）が平衡状態となったとき組織中において定常状態値に達する

ラットの定常状態での血漿及び組織中 PEG 濃度は、小児、思春期及び成人での臨床試験結果から推定された定常状態での PEG 濃度と比べて 2～4 倍高いと推定される。

ラットについて、有害影響が認められなかった 52 週間毒性試験期間中にすべての組織が定常状態値に達すると予測された。1200 IU/kg（4 日に 1 回）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 濃度は LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。この所見はモデル予測とも一致している。CSF における PEG は NMR 法では検出できなかった。

ヒトについて、すべての組織において定常状態 PEG 値に達するまで 1～3 年以内であると予測された。5 年間までの臨床試験において、有害所見又は安全性の懸念は認められなかった。臨床上の血漿中 PEG 濃度は、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 倍低くなると予測されるため、現在の NMR 法では検出できない。ノボ ノルディスク社は現在、PEG 曝露の測定のため、より高感度な分析法（例：LC-MS 又は ELISA）を確立すべく検討を行っている。

2.6.4.6.2.4　既承認薬からみた N8-GP の臨床上での PEG 曝露

N8-GP の予防投与における定常状態での PEG 濃度（0.2 µg/mL 未満）は、Rebinyn®／レフィキシア®（～5 µg/mL）を 4.5 年間まで週に 1 回投与した小児患者及びシムジア®（～30 µg/mL）を投与した妊娠中の女性において測定された定常状態 PEG 濃度よりかなり低くなると予測される[25]。現時点まで、Rebinyn®/レフィキシア®による臨床試験において、PEG に関連する安全性の懸念は認められていない[26,27]。163 の盲検試験及び 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 非含有抗 TNFα 治療（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を行った[28]。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止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[28,29]。そのため、N8-GP の PEG に関連する安全性の所見リスクは低いと考えられる。

2.6.4.7 薬物動態学的相互作用

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。しかしながら、タンパク質部分（rFVIII）と VWF の相互作用を阻害する薬物によりクリアランスが増加し、その結果 N8-GP の半減期が短縮される可能性がある。これらの可能性のある相互作用は、他の FVIII 製剤又は内因性 FVIII とであると予測される。そのため、ICH S6(R1)ガイドラインに従い[30]、N8-GP の非臨床薬物動態学的相互作用試験は実施しなかった。

PEG 化薬剤については広く研究されているが PEG 成分に起因する薬物相互作用は予期されておらず、また、タンパク質／ペプチドに結合した PEG 成分に関連する薬物相互作用について文献報告における記述はない。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

臨床開発プログラム後期に導入された原薬の製造変更を支持する試験の概要は Module2.6.6.8.2（[redacted]）に記載した。

2.6.4.8.1 *In vitro* – [^{3}H-PEG]-N8-GP ラットにおける血球分配（Table 2.6.5.16.A, 214153）

PK パラメータ及び代謝の評価において血漿が適切なマトリックスであるかを検討するため、K_2EDTA、3.8%クエン酸又は抗凝固剤としてのヘパリンリチウムを用いて採取したラット血液で、N8-GP の i*n vitro* 血球分配を検討した。それぞれのラットから、血液試料を K_2EDTA、3.8%クエン酸又はヘパリンリチウムでコーティングしたチューブに採取し、抗凝固剤ごとにプールした。被験物質を 4 µg/mL 及び 100 µg/mL の理論濃度で添加した血液試料を 37℃で、0、30、60 及び 120 分間反応させた後、血球分配を測定した。4 及び 100 µg/mL の濃度では、放射能標識 N8-GP の赤血球中への顕著な取り込みは認められなかった。また、使用した抗凝固薬は検討した濃度範囲での取り込みに影響を及ぼさなかった。このデータにより、放射能標識 N8-GP 物質の赤血球分配はごくわずかであり、PK パラメータ及び代謝の評価において血漿が適切なマトリックスであることが確認された。

2.6.4.8.2　タンパク質部分を放射能標識した N8-GP の臓器及び細胞への分布

タンパク質骨格を ^{125}I で標識した N8-GP を合成し、これを用いて、N8-GP タンパク質部分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臓モデルで検討した。Glycoiodination はタンパク質の特異的活性に影響を及ぼさないことが認められ、また、ラットへの投与後 30 時間までの *in vivo* 安定性が確認された。放射能は、タンパク質部分の生体内運命を追跡するためタンパク質部分の中に配置された（タンパク質部分の PK と同様の PK が予想される）。

実験計画の要約：

- N8 及び N8-GP は、灌流液及び投与後 120 分間までに採取した試料に 4 IU/mL を添加したラットにおける *in situ* 肝臓灌流モデルで比較し、試料中の FVIII 活性を分析した。
- ラットに[^{125}I]-N8-GP 220 IU/kg を静脈内投与し、16 時間後に肝臓を生理食塩水に続きコラーゲン分解酵素で灌流した。その後、肝細胞分画を隔離し、それぞれの細胞集団の放射能を測定した。
- *In vitro* 結合及び細胞内取込を検討する試験は、主として[^{125}I]-N8-GP を用いたラット肝細胞で行った。

解剖学的組織分布試験において、大多数の N8-GP 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 時間未満の時点では腸内でも放射能が検出された。腎臓、脾臓及び肺では、初期の時点で微弱シグナルが認められた。*In situ* 肝臓潅流モデルで N8 及び N8-GP のクリアランスを比較すると、N8-GP の約 2.5 倍の速度で N8 が消失することが確認された。N8-GP は、主として肝細胞及び肝類洞壁内皮細胞（LSECs）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。

要約すると、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 LSECs を伴う）を介して消失する。N8 と比較して、N8-GP の肝臓における代謝は遅く、観察された N8-GP の血中循環の延長と一致するものであった。

2.6.4.9 考察及び結論

2.6.4.9.1 N8-GP の PK

N8-GP の PK は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サルへの静脈内単回投与（125～280 IU/kg）後に評価された。rFVIII と比較して N8-GP の終末相半減期は約 2 倍増加していることが確認された。このことは、rFVIII と比較して N8-GP のクリアランスが約 1/2 に減少していることによると考えられる（N8-GP 及び rFVIII の分布容積は同様）。

Wistar 系ラット及びカニクイザルにおいて抗薬物抗体による曝露への影響が 25 及び 11～15 日後にそれぞれ認められた。このことは、N8-GP のヒト FVIII タンパク質が動物種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。そのため標準的な毒性試験動物種（2～4 週間未満）における長期毒性試験を実施する意義はないものと考えられた。そこで、N8-GP の長期の曝露及び毒性評価を可能にするため、免疫系反応を回避するため免疫不全動物モデル（Rowett ヌードラット）を導入した。最長 52 週までの反復投与を行った本モデルにおいて、長期曝露が確認された。

毒性試験における 2 種類の高用量で、曝露は用量増加に伴い増加した。測定法の LLOQ が高いため、2 つの高用量群の PK のみが利用可能であったため毒性試験において用量比例性が評価できなかった。しかしながら、血漿中の内因性 FVIII 値を阻害しない F8-KO マウスにおいて、35～280 IU/kg の用量範囲で、用量比例性が評価され確認された。

2.6.4.9.2 PEG 成分の分布排泄及び PK

組織分布、代謝及び排泄試験は、PEG 成分の末端に組み込まれたトリチウム原子による放射能標識トレーサーを用いて、特に PEG 成分に焦点を置き実施した。

全体として、N8-GP の分布パターンは他の 40 kDa PEG 化タンパク質（例： N9-GP[9]、Peginesatide® [10]、40 kDa PEG 成分 [8]）で認められたものと同様である。PEG 関連放射能はすべての器官に広く分布しており、血流量の多い組織／器官において放射能が最も高く、また、CNS で最も低かった。

他の PEG 化タンパク質と同様に、N8-GP のタンパク質部分はリソソーム酵素によるタンパク質分解によって短いペプチド及びアミノ酸に分解され、循環血中に PEG 部分が残ると予測される。このことは、公表されている N9-GP に関する血漿の代謝物プロファイルのデータ [9]によって支持される。他の PEG 化化合物に関する文献においても同様の結論が公表されている[31,32,33,34]。PEG 部分とタンパク質部分の間のリンカー（グリシン）は、N9-GP でみられたように、PEG 部分に留まると考えられる [9]。

分布及び排泄試験のデータから、N8-GP 投与後の PEG 関連放射能は腎臓及び肝臓を介して排出されることが認められた。このことは、他の PEG 化タンパク質に関して既に公表されているデータと一致している [11,21,33,35]。PEG 単体を用いた試験と比較して、高い割合の PEG 関連物質が糞を介して排泄された（PEG 単体で 12～13%に対し、N8-GP で 33%以上 [8]）。このことの理由として、FVIII が LRP 経路を介して肝臓で選択的に排出されるため、FVIII に附加した PEG も本経路で排出される可能性があることが考えられる。

分布試験において、低値の放射能が最終時点（投与後 12 週）で検知されたが、特定の組織／臓器への局在化は認められなかった。排泄データから、投与後 12 週時点で未排泄の放射能量は、ラットにおいて投与放射能の 6–7%であることが示された。未排泄分の割合についても、40 kDa PEG[8]及び N9-GP（40 kDa PEG で PEG 化したレフィキシア®/Rebinyn®[9]）でみられたものと同様であった。他の様々な PEG 化タンパク質及び大きな PEG の排泄回収率は表 2.6.4-20 のとおりであり、20 kDa PEG 及び 60 kDa PEG 双方において同様の結果が示されている（しかしながら、60 kDa PEG が長期間（24 週間）であることに対し、20 kDa は短期間（6 週間）で排泄された）。排泄回収に要した時間の差異は、循環中の遊離型 PEG の初期クリアランスが、サイズの大きな PEG と比較して、よりサイズの小さい PEG において増加するためだと考えられる[36]。しかし、報告された終末相半減期が同様であること（表 2.6.4-18）及び残屍中の残量はわずかであることに反映されている通り、PEG 成分が組織に分布した後、残存する PEG は 20、40、60kDa PEG ともに終末相では同様の速度で消失すると考えられる（表 2.6.4-20）。

表 2.6.4-20　PEG 化タンパク質及び PEG に関するラットにおける排泄回収率の概要

PEGylated proteins	PEG size (kDa)	PEG dose (µg/kg)	% excreted (after xx weeks)			% in carcass (after xx weeks)		
			6 weeks	12 weeks	24 weeks (6 months)	6 weeks	12 weeks	24 weeks (6 months)
Adynovate®[a]	20	198	M: 97% F: 107%	-	-	M: 3% F: 3%	-	-
N8-GP	40	30	77%	104%	-	-	7%	-
N8-GP	40	700	59%	78%	-	-	6%	
N9-GP[b]	40	600	55%	77%	-	-	5%	-
N9-GP[b]	40	120	83%	112%	-	-	7%	-
Cimzia®[c]	60	176000	-	83%	-	-	-	-
PEGs								
PEG[d]	40	1000	82%	93%	-	-	5%	-
PEG[d]	40	12000	79%	93%	-	-	6%	-
PEG[e]	60	11000	-	-	89%	-	-	4%

[a]1 mg/kg ~198 µg PEG/kg when using info from Stidl et al., 2016 [37] (SA: 2088 IU/kg and 0.095 µg PEG/IU FVIII). Amount in carcass is calculated based on information related to recovery in urine, faces and total recovery. [b]See [9]. [c]Data from Cimzia® are conducted with unlabelled compound: no information for PEG in carcass [21]. [d]See [8]. [e]60 kDa PEG incoorporated in BAY 94-9027 (PEGylated FVIII from Bayer [22]).

(-) means no available data or information.

Abbreviations: F = female(s); M = male(s); PEG = polyethylene glycol.

組織における推定終末相半減期を用いて、ラットの定常状態までの時間を推定した結果、組織に応じて約 1.5～10 箇月であった。このことから、ラットにおける N8-GP の長期毒性試験の最長期間である 52 週間（12 箇月）以内に、すべての組織が定常状態に達したと考えられた。

52 週間長期毒性試験において、1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）を 26 週間及び 52 週間反復投与後では、定常状態の 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。52 週間長期毒性試験におけるラットでの最高用量 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）（NOAEL）と小児及び成人患者における長期予防治療 50～60 IU/kg（週に 2 回）を比較した結果、ラットとヒトの血漿及び組織曝露比は約 2～4 倍となると予測された。52 週間長期毒性試験及び最長 5 年の投与を行った臨床試験において、有害所見又は安全性の懸念は認められなかった。

2.6.4.9.3 結論

各動物種において rFVIII と N8-GP を比較した結果、N8-GP の半減期は約 2 倍に延長し、クリアランスは約 1/2 に減少し、分布容積は同様であることが示された。

反復投与後、中和抗体が形成されたことにより、Wistar 系ラット及びカニクイザルにおいて経時的に曝露が減少した。T 細胞依存免疫反応を回避するために Rowett ヌードラットを導入した。Rowett ヌードラットへの最長 52 週間までの投与で長期の曝露が確認された。

N8-GP の PEG 部分は、広範に分布し、経時的に血漿及び組織中から消失し、尿及び糞中に排泄されることが示された。1200 IU/kg（4 日に 1 回）を 26 週間及び 52 週間反復投与後の 52 週間長期毒性試験において、定常状態での血漿中 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。

ノボ ノルディスク社は、非臨床 PK プログラムにより、血友病 A 患者における承認を支持するための N8-GP 及び PEG の PK 特性は十分に明らかにされたと考える。

参考文献

[1] Guidance to Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). May 2001.

[2] DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, et al. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. Pharm Res. 2003;20(11):1885-900.

[3] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, DeStefano AJ, Rose MJ, Sailstad J, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. AAPS J. 2007;9(1):E30-42.

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

[5] Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, et al. Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. J Pharm Biomed Anal. 2008;48:1267-81.

[6] Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J Appl Toxicol. 2001;21(1):15-23.

[7] Beck W. NN7008: Single intravenous dose escalation and toxicokinetic study in the male cynomolgus monkey. Study No. 0665/920, Sponsor's Ref. No. 207402. 2011.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

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

[12] Fernyhough P, Akroyd D. [3H]PEG-N9-GP Polyethyleneglycol (PEG): Tissue Distribution of Radioactivity in the Rat by Quantitative Whole Body Autoradiography and Qualitative Micro Autoradiography. Study no. 8298617, Sponsors Ref. No. 214076.

[13] FDA. Cimzia®: Pharmacology Reviews. BLA 125160/0. 18 April 2008.

[14] FDA. Omontys®: Pharmacology Reviews. Application Number: 202799Orig1s000. 27 Feb 2012.

[15] Kaminskas LM, Ascher DB, McLeod VM, Herold MJ, Le CP, Sloan EK, et al. PEGylation of interferon alpha2 improves lymphatic exposure after subcutaneous and intravenous administration and improves antitumour efficacy against lymphatic breast cancer metastases. J Control Release. 2013;168:200-8.

[16] Zou Y, Bateman TJ, Adreani C, Shen X, Cunningham PK, Wang B, et al. Lymphatic absorption, metabolism, and excretion of a therapeutic peptide in dogs and rats. Drug Metab Dispos. 2013;41:2206-14.

[17] Bovenschen N, Herz J, Grimbergen JM, Lenting PJ, Havekes LM, Mertens K, et al. Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency. Blood. 2003;101(10):3933-9.

[18] Saenko EL, Yakhyaev AV, Mikhailenko I, Strickland DK, Sarafanov AG. Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. J Biol Chem. 1999;274(53):37685-92.

[19] Strickland DK, Au DT, Cunfer P, Muratoglu SC. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: role in the regulation of vascular integrity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2014;34(3):487-98.

[20] 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.
[21] Nesbitt AM, Stephens S, Chartash EK. Certolizumab pegol: a PEGylated anti-tumour necrosis factor alpha biological agent. In: Veronese FM, editor. PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications; Basel: Birkhäuser Verlag; 2009. p. 229-54.
[22] 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.
[23] Sternebring O. Pharmacokinetic evaluation, modelling and simulation in animals and humans based on rat tissue distribution data of N9-GP. Study No. 300030. 2017.
[24] 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.
[25] 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.
[26] FDA. Rebinyn®: Summary Basis for Regulatory Action. STN#: 125611/0. 31 May 2017.
[27] EMA. Refixia®: Assessment Report. Procedure Number EMEA/H/C/004178/0000. EMA/346525/2017. 23 March 2016.
[28] 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.
[29] 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.
[30] ICH S6(R1). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.
[31] 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.
[32] Elliott VL, Edge GT, Phelan MM, Lian LY, Webster R, Finn RF, et al. Evidence for metabolic cleavage of a PEGylated protein in vivo using multiple analytical methodologies. Mol Pharm. 2012;9:1291-301.
[33] 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.
[34] 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.
[35] 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.
[36] Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. J Pharm Sci. 1994;83(4):601-6.
[37] 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.

ツロクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.5 薬物動態試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.5.1 薬物動態試験の概要 4
2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告 5
2.6.5.3 単回投与時の吸収 6
2.6.5.3.A F8-KO マウスにおける N8-GP の用量比例性 6
2.6.5.3.B F8-KO マウス、C57Bl/6 マウス、Sprague Dawley 系ラット、Wistar 系ラット、ニュージーランドホワイト種ウサギ及びカニクイザルにおける N8-GP の薬物動態 7
2.6.5.4 反復投与時の吸収 10
2.6.5.4.A トキシコキネティクスーWistar 系ラットにおける反復投与（試験番号 209355） 10
2.6.5.4.B 薬物動態－ Rowett ヌードラットにおける反復投与（試験番号 212142） 12
2.6.5.4.C 26 週時におけるトキシコキネティクス－ Rowett ヌードラットにおける反復投与（試験番号 212512） 13
2.6.5.4.D 52 週時におけるトキシコキネティクス－ Rowett ヌードラットにおける反復投与（試験番号 213109） 15
2.6.5.4.E トキシコキネティクスーカニクイザルにおける反復投与（試験番号 209350） 17
2.6.5.5 組織分布 18
2.6.5.5.A 定量的組織分布（QWBA）及びミクロオートラジオグラフィ（MARG）（試験番号 212398） 18
2.6.5.5.B Covance 社で実施された試験〔試験番号 826525（212398）〕から選択した組織を用いた免疫組織化学的検討（試験番号 213038） 21
2.6.5.6 血漿中タンパク質結合 21
2.6.5.7 妊娠中又は授乳期の動物での試験 21
2.6.5.8 その他の分布試験 21
2.6.5.9 *In vivo* 代謝 21
2.6.5.10 *In vitro* 代謝 21
2.6.5.11 推定代謝経路 22
2.6.5.12 薬物代謝酵素の誘導及び阻害 22
2.6.5.13 排泄 23
2.6.5.13.A [^{3}H]-N8-GP を単回静脈内投与時の雄性ラットにおける排泄（試験番号 212174） 23
2.6.5.13.B [^{3}H]-N8-GP を単回静脈内投与時の雄性ラットにおける排泄（試験番号 212399） 24
2.6.5.14 胆汁中排泄 25
2.6.5.15 薬物相互作用 25

2.6.5.16　その他の薬物動態試験 26
2.6.5.16.A　*In vitro* 赤血球分配（試験番号 214153） 26
2.6.5.16.B　Sprague Dawley 系ラットにおける *in vivo* 及び肝細胞での N8-GP の分布（試験番号 301241） 27

2.6.5.1 薬物動態試験の概要

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID (GLP status)	Location in CTD
Absorption					
Single-dose pharmacokinetics	F8-KO mouse	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-1
Single-dose pharmacokinetics	F8-KO mouse	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-2
Single-dose pharmacokinetics	Mouse (C57Bl/6)	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-3
Single-dose pharmacokinetics	Rat (Sprague Dawley)	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-4
Single-dose pharmacokinetics	Rabbit (New Zealand White)	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-5
Single-dose pharmacokinetics	Dog	i.v.	In life: University of North Carolina, USA; PK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.1.1-14
Repeat-dose pharmacokinetics	Rat (Wistar)	i.v.	Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-6
Repeat-dose toxicokinetics 2 weeks	Rat (Wistar)	i.v.	In life: Covance; TK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	209355 (GLP)	4.2.3.2-1
Repeat-dose pharmacokinetics 6 weeks	Rat (Rowett nude rat)	i.v.	In life: Envigo[a], UK; TK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	212142 (non-GLP)	4.2.2.2-7
Repeat-dose toxicokinetics 26 weeks	Rat (Rowett nude rat)	i.v.	In life: Envigo[a], UK; TK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	212512 (GLP)	4.2.3.2-2
Repeat-dose toxicokinetics 52 weeks	Rat (Rowett nude rat)	i.v.	In life: Envigo[a], UK; TK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	213109 (GLP)	4.2.3.2-3
Repeat-dose pharmacokinetics	Monkey (cynomolgus)	i.v.	In life: Covance; PK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	[redacted] (non-GLP)	4.2.2.2-8
Repeat-dose toxicokinetics 2 weeks	Monkey (cynomolgus)	i.v.	In life: Covance; TK + Bioanalysis: Novo Nordisk, DK	209350 (GLP)	4.2.3.2-5
Distribution					
Distribution	Rat (Wistar)	i.v.	Covance, UK	212398 (non-GLP)	4.2.2.3-1
Distribution	Rat (Wistar)	i.v.	Novo Nordisk, DK	213038 (non-GLP)	4.2.2.3-2

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID (GLP status)	Location in CTD
Metabolism					
No studies performed					
Excretion					
Excretion	Rat (Wistar)	i.v.	Covance, UK	212174 (non-GLP)	4.2.2.5-1
Excretion	Rat (Wistar)	i.v.	Covance, UK	212399 (non-GLP)	4.2.2.5-2
Pharmacokinetic drug interactions					
No studies performed					
Other					
Distribution	*In vitro* (Blood from Wistar rat)	N/A	Covance, UK	214153 (non-GLP)	4.2.2.7-1
Distribution	Rat (Sprague Dawley)	i.v.	Novo Nordisk, DK	301241 (non-GLP)	4.2.2.7-2

[a]Huntingdon Life Sciences has changed name to Envigo.
Abbreviations: C57Bl/6 = C57 black, a common inbred strain of laboratory mouse widely used as background strain for genetically modified mice; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intraveneous(-ly); N/A = not applicable; PK = pharmacokinetic(-s); TK = toxicokinetic(-s).

2.6.5.2 分析法及びバリデーション報告

Details can be found in Module 2.6.4.2.

2.6.5.3 単回投与時の吸収

2.6.5.3.A F8-KO マウスにおける N8-GP の用量比例性

Report title: Pharmacokinetics and dose-proportionality of 40K-O-N8 after i.v. administration to F8-KO mice								
Study ID	[redacted]							
Location in CTD	4.2.2.2-1							
Species	**Mouse (F8-KO)**							
Gender (M/F) / Number of animals	12 animals per dose group, app. 1M:1F							
Feeding condition	Fed							
Vehicle/Formulation	Concentration of N8-GP ranging from 7 to 56 IU/mL. Formulated in: $CaCl_2$ (0.25 mg/mL), L-histidine (1.5 mg/mL), NaCl (18 mg/mL), Tween 80 (0.1 mg/mL), saccharose (3 mg/mL) and methionine (0.055 mg/mL), pH ~6.9; Batch: 0129-0000-1003-9A							
Method of administration	Intravenous							
Dose (IU/kg)	35, 70, 140, 280							
Sample	Plasma							
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003)							
Assay	FVIII antigen (by ELISA) and FVIII activity (by FVIII Chromogenic activity assay [Chrom. Act.])							
PK parameters:								
Dose (IU/kg)	**35**		**70**		**140**		**280**	
Assay	Chrom. Act.	ELISA	Chrom. Act.	ELISA	Chrom. Act.	ELISA	Chrom. Act.	ELISA
C_{max} (IU/L)	589	347	1339	679	2636	1330	4717	2900
AUC (h*IU/L)	10958	6792	18030	9366	39714	21589	90577	53208
$t_{1/2}$ (h)	17	18	11	12	12	12	15	17
Cl (mL/h/kg)	3.2	5.2	3.9	7.5	3.5	6.5	3.1	5.3
V_{ss} (mL/kg)	77	134	58	124	61	115	64	126
Additional information: 40K-O-N8 = N8-GP. Composite profiles based on a mean of male and female. Approximate dose proportional increase in exposure (AUC) and C_{max}.								

2.6.5.3.B F8-KO マウス、C57Bl/6 マウス、Sprague Dawley 系ラット、Wistar 系ラット、ニュージーランドホワイト種ウサギ及びカニクイザルにおける N8-GP の薬物動態

Study ID	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Location in CTD	4.2.2.2-2	4.2.2.2-3	4.2.2.2-3
Species	**F8-KO mouse**	**Mouse (C57Bl/6)**	**Mouse (C57Bl/6)**
Gender (M/F) / Number of animals	6M/6F 4 mice at each time point[b]	9M/9F 3 mice at each time point[b]	9M/9F 3 mice at each time point[b]
Feeding condition	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	56 IU/mL NovoEight® (N8)[a] 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0	56 IU/mL N8-GP 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0	56 IU/mL ReFacto®[a] 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0
Method of administration	Intravenous	Intravenous	Intravenous
Dose (IU/kg)	280	280	280
Sample	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	N8 (NNC0155-0000-0004-10B)	N8-GP (NNC0129-0000-1003-10B)	ReFacto® (NNC0155-0000-0003-2A)
Assay	Chromogenic activity	ELISA	ELISA
PK parameters:			
C_{max} (IU/L)	2740	2563	2350
AUC (h*IU/L)	26000	18335	7743
$t_{1/2}$ (h)	7.8	6.8	2.5
Cl (mL/h/kg)	11	15	36
V_{ss} (mL/kg)	58	134	130

[a]NovoEight® and ReFacto® are commercial rFVIII products used for comparison purposes. [b]Composite profile, mean of male and female composed from mean value of plasma samples at each time points. Plasma was sampled in a sparse sample schedule with 3−4 samples per time point.

Pharmacokinetic (PK) parameters are calculated by non-compartmental analysis.

Study ID	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Location in CTD	4.2.2.2-4	4.2.2.2-4	4.2.2.2-5	4.2.2.2-5
Species	**Rat (Sprague Dawley)**	**Rat (Sprague Dawley)**	**Rabbit (New Zealand White)**	**Rabbit (New Zealand White)**
Gender (M/F) / Number of animals	12M 3 rats at each time point[a]	12M 3 rats at each time point[a]	8F	8F
Feeding condition	Fed	Fed	Fed	Fed
Vehicle/Formulation	N8-GP 100 IU/mL 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0	ReFacto® 100 IU/mL 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0	N8-GP 400 IU/mL 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0	ReFacto® 400 IU/mL 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose pH ~7.0
Method of administration	Intravenous	Intravenous	Intravenous	Intravenous
Dose (IU/kg)	200	200	200	200
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003-2A)	ReFacto® (NNC0155-0000-0003-2A)	N8-GP (NNC0129-0000-1003-2A)	ReFacto® (NNC0155-0000-0003-2A)
Assay	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
PK parameters:				
C_{max} (IU/L)	2857	3073	5164±492	5366±223
AUC (h*IU/L)	36599	21245	74332±13862	43475±10838
$t_{1/2}$ (h)	7.9	5.8	14±3	7.8±1.8
Cl (mL/h/kg)	5.4	9.4	2.8±0.5	4.8±1.2
V_{ss} (mL/kg)	61	69	56±6	48±6

[a]Composite profiles composed from mean value of plasma samples at each time points. Plasma was sampled in a sparse sample schedule with 3 samples per time point.
PK parameters are calculated by non-compartmental analysis. Mean ±SD

Study ID	[redacted]	[redacted]	[redacted][a]	[redacted][a]
Location in CTD	4.2.1.1-14	4.2.1.1-14	4.2.2.2-6	4.2.2.2-8
Species	**Haemophilia A dog**	**Haemophilia A dog**	**Wistar rat**	**Cynomolgus monkey**
Gender (M/F) / Number of animals	4M/3F	4M/3F	16M[d]	3M
Feeding condition	Non-Fed	-	fed	fed
Vehicle/Formulation	N8-GP 200 IU/mL 36 g/kg NaCl, 12 g/kg sucrose 6 g/kg histidine 1 g/kg $CaCl_2$ 0.4 g/kg Tween 80 L-methionine pH. 6.9	N8 200 IU/mL 1.5 mg/mL L-histidine 3 mg/mL sucrose 0.1 mg/mL polysorbate 80 18 mg/mL NaCl 0.055 mg/mL L-methionine 0.25 mg/mL $CaCl_2$, $2H_2O$ pH 6.9	N8-GP 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL L-histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose 0.055 mg/mL methionine pH ~6.9	N8-GP 0.25 mg/mL $CaCl_2$ 1.5 mg/mL L-histidine 18 mg/mL NaCl 0.1 mg/mL Tween 80 3 mg/mL saccharose 0.055 mg/mL methionine pH ~6.9
Method of administration	Intravenous	Intravenous	Intravenous	Intravenous
Dose (IU/kg)	125	125	250	250
Sample	Plasma	Plasma	Plasma	Plasma
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003-16A)	N8 (NNC0155-0000-0009-36A)	N8-GP	N8-GP
Assay	Clot and Chromogenic activity	Clot and Chromogenic activity.	ELISA and Chromogenic activity[b].	ELISA[c] and Chromogenic activity[c]
PK parameters:	(clot/chromogenic activity)	(clot/chromogenic activity)	(ELISA/chromogenic activity)	(ELISA/chromogenic activity)
C_{max} (IU/L)	2150±220/4160±430	2350±370/3080±40	2343/4551	8490±1353/8874±3518
AUC (h*IU/L)	33030±191/71670±4730	19970±3430/30430±4110	24694/54964	176214±30318/234080±80442
$t_{1/2}$ (h)	16±2/14±2	8.1±1.0/7.3±0.7	6.9/10	18±4.8/21±5.1
Cl (mL/h/kg)	3.8±0.2/3.1±0.2	6.4±1.1/4.2±0.6	10/4.6	1.5±0.3/1.2±0.5
V_{ss}	V_z:87±6/62±9	V_z:75±19/43±3	86/60	35±6.7/33±5.8

Mean ±SD

[a]This study is a multiple dose PK study. Due to the fact that the animals produced neutralising antibodies, the PK analysis was based on single-dose data only. [b]A mean endogeneous predose FVIII level was subtracted prior to PK parameter estimation. [c]Individual endogenous predose FVIII level were subtracted prior to PK parameter estimation.[d]Composite profiles composed from mean value of plasma samples at each time points. Plasma was sampled in a sparse sample schedule with 4-16 samples per time point.

PK parameters are calculated by non-compartmental analysis.

2.6.5.4 反復投与時の吸収

2.6.5.4.A トキシコキネティクスーWistar 系ラットにおける反復投与（試験番号 209355）

Date of first dose: 20 Oct 2009
Duration of dosing: 2 weeks/4 weeks

Report title: 14 day intravenous (infusion) administration toxicity study in the rat with a 4 week arm followed by a 3 week treatment-free period (GLP)

Study ID	**209355**							
Location in CTD	4.2.3.2-1							
Species	Wistar rat							
Gender (M/F) / Number of animals	15M and 18F per dose group							
Feeding condition	Fed							
Vehicle/Formulation	N8-GP, $CaCl_2$ $2H_2O$ (0.25 mg/mL), L-histidine (1.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.1 mg/mL), sucrose (3 mg/mL), sodium chloride (18 mg/mL) and L-methionine (0.055 mg/mL), pH ~6.9							
Method of administration	Intravenous							
Dose (U/kg)	100, 500, 2500 U/kg every other day							
Sample	Plasma							
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003)							
Assay	FVIII clot assay with normal human plasma standard as calibrator							
PK parameters:								
Dose (U/kg)/Group	**100/Low**		**500/Intermediate**		**2500/High I**		**2500/High II**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Day 1:								
C_{max} (IU/mL)	NC	NC	15.2	16.2	89.5	72.3	53.7	61.7
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	NC	NC	49.4	149	725	381	721	563
$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	NC	22.5	12.4	7.35	11.6	9.16
Day 13 or Day 27 (High II only):								
C_{max} (IU/mL)	NC	NC	7.91	NC	33.5	12.1	NC	13.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	NC	NC	NC	NC	98.6	NC	NC	4.87
$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

Additional information: Toxicokinetic (TK) parameters are calculated by non-compartmental analysis. NC = not calculable. Composite TK profiles: composed of 3 animals/time point/dose/group/sex. Samples were collected at the following nominal time points: pre-dose, 0.25, 1, 4, 12 and 24 hours after dosing. To monitor exposure, further samples were taken 4 hours after dosing from groups 2−4 (Low, Intermediate and High I) on days 3, 5, 7, 9 and 11, and from group 5 (High II) on days 7, 13, 19 and 25. Exposure could not be confirmed for

00434854 10

animals at the low dose level. C_{max} and AUC_{0-24h} (=AUC_{last}) increased with dose between 500 and 2500 U/kg on day 1. Following i.v. administration every other day for 13 days (500 U/kg Intermediate, or 2500 U/kg High I) or 27 days (2500 U/kg High II), exposure decreased greatly in both males and females. The $t_{½}$ was in the range 7.4 to 23 hours on day 1, but could not be determined on day 13 or day 27. Due to the lack of sufficient data, no conclusions could be drawn regarding sex differences or dose proportionality.

2.6.5.4.B 薬物動態ー Rowett ヌードラットにおける反復投与（試験番号 212142）

Date of first dose: 25 Jun 2012
Duration of dosing: 6 weeks

Report title: Pharmacokinetic and immunogenicity study in Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) rats following twice weekly intravenous administration for 6 weeks (non-GLP)

Study ID	**212142**			
Location in CTD	4.2.2.2-7			
Species	Rowett nude rat (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})			
Gender (M/F) / Number of animals	6M and 6F per dose group			
Feeding condition	Fed			
Vehicle/Formulation	N8-GP, $CaCl_2$ $2H_2O$ (0.25 mg/mL), L-histidine (1.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.1 mg/mL), sucrose (3 mg/mL), sodium chloride (18 mg/mL) and methionine (0.055 mg/mL), pH=6.9			
Method of administration	Intravenous			
Dose (IU/kg)	50 or 1500 IU/kg/twice weekly			
Sample	Plasma			
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003)			
Assay	FVIII clot assay with normal human plasma standard as calibrator			
PK parameters:				
Dose (IU/kg)/Group	**50/Low**		**1500/High**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**
Day 1:	**Day 1:**	**Day 1:**	**Day 1:**	**Day 1:**
C_{max} (IU/mL)	NC	NC	52.6	32.2
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	NC	NC	354	292
$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	NR	NR
Week 6:	**Week 6:**	**Week 6:**	**Week 6:**	**Week 6:**
C_{max} (IU/mL)	NC	NC	54.3	47.6
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	NC	NC	604	555
$t_{1/2}$ (h)	NC	NC	10.1	11.6

Additional information: TK parameters are calculated by non-compartmental analysis. NC = not calculable; NR = not reported. Composite TK profiles: composed of 3 animals/time point/dose/group/sex. Samples were collected at the following nominal time points: pre-dose, 0.25, 1, 4, 12 and 24 hours after dosing. AUC_{0-24h} = AUC_{last}. Due to the lack of sufficient data, no conclusions could be drawn regarding sex differences or dose proportionality.

2.6.5.4.C 26 週時におけるトキシコキネティクス－ Rowett ヌードラットにおける反復投与（試験番号 212512）

Date of first dose: 22 Apr 2013
Duration of dosing: 26 weeks

Report title: 26 weeks repeat dose toxicity study by intravenous administration to Rowett nude rats (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) every fourth day, followed by a 26 week treatment free period (GLP)

Study ID	**212512**			
Location in CTD	4.2.3.2-2			
Species	Rowett nude rat (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})			
Gender (M/F) / Number of animals	18M and 18F per dose group (plus 9M and 9F in recovery)			
Feeding condition	Fed			
Vehicle/Formulation	N8-GP, $CaCl_2$ $2H_2O$ (0.25 mg/mL), L-histidine (1.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.1 mg/mL), sucrose (3 mg/mL), sodium chloride (18 mg/mL) and methionine (0.055 mg/mL), pH ~6.9			
Method of administration	Intravenous			
Dose (U/kg)	50, 150, 500 and 1200 U/kg every 4th day			
Sample	Plasma			
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003)			
Assay	FVIII clot assay with normal human plasma standard as calibrator			
PK parameters:				
Dose (U/kg)/Group	**500 (Group 4)**		**1200 (Group 5)**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**
Week 1	**Week 1**	**Week 1**	**Week 1**	**Week 1**
C_{max} (IU/mL)	11.0	9.62	25.3	15.3
AUC_{last} (h*IU/mL)	80.0	9.09	371	46.6
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	NC	NC	371	81.4
t_{last} (h)	8.00	1.00	24.0	4.00
Week 26	**Week 26**	**Week 26**	**Week 26**	**Week 26**
C_{max} (IU/mL)	12.5	NC	23.2	14.3
AUC_{last} (h*IU/mL)	38.0	NC	356	130
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	111	NC	356	205
t_{last} (h)	4.00	NC	24.0	12.0
Rac_{obs}	NC	NC	1.09	3.39

Additional information: TK parameters are calculated by non-compartmental analysis. NC = not calculable. TK parameters could only be analysed for dose levels 500 and 1200 U/kg. For the lower dose groups, the plasma activity levels were around or below the LLOQ (6.51 IU/mL). The LLOQ was high due a combination of matrix effects and high endogenous FVIII activity.

Composite TK profiles: composed of 3 animals/time point/dose/group/sex. Samples were collected at the following nominal time points in week 1 and week 26: pre-dose, 0.25, 1, 4, 8, 12, 24, 48 and 96 hours after dose administration. Further monthly exposure samples were taken approximately 4 hours after dosing in weeks 4, 8,
12, 16, 20 and 24. Five animals developed anti-drug antibodies during the study. Data above include animals positive for anti-drug antibodies.

Conclusion: Exposure increased with dose from 500 to 1200 U/kg. Due to the limited amount of data, no formal conclusions could be drawn on sex differences regarding exposure, although there was an indication for higher exposure in males compared to females for AUC_{last} and $AUC_{0\text{-}24h}$. Due the low exposure above LLOQ and considerable variability in the plasma concentration data, no formal conclusions regarding sex differences, dose proportionality and time dependency could be made.

Details exposure: Systemic exposure to N8-GP above the LLOQ could be confirmed in week 1 for 10 out of 15 male animals and 5 out of 15 female animals at 500 U/kg. For 1200 U/kg, week 1, exposure was confirmed in 14 out of 15 male animals and in 8 out of 15 female animals. In week 26 for group 5 (1200 U/kg), exposure was confirmed in 13 out of 14 male animals and in 10 out of 15 female animals. For animals in group 4 (500 U/kg), exposure was confirmed in week 26 for 9 out of 15 male animals and for 4 out of 15 female animals. For the lower dose level of 150 U/kg, only an occasional sample was above the LLOQ while for 50 U/kg and the control group all samples were below the LLOQ.

2.6.5.4.D 52 週時におけるトキシコキネティクス－ Rowett ヌードラットにおける反復投与（試験番号 213109）

Date of first dose: 22 May 2013
Duration of dosing: 52 weeks

Report title: 52 weeks repeat dose toxicity study by intravenous administration to Rowett nude rats (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) every fourth day, followed by a 12 week treatment free period (GLP)

Study ID	**213109**			
Location in CTD	4.2.3.2-3			
Species	Rowett nude rat (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})			
Gender (M/F) / Number of animals	21M and 21F per dose group plus 12M and 12F in recovery			
Feeding condition	Fed			
Vehicle/Formulation	N8-GP, $CaCl_2$ $2H_2O$ (0.25 mg/mL), L-histidine (1.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.1 mg/mL), sucrose (3 mg/mL), sodium chloride (18 mg/mL) and methionine (0.055 mg/mL), pH 6.9			
Method of administration	Intravenous			
Dose (U/kg)	50, 150, 500 and 1200 U/kg every 4th day			
Sample	Plasma			
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003)			
Assay	FVIII clot assay with normal human plasma standard as calibrator			
PK parameters:				
Dose (U/kg)/Group	**500 (Group 4)**		**1200 (Group 5)**	
Gender	**M**	**F**	**M**	**F**
Week 1	**Week 1**	**Week 1**	**Week 1**	**Week 1**
C_{max} (IU/mL)	17.5	18.2	43.6	28.0
AUC_{last} (h*IU/mL)	105	41.8	252	223
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	152	77.7	453	292
t_{last} (h)	12.0	4.00	12.0	12.0
Week 26	**Week 26**	**Week 26**	**Week 26**	**Week 26**
C_{max} (IU/mL)	12.7	NC	31.6	14.1
AUC_{last} (h*IU/mL)	103	NC	400	153
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	169	NC	400	255
t_{last} (h)	12.0	NC	24.0	12.0

Week 52	Week 52	Week 52	Week 52	Week 52
C_{max} (IU/mL)	15.2	17.1	36.3	31.4
AUC_{last} (h*IU/mL)	112	58.0	438	193
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	188	321	438	250
t_{last} (h)	12.0	4.00	24.0	12.0
Rac_{obs}	1.24	4.13	0.968	0.857

Additional information: TK parameters are calculated by non-compartmental analysis. NC = not calculable. Animals were dosed every 4th day. TK parameters could only be analysed for dose levels 500 and 1200 U/kg. For the lower dose groups the plasma activity levels were around or below the LLOQ (6.17 IU/mL). LLOQ was high due a combination of matrix effects and high endogenous FVIII activity.

Composite TK profiles: composed of 3 animals/time point/dose/ group/sex. Samples were collected at the following nominal time points in week 1, week 26 and week 52: pre-dose, 0.25, 1, 4, 8, 12, 24, 48 and 96 hours after dose administration. Further monthly exposure samples were taken approximately 4 hours after dosing in weeks 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 and 48. Seven animals developed anti-drug antibodies during the study. Data above include animals positive for anti-drug antibodies.

Conclusion: Exposure increased with dose from 500 to 1200 U/kg. There was an indication for higher exposure in males compared to females for C_{max} and AUC_{0-24h} at 1200 U/kg, while this was not evident for 500 U/kg. Due the lack of an appropriate number of dose levels above LLOQ and the considerable variability in exposure, no formal conclusion could be made concerning dose proportionality and time dependency.

Details exposure: Systemic exposure to N8-GP above the LLOQ (FVIII activity) could be confirmed in week 52 for animals in group 4 (500 U/kg) in 13 out of 15 male animals, and in 10 out of 15 female animals. In group 5 (1200 U/kg), exposure was confirmed in 14 out of 15 male animals, and in 9 out of 15 female animals. For the lower dose level of 150 U/kg (group 3), only an occasional sample was above the LLOQ while for 50 U/kg (group 2) all samples were below the LLOQ. For the 4-hour post-dose exposure samples taken from week 1 to week 52, generally 0−2 out of 6 samples in group 3, 4−5 out of 6 samples in group 4, and 4−6 out of 6 samples in group 5 were above the LLOQ with few exceptions.

Plasma PEG concentrations measured by NMR were around or below the lower limit of quantification (LLOQ: 0.38 µg/mL) in the high dose group 1200 IU/kg every 4th day after 26 and 52 weeks of repeated dosing and after 2 weeks of recovery. In CSF samples taken at terminal kill after 52 weeks of dosing and after end of recovery, PEG was not measurable by NMR (Study 301333 [M 4.2.3.2]).

2.6.5.4.E トキシコキネティクス－カニクイザルにおける反復投与（試験番号 209350）

Date of first dose: 28 Oct 2009
Duration of dosing: 2 weeks

Report title: 14 day intravenous (infusion) administration toxicity study in the monkey followed by a 4 week treatment-free period (GLP)			
Study ID	**209350**		
Location in CTD	4.2.3.2-5		
Species	Cynomolgus monkey		
Gender (M/F) / Number of animals	8M per dose group		
Feeding condition	Fed		
Vehicle/Formulation	N8-GP, $CaCl_2$ $2H_2O$ (0.25 mg/mL), L-histidine (1.5 mg/mL), polysorbate 80 (0.1 mg/mL), sucrose (3 mg/mL), sodium chloride (18 mg/mL) and methionine (0.055 mg/mL)		
Method of administration	Intravenous		
Dose (mg/kg)	100, 500, 2500 U/kg every 3rd day		
Sample	Plasma		
Analyte	N8-GP (NNC0129-0000-1003)		
Assay	FVIII clot assay with normal human plasma standard as calibrator		
PK parameters:			
Dose (U/kg)	**100**	**500**	**2500**
Day 1:			
C_{max} (IU/mL)	NC	10.2 ± 1.74	36.8 ± 12.9
$AUC_{0\text{-}72h}$ (IU*h/mL)	NC	158 ± 48.2	904 ± 237
$t_{1/2}$ (h)	NC	39.8 ± 10.7	32.4 ± 7.23
Day 13:			
C_{max} (IU/mL)	NC	10.4 ± 0.651	15.7 ± NC
$AUC_{0\text{-}72h}$ (IU*h/mL)	NC	75.6 ± 51.0	25.0 ± NC
$t_{1/2}$ (h)	NC	24.9 ± 7.22	2.26 ± NC

Additional information: Mean±SD. TK parameters are calculated by non-compartmental analysis. NC = not calculable. Full plasma profiles were evaluated after the first dose on day 1 and after the last dose on day 13 obtained from the following samples: pre-dose, 0.25, 1, 2, 6, 12, 24, 48 and 72 hours after dosing. Exposure samples were taken 6 hours after dosing on day 4, day 7 and day 10. C_{max} and $AUC_{0\text{-}72h}$ increased with dose on day 1. The $t_{½}$ after a single dose was in the range 20 to 49 hours (dose levels 500 and 2500 U/kg). At day 1, the increase in exposure from 500 to 2500 U/kg was approximately proportional to dose for $AUC_{0\text{-}72h}$. Exposure could not be observed above LLOQ at dose level 100 U/kg. Exposure between day 1 and day 13 could generally be observed up to day 10 in all animals dosed with 500 and 2500 U/kg. After the last dose at day 13, exposure above LLOQ could only be shown for a few animals in dose group 500 and 2500 U/kg.

2.6.5.5 組織分布

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

2.6.5.5.A 定量的組織分布（QWBA）及びミクロオートラジオグラフィ（MARG）（試験番号 212398）

Location in CTD: 4.2.2.3-1

Study ID: 212398

Species	Han Wistar (HsdHan^{TM}:WIST)
Gender / Number of animals:	1 male per time point. 9M (QWBA), 3M (MARG)
Feeding condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	1.11 mg/mL [^{3}H]PEG-N8-GP (~0.89 mg/mL N8) in ReFacto® buffer containg: 1.5 mg/L histidine, 0.25 mg/mL $CaCl_2$, 0.1 mg/mL Tween 80, 18 mg/mL NaCl, 3 mg/mL sucrose in MilliQ water and adjusted to pH 7.0
Method of administration:	Intravenous
Dose (mg/kg):	4.1 mg/kg [^{3}H]N8-GP/day (35MBq/kg) ~the dose corresponds to 3.3 mg/kg N8 or 28000 IU/kg.
Radionuclide:	[^{3}H]N8-GP
Specific activity:	1.7 TBq/mmol (47 Ci/mmol)
Sampling time:	1, 12, 24, 96, 168, 336, 840, 1512 and 2016 hours (QWBA)

		pmol equivalents N8-GP/g of tissue								
	Animal number (males)	**101**	**102**	**103**	**104**	**105**	**106**	**107**	**108**	**109**
Tissue group	**Sampling time (hours)**	**1**	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Blood-vascular	Plasma (freeze dried)[a]	198	54.1	38.2	11.1	9.54	4.66	1.28	0.359	0.142
	Plasma[a]	203	58.1	39.3	12.2	10.4	4.64	1.51	0.381	0.140
	Aortic wall	5.49	7.81	10.0	8.36	1.72	3.72	BLQ	BLQ	BLQ
	Blood	138	58.1	47.9	8.09	2.73	3.99	0.893	BLQ	BLQ
Lymphatic	Bone marrow	33.4	17.7	103	72.6	33.2	22.1	4.22	1.36	0.550
	Lymph	4.87	257	200	159	248	364	128	49.4	55.1
	Mandibular lymph node	16.6	73.8	33.6	31.3	22.3	22.0	12.2	8.76	2.55
	Spleen	66.4	127	237	201	166	179	31.4	8.86	4.28
Excretory	Bile ducts	127	91.3	209	81.3	24.1	16.4	5.09	5.26	BLQ
	Kidney cortex	45.9	19.8	32.4	15.4	9.17	5.24	2.01	1.53	0.726
	Kidney medulla	57.8	22.0	35.7	13.0	7.72	2.89	4.64	1.85	1.19
	Liver	148	225	380	296	160	101	54.7	35.4	4.95
	Urinary bladder wall	2.54	22.2	16.4	11.7	4.53	10.4	0.848	0.862	1.39

		pmol equivalents N8-GP/g of tissue								
	Animal number (males)	**101**	**102**	**103**	**104**	**105**	**106**	**107**	**108**	**109**
Tissue group	**Sampling time (hours)**	**1**	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
	Urine	20.7	15.4	12.7	12.8	22.7	12.8	2.10	BLQ	0.778
Respiratory	Lung	76.8	42.1	26.8	11.7	4.64	3.55	1.15	BLQ	BLQ
	Nasal mucosa	16.3	11.9	7.72	15.8	5.64	4.68	2.49	1.40	0.721
	Trachea	5.13	9.68	12.5	5.40	7.35	NS	0.803	NS	BLQ
Reproductive	Bulbo-urethral gland	11.2	32.5	8.77	15.6	8.91	11.5	3.28	1.18	0.873
	Epididymis	6.08	9.58	3.50	2.95	2.07	0.910	1.36	0.676	BLQ
	Preputial gland	1.60	11.9	1.38	2.98	5.60	NS	BLQ	BLQ	BLQ
	Prostate	1.30	10.6	5.29	7.51	3.45	5.12	1.87	0.778	BLQ
	Seminal vesicles	0.629	1.36	1.05	1.44	0.944	BLQ	1.02	BLQ	BLQ
	Testis	3.84	5.69	5.86	5.38	2.17	3.74	2.13	0.800	0.619
Endocrinal	Adrenal cortex	23.0	41.7	20.6	21.1	21.0	6.61	4.59	8.06	BLQ
	Adrenal medulla	29.9	67.2	25.3	44.0	27.6	9.03	29.7	5.70	BLQ
	Pancreas	9.73	12.0	12.2	14.5	9.27	11.3	6.32	3.11	0.709
	Pineal body	8.76	13.7	9.96	9.51	0.556	21.7	11.4	8.27	7.60
	Pituitary	9.38	13.6	12.5	14.7	7.05	16.3	3.93	6.12	4.31
	Thymus	5.29	3.33	3.34	3.32	1.63	2.68	1.19	0888	0.839
	Thyroid	12.4	21.0	27.4	22.0	12.8	10.2	3.69	1.74	1.26
Ocular	Exorbital lachrymal gland	6.03	7.13	6.59	12.9	6.38	8.00	6.98	3.83	3.98
	Harderian gland	4.47	4.58	8.88	6.91	2.82	11.8	3.22	BLQ	0.829
	Intra-orbital lachrymal gland	5.09	8.47	6.22	12.8	3.79	4.55	1.22	BLQ	4.15
	Lens of the eye	BLQ	BLQ	1.16	0.699	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	Uveal tract/retina	3.88	7.08	15.5	9.32	2.59	3.02	1.17	0.855	0.651
Central nervous system	Brain	1.74	1.13	1.15	1.03	BLQ	BLQ	0.588	BLQ	BLQ
	Choroid plexus[b]	14.5	5.29	10.1	5.11	2.83	6.33	5.82	4.55	3.70
	Meninges	8.16	5.04	7.25	2.81	2.20	1.11	BLQ	BLQ	BLQ
	Spinal cord	2.06	0.914	1.21	1.18	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

		pmol equivalents N8-GP/g of tissue								
	Animal number (males)	**101**	**102**	**103**	**104**	**105**	**106**	**107**	**108**	**109**
Tissue group	**Sampling time (hours)**	**1**	**12**	**24**	**96**	**168**	**336**	**840**	**1512**	**2016**
Gastrointestinal	Caecum mucosa	8.82	8.69	22.7	16.4	16.2	18.5	4.93	3.88	1.02
	Large intestine mucosa	3.50	9.41	8.91	18.6	8.46	3.83	2.11	0.821	BLQ
	Oesophageal wall	4.20	6.70	6.92	4.94	3.58	4.78	0.990	BLQ	BLQ
	Rectum mucosa	1.65	11.4	9.76	11.0	6.63	10.1	2.03	0.696	BLQ
	Small intestine mucosa	5.61	38.7	17.3	25.5	20.7	11.8	3.26	2.03	BLQ
	Stomach mucosa (fundus)	7.20	9.95	11.5	7.13	5.39	4.72	2.42	BLQ	BLQ
	Stomach mucosa (non-fundic)	0.979	14.5	12.5	7.13	1.63	1.63	0.999	BLQ	BLQ
Adipose	Brown fat	10.9	4.92	1.65	1.92	2.09	3.30	BLQ	BLQ	BLQ
	White fat	0.585	BLQ	0.958	0.798	0.598	BLQ	0.610	BLQ	BLQ
Oral	Periodontal membrane	29.5	39.1	30.9	11.7	15.9	6.30	2.18	BLQ	BLQ
	Salivary glands	6.17	8.31	11.0	12.3	6.81	8.89	2.38	1.97	1.18
	Tongue	5.93	10.9	6.77	6.57	3.48	2.76	0.943	BLQ	BLQ
	Tooth pulp	19.6	11.5	29.0	24.9	7.49	13.0	0.905	1.38	BLQ
Unclassified	Bone surface	3.74	12.9	5.28	4.20	3.80	2.89	BLQ	BLQ	BLQ
	Epimysium	9.21	3.23	8.84	11.2	6.20	6.95	1.22	BLQ	BLQ
	Fur	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	2.43	5.60	2.97	0.830
	Muscle	1.32	2.15	1.25	1.67	1.32	0.721	0.640	BLQ	BLQ
	Myocardium	24.6	18.3	15.8	7.43	3.98	3.19	0.953	BLQ	BLQ
	Skin	5.15	4.79	6.22	6.03	5.36	5.70	1.51	1.45	BLQ
	Upper limit of quantification =	369	pmol eq/g for all measurements							
	Lower limit of quantification =	0.521	pmol eq/g for all measurements							

[a]Radioactivity determined by liquid scintillation counting (LOD plasma = 0.007 pmol eq/g). [b]The data from choroid plexus have been re-assessed and reported in a separate report. The stated values for choroid plexus are thus from this report (Study 216366 [M 4.2.2.3]). In this re-assessment study, the upper limit of quantification was: 515 pmol eq/g and the lower limit of quantification was: 0.281 pmol eq/g.

Abbreviations: BLQ = radioactivity concentration below lower limit of quantification; NS = not sectioned.

Additional information: A micro-autoradiography part was also included in the study in order to assess distribution into selected tissue (liver, kidney, spleen, brain, testis, heart, adrenals and bone marrow) at a microscopic level. Overall the micro-autoradiography work complemented the results obtained in the QWBA study detecting radioactivity in cells and connective tissue.

2.6.5.5.B Covance 社で実施された試験〔試験番号 826525（212398）〕から選択した組織を用いた免疫組織化学的検討（試験番号 213038）

Location in CTD: 4.2.2.3-2
Study ID: 213038

Species:	Han Wistar (HsdHan^{TM}:WIST)
Gender (M/F) / Number of animals:	1M per time point
Sampling time:	1, 24, 96 hours
Selected tissues:	Brain, liver, kidney, heart, adrenals, spleen and testis

Additional information: The selected tissues were processed to paraffin blocks. Tissue sections were immunohistochemical stained for detection of PEG and N8.
Results: PEG was at 1 hour post dosing detected in liver, kidney and in the blood in blood vessels in all tissues investigated. N8 was not detected in any of the tissues at any time points.

2.6.5.6 血漿中タンパク質結合

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

N8-GP is not expected to interact with plasma proteins (albumin & alfa 1-acid glyco protein), and therefore no investigations have been performed in relation to plasma protein binding.

2.6.5.7 妊娠中又は授乳期の動物での試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.7.

2.6.5.8 その他の分布試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

See Section 2.6.5.16.B.

2.6.5.9 *In vivo* 代謝

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.3.4.2.

2.6.5.10 *In vitro* 代謝

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.3.4.2.

2.6.5.11 推定代謝経路

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.3.4.2.

2.6.5.12 薬物代謝酵素の誘導及び阻害

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.3.5.

2.6.5.13 排泄

2.6.5.13.A [^{3}H]-N8-GP を単回静脈内投与時の雄性ラットにおける排泄（試験番号 212174）

Species:	Han Wistar rat (HsdHan^{TM}:WIST)			
Gender (M/F) / Number of animals:	3M			
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	0.176 mg/mL [^{3}H]N8-GP (~0.77 mg/mL N8) in ReFacto® buffer containg: 1.5 mg/L histidine, 0.25 mg/mL $CaCl_2$, 0.1 mg/mL Tween 80, 18 mg/mL NaCl, 3 mg/mL sucrose in MilliQ water and adjusted to pH 7.0			
Method of administration:	Intravenous			
Dose (mg/kg):	0.17 mg/kg [^{3}H]N8-GP/day (3.5MBq/kg) ~the dose corresponds to 1160 U/kg.			
Analyte:	[^{3}H]N8-GP			
Assay:	Liquid Scintillation Counting			
Excretion route (mean±SD, %)	**Urine**	**Faeces**	**Cage wash**	**Carcass**
Time				
0–24 h	10.8±0.8	1.05±0.17	-	-
0–168 h	23.5±1.6	10.6±0.6	-	-
0–85 days (12 weeks)	59.8±1.8	33.4±4.7	2.90±0.29	7.4±1.6
Study ID	**212174**			
Location in CTD	4.2.2.5-1			

Additional information: The total estimated excretion recovery over the 12 weeks period was 104% (final cage wash accounted for 2.89%) with 63% excreted renally (urine and cage wash) and 33% recovered in faeces. An excretion balance study has not been performed in humans; so no human data are available for comparison.

- = no data available.

2.6.5.13.B [^{3}H]-N8-GP を単回静脈内投与時の雄性ラットにおける排泄（試験番号 212399）

Species:	Han Wistar rat (HsdHan^{TM}:WIST)			
Gender (M/F) / Number of animals:	3M			
Feeding condition:	Fed			
Vehicle/Formulation:	1.11 mg/mL [^{3}H]N8-GP (~0.77 mg/mL N8) in ReFacto® buffer containg: 1.5 mg/L histidine, 0.25 mg/mL $CaCl_2$, 0.1 mg/mL Tween 80, 18 mg/mL NaCl, 3 mg/mL sucrose in MilliQ water and adjusted to pH 7.0			
Method of administration:	Intravenous			
Dose (mg/kg):	4.1 mg/kg [^{3}H]N8-GP/day (34 MBq/kg) ~the dose corresponds ~ 28000 U/kg.			
Analyte:	[^{3}H]N8-GP			
Assay:	Liquid Scintillation Counting			
Excretion route (mean±SD, %)	**Urine**	**Faeces**	**Cage wash**	**Carcass**
Time				
0–24 h	4.05±0.38	1.31±0.54	-	-
0–168 h	11.1±0.6	18.4±9.8	-	-
0–84 days (12 weeks)	31.5±1.3	37.5±9.8	2.67±0.43	5.9±3.0
Study ID	**212399**			
Location in CTD	4.2.2.5-2			

Additional information: The total estimated excretion recovery over the 12 weeks period was 78% (final cage wash accounted for 2.67%) with 34% excreted renally (urine and cage wash) and 38% recovered in faeces. An excretion balance study has not been performed in humans; so no human data are available for comparison.

- = no data available.

2.6.5.14 胆汁中排泄

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed as it was not found relevant for this compound

2.6.5.15 薬物相互作用

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.3.5.

2.6.5.16 その他の薬物動態試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

2.6.5.16.A *In vitro* 赤血球分配（試験番号 214153）

Location in CTD: 4.2.2.7-1

Study ID: 214153

Matrix:	Pool of fresh blood from at least three Han Wistar rats (HsdHan^{TM}:WIST)
Vehicle/Formulation:	1.11 mg/mL [^{3}H]-N8-GP (~0.89 mg/mL N8) in ReFacto$^{®}$ buffer containing: 1.5 mg/l histidine, 0.25 mg/mL $CaCl_2$, 0.1 mg/mL Tween 80, 18 mg/mL NaCl, 3 mg/mL sucrose in MilliQ water and adjusted to pH 7.0
Test concentration (µg/mL):	4 and 20 (0.036 and 0.178 MBq/mL)
Analyte:	[^{3}H]-N8-GP
Specific activity:	0.24 mCi/mg (corresponding to 8.9 MBq/mg)
Assay:	Liquid Scintillation Counting (LSC)
Method:	Separate blood samples were collected into tubes coated with K_2EDTA, 3.8% citrate or lithium heparin, and pooled by anticoagulant. Blood cell partitioning was determined following incubation of blood samples fortified with the test compound at nominal concentrations of 4 and 20 µg/mL. Duplicate rat blood samples fortified with the test compound were incubated at 37°C for 0, 15, 30, 60 and 120 minutes. Prior to incubations, an aliquot of each blood sample was analysed to calculate the haematocrit (packed cell volume). Duplicate blood samples were then fortified with [^{3}H]N8-GP at 2 concentrations (4 and 20 µg/mL) and incubated at approximately 37°C for 0, 30, 60 and 120 minutes on a rotary mixer. After incubation, an additional packed cell volume determination was made and aliquots of blood analysed for radioactivity following solubilisation and liquid scintillation counting. The remainder of each blood sample was centrifuged and aliquots of plasma analysed for radioactivity using liquid scintillation counting.
Results:	No notable uptake of [^{3}H]-N8-GP into red blood cells was observed over the concentration range 4 to 20 µg/mL and the anticoagulant used did not affect uptake at the test concentrations investigated.

Additional information: N/A

2.6.5.16.B Sprague Dawley 系ラットにおける *in vivo* 及び肝細胞での N8-GP の分布（試験番号 301241）

Location in CTD: 4.2.2.7-2

Study ID: 301241

Type of study:	Studies performed with Sprague Dawley rats: Pharmacokinetics analyses of exposure, anatomical distribution, liver perfusion and hepatocellular isolation. Studies performed with primary rat hepatocytes: *In vitro* binding and internalisation.
Method:	N8-GP was radiolabelled with ^{125}I in the protein part of N-glycans. The *in vivo* stability was confirmed in a pharmacokinetic experiment in Sprague Dawley rats dosed i.v. with 190 IU/kg ^{125}I-N8-GP. Temporal anatomical distribution of glycoiodinated N8-GP was measured in organs and tissues or Sprague Dawley rats 1, 8, 16 and 24 h post i.v. dosing of 220 IU/kg ^{125}I-N8-GP. N8 and N8-GP were compared in an *in situ* liver perfusion model in Sprague Dawley rats where 4 IU/mL were added to the perfusate and samples acquired up to 120 min post dosing and analyse FVIII activity in samples. Sprague Dawley rats were dosed i.v. with 220 IU/kg ^{125}I-N8-GP and after 16 h the rat livers were perfused with saline followed by collagenase. Liver cell fractions were then isolated and the radioactivity in each cell population determined. *In vitro* binding and internalisation studies were performed in primary rat hepatocytes with ^{125}I-N8-GP.
Tabulated results:	In the anatomical distribution studies, the majority of N8-GP was found in blood. The liver was observed as the major organ for N8-GP distribution; some radioactivity was detected in the intestines at time points > 1 h. Weak signals were detected in kidneys, spleen and lungs at early time points. When comparing clearance of N8 and N8-GP in an *in situ* liver perfusion model, N8 was found to be cleared approximately 2.5 times faster than N8-GP. N8-GP was found to mainly to distribute to hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and very little to Kupffer cells in the experiment where liver cell fractions were isolated. In primary hepatocytes *in vitro*, the specific binding and internalisation of N8-GP was found to be decreased approx. 40% compared to N8. In summary, the protein part of N8-GP is cleared via the liver, with hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells playing a key metabolic role. Liver metabolism of N8-GP was substantially delayed compared to N8 and proportional to the observed prolongation of N8-GP in circulation.

Additional information: N/A