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）

2.6.6 毒性試験の概要文

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 3
表目次 4
略語一覧 6
2.6.6.1 まとめ 10
2.6.6.2 非臨床安全性評価における動物種選択根拠 13
2.6.6.3 単回投与毒性試験 13
2.6.6.3.1 雄性 Wistar Hannover ラットにおける単回投与忍容性試験（Table 2.6.7.5、212344） 13
2.6.6.4 反復投与毒性試験 14
2.6.6.4.1 重要な毒性試験における投与期間の根拠 14
2.6.6.4.2 ラットにおける反復投与毒性試験 14
2.6.6.4.2.1 4 週間投与後 3 週間休薬群を含む、ラットにおける 2 週間静脈内投与（注入）毒性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.A、209355） 14
2.6.6.4.2.2 Rowett ヌードラットへの静脈内投与（4 日に 1 回投与）による 26 週間反復投与毒性試験及び 26 週間回復性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.B、212512） 17
2.6.6.4.2.3 Rowett ヌードラットにおける静脈内投与（4 日に 1 回投与）による 52 週間反復投与毒性試験及び 12 週間回復性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.C、213109） 21
2.6.6.4.3 カニクイザルにおける反復投与毒性試験 27
2.6.6.4.3.1 4 週間の休薬期間後のサルにおける 2 週間静脈内投与（注入）毒性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.D、209350） 27
2.6.6.5 遺伝毒性試験 30
2.6.6.6 がん原性試験 30
2.6.6.7 生殖発生毒性試験 30
2.6.6.7.1 幼若動物を用いた試験 30
2.6.6.8 局所刺激性試験 31
2.6.6.8.1 静脈周囲、静脈内及び動脈内投与 4 日後のウサギにおける局所刺激性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.16、211273） 31
2.6.6.8.2 Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、209355） 32
2.6.6.8.3 Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、212512） 32
2.6.6.8.4 Rowett ヌードラットにおける 52 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、213109)） 32
2.6.6.8.5 カニクイザルにおける 2 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、209350） 33
2.6.6.8.6 局所刺激性の結論 33

2.6.6.9　その他の毒性試験.....33
2.6.6.9.1　免疫原性.....33
2.6.6.9.1.1　雄性 Wistar 系ラットにおける N8-GP 静脈内反復投与後の PK 及び免疫原性（Table 2.6.7.17、[redacted]）.....33
2.6.6.9.2　雄性カニクイザルにおける N8-GP 静脈内反復投与後の PK 及び免疫原性（Table 2.6.7.17、[redacted]）.....34
2.6.6.9.2.1　Rowett ヌードラットにおける 6 週間静脈内投与（週に 2 回）後の PK 及び免疫原性試験（Table 2.6.7.17、212142）.....35
2.6.6.9.2.2　製造工程の最適化を支持する試験.....36
2.6.6.9.2.2.1　N8-GP 製造工程の最適化前後における薬力学的比較- F8-KO マウスにおける用量反応出血試験（Table 2.6.7.17、[redacted]）.....36
2.6.6.9.2.3　F8-KO マウスにおける N8-GP 製造工程最適化前後の PK 比較（Table 2.6.7.17、[redacted]）.....37
2.6.6.9.2.4　ウサギモデルを用いた製造工程最適化前後に製造された N8 中間体の免疫原性評価（Table 2.6.7.17、[redacted]）.....38
2.6.6.9.3　結論.....40
2.6.6.10　考察及び結論.....41
2.6.6.10.1　免疫原性.....41
2.6.6.10.2　Rowett ヌードラットにおける薬効の確認.....42
2.6.6.10.3　製造工程の最適化を支持する試験.....43
2.6.6.10.4　PEG 安全性.....43
2.6.6.10.5　結論.....44
参考文献.....45

図目次

ページ

図 2.6.6-1　曝露が確認されたラットの数－FVIII 抗原濃度の経時変化.....34
図 2.6.6-2　サル - 第 15 日からの曝露減少 - 投与後 6 時間の発色性合成基質法 FVIII 活性の経時変化.....35
図 2.6.6-3　F8-KO マウスの尾静脈切断出血モデルにおける N8-GP 製造工程の最適化前（N8-GP[redacted]実生産工程）及び最適化後（N8-GP[redacted]実生産工程）を比較した総出血時間及び総出血量の用量反応関係.....37

図 2.6.6-4　製造工程の最適化前（■実生産工程）又は最適化後（■実生産工程）の N8-GP 原薬の F8- KO マウスへの静脈内投与後における FVIII 活性測定値の経時変化.....38
図 2.6.6-5　N8 中間体投与（週 2 回投与）を行ったウサギにおける抗 N8 抗体の経時的形成の概要 40

表目次

ページ

表 2.6.6-1　毒性試験の概要 11
表 2.6.6-2　試験デザイン - Wistar Hannover ラットを用いた単回投与毒性試験（212344） 13
表 2.6.6-3　試験デザイン - Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験（209355） 15
表 2.6.6-4　トキシコキネティクスパラメータ - Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験 (209355) 16
表 2.6.6-5　抗薬物抗体形成の概要 - Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験 (209355) ...16
表 2.6.6-6　試験デザイン - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512） 17
表 2.6.6-7　死亡及び死因の一覧 - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512） 18
表 2.6.6-8　偶発的な腫瘍 - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512） 19
表 2.6.6-9　平均 APTT（秒）－対照群（～16 秒）の偏差割合（抗体陽性動物を除く）（212512） 19
表 2.6.6-10　26 週間投与試験中に検出された抗薬物抗体（212512） 20
表 2.6.6-11　トキシコキネティクスパラメータ - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512） 20
表 2.6.6-12　試験デザイン - Rowett ヌードラットにおける 52 週間反復投与毒性試験（213109） 21
表 2.6.6-13　死亡及び死因の一覧（213109） 22
表 2.6.6-14　腫瘍（213109） 24
表 2.6.6-15　第 13、30、48 週後における対照群との平均 APTT の%差異（抗体陽性動物を除く）（213109） 25
表 2.6.6-16　26 及び 52 週間投与後に抗薬物抗体が検出された、抗体陽性動物数（213109） 26
表 2.6.6-17　トキシコキネティクスパラメータ - Rowett ヌードラットにおける 52 週間反復投与毒性試験（213109） 26
表 2.6.6-18　試験デザイン - カニクイザルにおける 2 週間反復投与毒性試験（209350） 27
表 2.6.6-19　投与後 APTT（秒）－投与 6 時間後に試料採取 - 各投与群における投与前値との差（%）（209350） 29
表 2.6.6-20　試験デザイン - ウサギにおける局所刺激性（211273） 31

表 2.6.6-21　試験デザイン - ウサギにおける免疫原性評価（[redacted]）.....39
表 2.6.6-22　ウサギにおける N8 中間体を反復投与後の抗 CHO 宿主細胞タンパク質抗体形成の概要 39
表 2.6.6-23　非臨床投与量と小児及び成人への臨床投与量の比較 41
表 2.6.6-24　APTT（秒） - Rowett ヌードラットを用いた 26 及び 52 週間試験における対照群からの変化.....43

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）

2.6.6.1 まとめ

ツロクトコグ アルファ ペゴル（以下、N8-GP）の非臨床安全性評価プログラムは、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）のバイオテクノロジー応用医薬品に関する ICH S6（R1）ガイドライン[1]、ICH M3（R2）ガイドライン[2]及び欧州医薬品庁（EMA）のヒト用医薬品委員会（CHMP）- Safety Working Party（SWP）の”recommendation to the Paediatric Committee (PDCO) for use of PEGylated drugs in children”[3]に従って策定した。重要な *in vivo* 安全性試験は、ラットにおいて 52 週間まで、カニクイザルにおいて 2 週間まで実施した。N8-GP のトロンビン産生試験の結果に基づき、正常な凝固能を有するラット及びカニクイザルを毒性試験に使用した。さらに、N8-GP の長期毒性試験を評価するため、Rowett ヌードラットを導入して免疫系を回避した。遺伝毒性及びがん原性試験は、N8-GP 分子の特質を考慮すると意味のあるものとは考えられなかったため、実施しなかった。血栓形成は過剰な薬理作用、すなわち、凝固カスケードの活性化と一致する。複数の文献から、血栓形成は、胎児の流産等のリスク要因の一つとなることが知られている。非常に高用量の N8-GP を正常動物に投与する生殖発生毒性試験を実施した場合には、上記の有害影響が想定されると考えられることから、生殖発生毒性試験は実施しなかった。局所刺激性試験は、サル及びラットにおける反復投与毒性試験の一部ならびにウサギにおける局所刺激性試験において評価された。臨床適用経路が静脈内であることから、非臨床試験の投与経路を静脈内とした。重要な安全性試験はすべて「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）に従って、OECD の指針を順守する国において実施した。非臨床試験（GLP 適用）においては、臨床用製剤である 50～2000 IU/mL を使用した。

表 2.6.6-1　毒性試験の概要

Discipline	Species	Doses tested (IU/kg)
Single-dose toxicity[a] (non-GLP)	Wistar rat	0, 20000, 25000
Pivotal repeat-dose toxicity[a] (GLP), NOAEL in bold		
2 weeks	Wistar rat	0, 100, 500, **2500** (every 2nd day)
26 weeks[b]	Rowett nude rat	0, 50, 150, 500, **1200** (every 4th day)
52 weeks[b]	Rowett nude rat	0, 50, 150, 500, **1200** (every 4th day)
2 weeks	Cynomolgus monkey	0, 100, 500, **2500** (every 3rd day)
Genotoxicity	Not performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.5.	
Carcinogenicity	Not performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.6.	
Reproductive and developmental toxicity	Not performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.7.	
Local tolerance (GLP)	Rabbit	20 (i.a., i.v., perivenous)
Other toxicity		
Immunogenicity (non-GLP)		
4-week PK and immunogenicity	Wistar rat	250 (twice weekly)
4-week PK and immunogenicity	Cynomolgus monkey	250 (twice weekly)
6-week PK and immunogenicity	Rowett nude rat	0, 50, 1500 (twice weekly)
Studies supporting an optimised manufacturing process (non-GLP)		
PD	F8-KO	0.25−4
PK	F8-KO	140
Immunogenicity	Rabbit	50 (twice weekly)

[a]Route of administration was i.v. [b]Data published in [4].
Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; i.a. = intra-arterial(-ly); i.v. = intravenous(-ly); N/A = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s).

概して、N8-GP は Wistar 系ラットにおける 25000 IU/kg までの単回投与後及び 2500 IU/kg（2 日に 1 回投与）までの 2 週間反復投与後、ならびに Rowett ヌードラットにおける 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）までの 26 及び 52 週間反復投与において、良好な忍容性を示した。カニクイザルにおいては、N8-GP を 2500 IU/kg（3 日に 1 回投与）まで 2 週間投与した。反復投与毒性試験において、免疫原性に対する影響が認められなかったことに基づき、各試験の最高用量が無毒性量（NOAEL）であった。

N8-GP 20000 IU/kg を単回投与したラット 1 例に肺の大血栓形成がみられた。この所見は、N8-GP の実験操作（尾静脈注射）又は過剰な薬理作用のいずれかに起因すると考えられた。

ヒト FVIII タンパク質がラット及びサルにおいて外来異種であることに一致して、曝露に影響を及ぼす抗薬物抗体が Wistar 系ラット及びカニクイザルで 25 及び 11～15 日後にそれぞれ認められた。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、後天性血友病様変化が生じた。そのため Wistar 系ラット及びカニクイザルにおける長期毒性試験の実施意義はないものと考えられた。そこで、N8-GP の長期毒性を評価するため、Rowett ヌードラットを導入して免疫系を回避した。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており T 細胞依存性の抗薬物抗体を形成しない。26～52 週間の曝露後に抗薬物抗体を形成するラットが 4%以下とわずかであることから、Rowett ヌードラットが長期毒性試験に使用可能であることが確認された。

ポリエチレングリコール（PEG）が脳に存在するか確認するため、Rowett ヌードラットを用いた N8-GP の反復投与毒性試験に脳組織の免疫組織化学染色を組み込んだ。脳組織（脈絡叢を含む）に PEG は検出されなかった。1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）を 26 週間及び 52 週間反復投与後、2 週間の回復性を評価した 52 週間長期毒性試験において、核磁気共鳴法（NMR）を用いて血漿 PEG 濃度を測定した。PEG 濃度の測定値は定量下限値（LLOQ）（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。投与 52 週間後及び回復期間終了後の最終堵殺時に採取した CSF 試料を NMR で測定したが、PEG は検出されなかった。

長期曝露後の雌雄ラットにおける生殖器官の病理組織学的検査により授受胎能を評価した。N8-GP 投与の結果、生殖器官の病理組織学的反応はみられなかった。

局所刺激性は、反復投与毒性試験の一部及びウサギにおける局所刺激性試験において評価された。N8-GP 投与の結果、局所反応は軽度であるか又は認められなかった。

新製造施設における原薬の最適化製造工程を支持するため、3 種類の非臨床試験を実施し、変更前後の薬効、薬物動態（PK）及び免疫原性を比較した。変更前後における薬効、PK 及び免疫原性に関して、統計学的に有意な差異は認められなかった。

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

2.6.6.2 非臨床安全性評価における動物種選択根拠

N8-GP のトロンビン産生試験の結果に基づき、正常な凝固能を有するラット及びカニクイザルを毒性試験に使用した（詳細は Module 2.6.2.3.1 を参照）。

2.6.6.3 単回投与毒性試験

2.6.6.3.1 雄性 Wistar Hannover ラットにおける単回投与忍容性試験（Table 2.6.7.5、212344）

本試験の目的は、雄性 Wistar Hannover GALAS ラットに対する高用量（20000 及び 25000 IU/kg）単回静脈内投与時における N8-GP の忍容性を評価することである。本試験は、定量的全身オートラジオグラフィ試験で用いられる用量を裏付けるために実施した。試験デザインを表 2.6.6-2 に示す。

表 2.6.6-2 試験デザイン - Wistar Hannover ラットを用いた単回投与毒性試験（212344）

Group	Group description	Dose level (IU/kg)	Number of animals
1	Control	0	3
2	High	20000	3
3	Control	0	3
4	High	25000	3

動物は投与後 3 日間観察した後、安楽死処置し剖検を行った。毒性評価は、死亡数、一般状態の観察、体重、器官重量、剖検及び顕微鏡学的評価に基づいて行った。

死亡はみられず、また、一般状態の観察、器官重量又は剖検検査において投与に関連する変化は認められなかった。第 4 群（25000 IU/kg）で著しい体重増加がみられたが、毒性学的意義はないと考えられた。N8-GP 20000 IU/kg 投与群の 1 例に肺の大血栓形成がみられた。本所見は、N8-GP の実験操作（尾静脈内注射）又は過剰な薬理作用に起因すると考えられ、引き続き実施したラット及びサルにおける毒性試験では認められなかった。

結論として、ラットにおける高用量（20000 及び 25000 IU/kg/dose）の N8-GP の単回静脈内投与における忍容性は概ね良好であった。

2.6.6.4 反復投与毒性試験

2.6.6.4.1 重要な毒性試験における投与期間の根拠

N8-GP は分子サイズが大きく、ヒト凝固因子の投与を受けた動物種における中和抗体形成が予見されたことから、3 種類の重要でない反復投与 PK／免疫原性試験を実施し、中和抗体形成における時期及び用量依存性を評価した（概要は2.6.6.9.1 を参照のこと）。

Wistar 系ラットにおいて、反復投与 PK 及び免疫原性試験での投与（250 IU/kg 週に 2 回）25 日後に中和抗体形成及び相関する薬物曝露の減少が確認された。したがって、2 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）は、投与期間の大部分における曝露を確認するのに適切と考えられた。

サルにおける反復投与 PK 及び免疫原性試験から、投与（250 IU/kg、週に 2 回）11～15 日後に抗体形成が示唆された。したがって、長期投与は適切な曝露結果をもたらさないと予期され、動物において FVIII の交叉反応性中和抗体形成に関連した後天性血友病様の臨床症状を引き起こし、その結果、出血傾向が生じるリスクが高い。反復投与 PK 試験のデータに基づき、サルについては 2 週間反復投与毒性試験（GLP 適用）が適切であると考えた。

ラットモデルにおける N8-GP（PEG を含む）の長期毒性を評価するため、免疫不全ラットモデル（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 細胞依存性の抗体反応が生じないため、抗薬物抗体の阻害を最小限に抑えて N8-GP の長期投与が可能と考えられる。Rowett ヌードラットの使用可否を評価するため、6 週間反復投与（50 及び 1500 IU/kg、週に 2 回投与）PK 免疫原性試験を行った結果、抗薬物抗体による阻害は認められなかった。したがって、本モデルを用いて 26 及び 52 週間反復投与毒性試験を実施し、N8-GP の長期毒性を評価した。

2.6.6.4.2 ラットにおける反復投与毒性試験

2.6.6.4.2.1 4 週間投与後 3 週間休薬群を含む、ラットにおける 2 週間静脈内投与（注入）毒性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.A、209355）

本試験の目的は、Wistar 系（HsdHan™）ラットに 2 日に 1 回、合計 7 回（14 日間）静脈内投与（注入）後における N8-GP の毒性及びトキシコキネティクスを評価することであった。高用量群を試験デザインに追加し、2 日に 1 回、合計 14 回（28 日間）投与した。28 日間投与群の主目的は、N8-GP の免疫原性及び高用量を用いたラットにおける長期試験の実施可能性の評価であった。3 週間の休薬期間群（回復群）について、遅発性の毒性発現又は毒性の可逆性、さらに免疫原性に関する評価を行った。

表 2.6.6-3　試験デザイン - Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験（209355）

Group number	Group description	Dose level (IU/kg/2 days)	Number of animals in group					
			Main study		Treatment-free (recovery/immunogenicity)		Toxicokinetics	
			Males	Females	Males	Females	Males	Females
1	Control	0	10[a]	10[a]	5	5	12	15
2	Low	100	10[a]	10[a]	5	5	15	18
3	Intermediate	500	10[a]	10[a]	5	5	15	18
4	High I	2500	10[a]	10[a]	5	5	15	18
5	High II[b]	2500	5	5	5	5	15	18

[a]Five animals made up the original study design with a further five animals (additional toxicity cohorts) included later. The purpose was to enable collection and evaluation of clinical chemistry parameters that were erroneously left out in the original study plan. These animals were treated exactly as the main toxicity animals but were only used for evaluating clinical chemistry. [b]This cohort was treated for four weeks to assess immunogenicity after long-term treatment.

毒性評価は、死亡数、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に基づいて行われた。トキシコキネティクス評価及び抗体分析に用いる血液試料についても採取した。

本試験の追加毒性コホート（血液生化学）において、第 11 日に 1 例の死亡（動物番号 292）がみられた。この動物の死亡原因は判断できなかったが、死亡前に有害な一般状態変化は観察されず、剖検及び顕微鏡的観察で所見が認められなかったことから、投与に関連するものではないと考えられた。

血液凝固評価項目（プロトロンビン時間（PT）及び活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT））及び血液学的評価項目（赤血球量パラメータ及び網赤血球の絶対数）に軽微な変動がみられたが、いずれも変動の程度は小さく、有害ではないと考えられた。その他の生存に関する評価項目、器官重量、剖検及び顕微鏡的観察について、N8-GP に関連した影響はみられなかった。

トキシコキネティクスは、バリデートされた凝固一段法（内因性 FVIII 活性の測定にも使用）に基づいて分析した。そのため、本分析法における N8-GP の LLOQ は相対的に高い（Module 2.6.4.2.2）。したがって、低用量（100 IU/kg）を投与した動物では、試料中の活性が LLOQ を下回ることから曝露は確認できなかった。しかしながら、N8-GP を曝露された動物に合致することとして、本用量群及び他の用量群においても著しい抗体形成が認められた。

500 又は 2500 IU/kg 投与群の大部分において、第 1 日に被験物質の全身曝露が確認された。第 13 日には数例の動物でのみ曝露が確認され、第 27 日では 2 例のみであった。大多数の動物において、曝露の減少は中和抗体の形成と相関していた（表 2.6.6-4 及び表 2.6.6-5）。消失半減期（$t_{½}$）は、第 1 日では 7.4～22.5 時間であったが、第 13 日又は第 27 日では測定できなかった。500 及び 2500 IU/kg 投与群

の雌雄において、第 1 日に、最高血中濃度（C_{max}）及び投与後 0～24 時間の曲線下面積（AUC_{0-24h}）が用量に伴って増加した。得られたデータからは、性差に関する結論は出せなかった。

表 2.6.6-4　トキシコキネティクスパラメータ - Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験（209355）

Study	Dose interval	Dose (IU/kg/2 days)	Exposure day	C_{max} (IU/mL)		AUC_{0-24h} (h*IU/mL)		$t_{½}$ (h)	
				Males	Females	Males	Females	Males	Females
2-week rat	2 days	500	Day 1	15.2	16.2	49.4	149	NC	22.5
		500	Day 13	7.91	NC	NC	NC	NC	NC
		2500	Day 1	89.5	72.3	725	381	12.4	7.35
		2500	Day 13	33.5	12.1	98.6	NC	NC	NC
		2500	Day 27	NC	13.0	NC	4.87	NC	NC

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

Abbreviations: AUC_{0-24} = area under the curve from time zero to 24 h; $AUC_{0-72\ h}$ = area under the curve from time zero to 72 h; C_{max} = maximum concentration; NC = not calculable; $t_{½}$ = terminal half-life.

表 2.6.6-5　抗薬物抗体形成の概要 - Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与毒性試験（209355）

Group	Dose (IU/kg/2 days)	Antibody positive/total examined	Neutralising positive/total antibody positive
1 (control)	0	0/20	N/A
2 (low)	100	16/20	14/16
3 (intermediate)	500	18/20	18/18
4 (high I)	2500	20/20	18/20
5 (high II)	2500	20/20	19/20

Abbreviations: N/A = not applicable.

結論として、ラットに N8-GP を静脈内投与した結果、局所又は全身毒性の兆候はみられず、良好な忍容性が認められた。投与後、全用量群の動物の大多数に中和抗体の形成が認められた。中和抗体の形成及び曝露の減少から、14 日より長期の試験からは意義のある結果は得られないと判断した。

有害影響が認められなかったことに基づき、NOAEL は試験した最高用量である 2500 IU/kg（2 日に 1 回投与）と考えられた。

2.6.6.4.2.2　Rowett ヌードラットへの静脈内投与（4 日に 1 回投与）による 26 週間反復投与毒性試験及び 26 週間回復性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.B、212512）

本試験の目的は、Rowett ヌードラット（Crl:NIH-*Foxn*^{rnu}）に対する 26 週間静脈内投与（注入）（4 日に 1 回投与）後における N8-GP（PEG を含む）の毒性及びトキシコキネティクスを評価することである。高用量群における 26 週間の休薬期間（回復期）に、遅発毒性の発現又は毒性の可逆性、さらに免疫原性に関する評価を行った。試験デザインを表 2.6.6-6 に示す。本剤は臨床で使用する製剤に対応する。本試験のデータは公表されている [4]。

表 2.6.6-6　試験デザイン - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512）

Group number	Group description	Dose level (IU/kg/4 days)	Number of animals in group			
			Main study		Treatment-free (recovery phase)	
			Males	Females	Males	Females
1	Control	0	18	18	9	9
2	Low	50	18	18	0	0
3	Intermediate	150	18	18	0	0
4	High I	500	18	18	0	0
5	High II	1200	18	18	9	9

毒性評価は、死亡数、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に基づいて行われた。トキシコキネティクス評価及び抗体分析に用いる血液試料についても採取した。さらに、脳組織内の PEG を検出するため、免疫組織化学的検査（IHC）染色が行われた。

本試験では、投与に対する毒性反応の兆候はみられず、一般状態、死亡数、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に関して、投与に関連した影響も認められなかった。IHC 染色の結果、脳組織（脈絡叢を含む）及び脳血管の血中に PEG は検出されなかった。

試験中に確認された投与部位反応は、尾部の着色（赤色又は橙色）、腫脹、痂皮、紅斑、挫傷、剥離、びらん又は潰瘍、隆起、尾部損傷部位の乾燥又は湿潤であった。これらの反応は、対照群を含むすべての投与群で認められた。顕微鏡学的評価で、尾部の投与部位反応は対照群及び N8-GP 投与群双方において低頻度で発現したが、概ね極微～軽微と判断された。これらの反応は静脈内投与操作に関連するものであり、N8-GP の投与に関連するものではないと考えられた。

試験期間中、11 例の死亡がみられた（対照群：3/54 例、150 IU/kg：4/36 例、500 IU/kg：1/36 例、1200 IU/kg：3/54 例、表 2.6.6-7）。これらの死亡の大多数（瀕死期の変化を除く）は、非特異的な炎症プロセス又は腫瘍に関連するとみられ、免疫不全動物で予測された所見と一致する[5]。死亡は対照群及び投与群で同様であることから、偶発的であり投与には関連しないものと考えられる。

表 2.6.6-7　死亡及び死因の一覧 - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512）

Sex	Time of death (week)	Found dead	Euthanasia for welfare reasons	Major factors contributing to death
0 IU/kg (control)				
Female	13		x	Combination of findings contributed to the overall poor clinical condition
Female	R7		x	Urogenital lesion
Female	R22		x	M-lymphoma
150 IU/kg				
Female	10		x	Alimentary tract lesions
Female	11		x	Combination of findings contributed to overall poor clinical condition
Male	26	x		Myocarditis and epicarditis
Male	26	x		No factors to death identified
500 IU/kg				
Female	25		x	Combination of findings contributed to overall poor clinical condition
1200 IU/kg				
Male	13		x	Urogenital lesions
Male	21		x	Combination of findings contributed to overall poor clinical condition
Male	R22		x	Septicemia (sequela of skin ulceration)

Abbreviations: M = malignant tumour; R = recovery animal.

免疫不全ラットで予期されたように[5,6,7]、偶発的な腫瘍の発現頻度は、対照群及び投与群の全用量群で同程度認められた（表 2.6.6-8）。Rowett ヌードラットの腫瘍所見の背景データがないことから、他のラット系統の背景所見を参考として用いた。本試験でみられた腫瘍タイプはいずれも他のラット系統で通常認められる背景データと同様であった。

表 2.6.6-8　偶発的な腫瘍 - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512）

Tumour type	Control	50 IU/kg/4 days	150 IU/kg/4 days	500 IU/kg/4 days	1200 IU/kg/4 days	Literature reference of background finding in different rat strains
Total no. of animals	54	36	36	36	54	N/A
Total no. of animals with tumours	3	1	1	0	1	N/A
Brain, M-astrocytoma	-	1	-	-	-	[8,9,10]
Brain, B-haemangioma	1	-	-	-	-	[11]
Adrenal, B-cortical adenoma	1					[11]
Mammary gland, M-adenocarcinoma	-	-	-	-	1	[9,10,11,12]
Ovary, B-luteoma	-	-	1	-	-	[13,14]
Hemopoietic system, M-lymphoma[a]	1	-	-	-	-	[9,10,11]

[a]Contributed to premature death.
Abbreviations: B = benign tumour; M = malignant tumour; N/A = not applicable.

雄の全投与群及び雌の 150 及び 500 IU/kg 投与群における APTT の短縮は、N8-GP の薬理作用に起因すると予測され、有害ではないと考えられた（表 2.6.6-9）。第 26 週後の雌において用量反応がみられなかったことは、他のすべての試料採取時点が投与後 12 時間であったことに対し、投与後 2〜4 日の時点で試料採取を行ったことに起因する可能性が高い。

表 2.6.6-9　平均 APTT（秒）ー対照群（〜16 秒）の偏差割合（抗体陽性動物を除く）（212512）

Group	Dose (IU/kg/4 days)	Week 13		Week 26	
		Males	Females	Males	Females[a]
2	50	-13**	1	-3	-6
3	150	-17**	-2	-13**	-14**
4	500	-19**	-6	-22**	-16**
5	1200	-30**	-13*	-30**	-2

[a]Blood samples taken 2−4 days after last dose and not 12 h post-dose as planned. *p<0.05. **p<0.01.

本試験では、5/175 例（3.2%）しか抗薬物抗体陽性動物が認められず、本ラット系統が N8-GP の毒性評価に適していることが示された（表 2.6.6-10）。T 細胞欠損ヌードラットの一部では、加齢及び機能

の増強に伴い”T 様”細胞を形成する場合があること[5]から、本ラット系統の一部で低頻度ながら免疫反応が認められたことは予測どおりであった。

表 2.6.6-10　26 週間投与試験中に検出された抗薬物抗体（212512）

Group	Dose (IU/kg/4 days)	Anti-drug antibodies (no. positive of total no. examined)
2	50	2 of 36
3	150	1 of 34
4	500	2 of 35
5	1200	0 of 34

トキシコキネティクスの検討から、1200 IU/kg 投与群の大多数及び 500 IU/kg 投与群の約半数において、N8-GP の全身性曝露が確認された（表 2.6.6-11）。より低用量群では、150 IU/kg 投与群では 1 又は 2 例のみ被験物質が定量可能でありが、50 IU/kg 投与群では定量できなかった。低用量群において被験物質が検出できなかったことは、FVIII 活性測定法の LLOQ と一致するものであった（Module 2.6.4.2.2）。

表 2.6.6-11　トキシコキネティクスパラメータ - Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与毒性試験（212512）

Dose (IU/kg/4 days)	Dose interval	Exposure week	C_{max} (IU/mL)		AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	
			Males	Females	Males	Females
500	4 days	Week 1	11.0	9.62	NC	NC
500		Week 26	12.5	NC	111	NC
1200		Week 1	25.3	15.3	371	81.4
1200		Week 26	23.2	14.3	356	205

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

結論として、N8-GP は Rowett ヌードラットへの 26 週間静脈内投与（4 日に 1 回投与）において良好な忍容性を示し、有害所見も認められなかった。したがって、N8-GP の NOAEL は 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）であると考えられる。

2.6.6.4.2.3　Rowett ヌードラットにおける静脈内投与（4 日に 1 回投与）による 52 週間反復投与毒性試験及び 12 週間回復性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.C、213109）

本試験の目的は、Rowett ヌードラット（Crl:NIH-*Foxn*^{rnu}）への 52 週間静脈内投与（注入）（4 日に 1 回投与）後における N8-GP（PEG を含む）の毒性及びトキシコキネティクスを評価することであった。高用量群における 12 週間の休薬期間中に、遅発性の毒性発現又は毒性の可逆性、及び免疫原性に関する評価を行った。試験デザインを表 2.6.6-12 に示す。データは公表されている [4]。

表 2.6.6-12　試験デザイン - Rowett ヌードラットにおける 52 週間反復投与毒性試験（213109）

Group number	Group description	Dose level (IU/kg/4 days)	Number of animals in group			
			Main study		Treatment-free (recovery phase)	
			Males	Females	Males	Females
1	Control	0	21	21	12	12
2	Low	50	21	21	0	0
3	Intermediate	150	21	21	0	0
4	High I	500	21	21	0	0
5	High II	1200	21	21	12	12

毒性評価は、死亡数、一般状態の観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に基づいて行われた。トキシコキネティクス評価、抗体分析及び脳組織（脈絡叢を含む）内の PEG を検出するための IHC 染色に用いる血液試料も採取した。

本試験では、投与に対する毒性反応の兆候はみられなかった。試験から、一般状態、死亡数、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に対する影響は示されなかった。IHC 染色の結果、脳組織（脈絡叢を含む）及び脳血管の血中に PEG は検出されなかった。

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、2 週間の回復性評価時に NMR を用いて血漿中 PEG 濃度を測定した。PEG 濃度の測定値は LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。投与 52 週間後及び回復期間終了後の最終堵殺時に採取した CSF 試料を NMR で測定したが、PEG は検出できなかった。

試験中に確認された投与部位反応は、尾部の発赤、尾部の暗色化、腫脹、肥厚、痂皮、紅斑、挫傷、剥離／皮膚脱落、隆起、尾部損傷部位の乾燥又は湿潤であった。これらの反応は、対照群を含む

すべての投与群で認められたため、静脈内反復投与操作又は溶媒に関連するものであり、N8-GP に関連するものではないと考えられた。顕微鏡学的評価で、尾部の投与部位反応は対照群及び N8-GP 投与群双方において低頻度で発現したが、概ね極微～軽度と判断された。これらの反応は静脈内投与操作に関連するものであり、N8-GP の投与に関連するものではないと考えられた。

試験期間中、多数の死亡（44/258 例）がみられた（表 2.6.6-13）。群間の分布（対照群：13/66 例、50 IU/kg：6/42 例、150 IU/kg：7/42 例、500 IU/kg：8/42 例、1200 IU/kg：10/66 例）から、死亡の大多数は非特異的な炎症プロセス及び腫瘍発現に関連すると考えられ、免疫不全動物で予測された所見と一致することから、投与に関連する影響ではないものと考えられた。結論として、すべての死亡は偶発的であり、投与に関連しないと考えられた。

表 2.6.6-13　死亡及び死因の一覧（213109）

Sex	Time of death (week)	Found dead	Euthanasia for welfare reasons	Major factors contributing to death
0 IU/kg*/4 days*				
Female	6		X	Combination of findings contributed to the overall poor clinical condition
Male	7		X	Combination of findings contributed to the overall poor clinical condition
Male	9		X	Abscess
Female	13		X	M-sarcoma
Male	21		X	Gastrointestinal lesions
Male	25		X	Urogenital lesion
Male	28		X	Abscess
Female	34		X	Nasal turbinate lesion
Male	40		X	Eye lesions
Male	46		X	No factors contributing to death identified
Male	47		X	Urogenital lesions
Female	51		X	M-sarcoma
Male	R4		X	Abscess
50 IU/kg*/4 days*				
Female	26		X	M-oligodendroglioma
Male	38		X	M-lymphoma
Male	40		X	Nasal turbinate lesions
Male	41		X	Gastrointestinal lesions
Male	41	X		M-lymphoma

Sex	Time of death (week)	Found dead	Euthanasia for welfare reasons	Major factors contributing to death
Male	42		X	M-lymphoma
***150 IU/kg**/4 days*				
Male	7		X	Abscess
Male	11		X	Combination of findings contributed to the overall poor clinical condition
Male	34		X	Skin lesions
Male	43		X	M-sarcoma
Male	43	X		M-lymphoma
Male	45	X		M-lymphoma
Male	49		X	Kidney lesion
***500 IU/kg**/4 days*				
Female	10		X	Gastrointestinal lesions
Male	12		X	Peritonitis
Male	15		X	Joint lesions
Female	17	X		No factors contributing to death identified
Female	27		X	No factors contributing to death identified
Female	29		X	Gastrointestinal lesion
Female	44		X	Skin lesions
Female	45		X	Atrial thrombosis
***1200 IU/kg**/4 days*				
Female	11		X	Kidney lesions
Female	R11		X	Skin lesions
Female	R12	X		Urogenital lesions
Female	16		X	Gastrointestinal lesions
Male	22		X	Joint lesions
Male	28	X		Abscess
Male	31		X	Skin lesions
Male	42	X		No factors contributing to death identified
Female	46		X	Gastrointestinal lesions
Male	R12		X	M-squamous cell sarcoma
Spare animals				
Male[a]	41	X		Kidney lesions

[a]This animal was an undosed spare animal and is included for background information.

Abbreviations: B = benign tumour; M = malignant tumour; R = recovery animal.

免疫不全ラットで予期されたように、偶発的な腫瘍の発現頻度は、対照群及び投与群の全用量で同程度認められ、投与に関連する影響は示唆されなかった（表 2.6.6-14）。Rowett ヌードラットの腫瘍所見の背景データがないことから、他のラット系統の背景所見を参考として用いた。本試験でみられた腫瘍タイプは、対照群の雌 1 例でみられた良性の卵巣顆粒膜細胞腫を除き、いずれも他のラット系統で通常認められる背景データと同様であった。

表 2.6.6-14　腫瘍（213109）

Tumour type	**Control**	**50 IU/kg/4 days**	**150 IU/kg/4 days**	**500 IU/kg/4 days**	**1200 IU/kg/4 days**	**Literature reference of background finding in different rat strains**
Total no. of animals	66	42	42	42	66	N/A
Total no. of animals with tumours	8	8	4	0	6	N/A
Brain, M-oligodendroglioma	-	2	-	-	-	[8,9,10]
Brain, M-sarcoma	1	-	-	-	-	[9]
Adrenal, B-pheochromocytoma	2	-	-	-	-	[11]
Hemopoietic system, M-lymphoma	-	3	2	-	-	[9,10,11]
Pituitary, B-adenoma pars distalis	1	-	-	-	1	[9,10,11,12]
Oesophagus, M-squamous cell carcinoma	-	-	-	-	1	[15]
Tongue, M- squamous cell carcinoma	-	-	1	-	-	[11]
Skin/subcutis, M-sarcoma	1	-	1	-	-	[10,11]
Thyroid, B-follicular cell adenoma	1	1	-	-	-	[11]
Thyroid, B-c-cell adenoma	-	-	-	-	1	[11]
Mammary gland, B-fibroadenoma	-	1	-	-	-	[9,10,11,12]
Ovary, B-granular cell tumour	1	-	-	-	-	-
Uterus, B-endometrial polyp	1	1	-	-	2	[11,16]

Tumour type	Control	50 IU/kg/4 days	150 IU/kg/4 days	500 IU/kg/4 days	1200 IU/kg/4 days	Literature reference of background finding in different rat strains
Ear, B-melanoma	-	-	-	-	1	[17]

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

500 及び 1200 IU/kg 投与群の雌雄における APTT の短縮は、N8-GP の薬理作用に起因すると予測され、有害ではないと考えられた。12 週間の休薬期間終了時点で、1200 IU/kg 投与群の雌雄における APTT は対照群と同様であった（表 2.6.6-15）。プロトロンビン時間（PT）について、投与に関連する影響はみられなかった。

表 2.6.6-15　第 13、30、48 週後における対照群との平均 APTT の%差異（抗体陽性動物を除く）（213109）

Group	N8-GP (IU/kg/4 days)	Week 13		Week 30		Week 48	
		Males	Females	Males	Females	Males	Females
2	50	-1	-2	+9	+14	+5	-3
3	150	-7	-8*	-3	-6	-9	-8*
4	500	-27**	-16**	-13**	-18**	-29**	-13*
5	1200	-38**	-26**	-29**	-27**	-33**	-26*

*p<0.05. **p<0.01.

血液学的検査値におけるその他の対照群との差異はいずれも、軽微であるか、投与関連性を有さないか、又は各試験で整合性が認められないことから、正常な生物学的変動に起因すると考えられた。

血液生化学的検査から、高用量を投与した雌の尿素濃度が一貫して増加することが示された（対照群と比較して最大 23%増加）。病理組織学的検査、尿中検査項目、腎機能に関連するその他の血液生化学的検査から、腎毒性の兆候はみられなかった。したがって、尿素の増加に毒性学的意義はないと考えられた。対照群と比較して、クレアチン・ホスホキナーゼ及びリン濃度に軽微な群間差異がみられたが、有害ではないと考えられた。他の差異はいずれも片性であるか、用量関連性が認められないか、又は各試験で整合性が認められないことから、正常な生物学的変動に起因すると考えられた。

本試験では、7/183 例（3.8%）しか抗体陽性動物が認められなかったことから、Rowett ヌードラットの免疫反応が抑制されており、N8-GP の長期毒性評価における本モデルの妥当性が示された。12 週間の休薬期間終了時点で、高用量群で抗 N8-GP 抗体陽性動物はみられなかった（表 2.6.6-16）。

表 2.6.6-16　26 及び 52 週間投与後に抗薬物抗体が検出された、抗体陽性動物数（213109）

Group	N8-GP (IU/kg/4 days)	Week 26	Week 52	End of recovery
2	50[a]	3/42	2/36	-
3	150[b]	1/40	0/35	-
4	500[c]	0/38	1/34	-
5	1200[d]	2/39	1/35	0/24

[a]Animal nos. 31, 187 and 197 positive week 26 and animal nos. 187 and 197 positive week 52. [b]Animal no. 214. [c]Animal no. 242. [d]Animal nos. 89 and 100 positive week 26 and animal no. 89 positive week 52.

抗体陽性動物のうち 3/7 例で APTT の著しい延長（最低 2 秒）が認められ、内因性 FVIII との交叉反応が示唆された。ラットにおける出血の増加はみられなかった。

トキシコキネティクスの検討から、500 IU/kg 及び 1200 IU/kg 群の大多数において、第 1、26、52 週に N8-GP の全身曝露が確認された（表 2.6.6-17）。150 IU/kg 群では一部の試料のみ被験物質が定量可能であったが、50 IU/kg/dose を投与した動物では定量できなかった。これらの結果は、FVIII 活性測定法の LLOQ と一致するものであった（Module 2.6.4.2.2）。

表 2.6.6-17　トキシコキネティクスパラメータ - Rowett ヌードラットにおける 52 週間反復投与毒性試験（213109）

Dose (IU/kg/4 days)	Dose interval	Exposure week	C_{max} (IU/mL)		$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	
			Males	Females	Males	Females
500	4 days	Week 1	17.5	18.2	152	77.7
		Week 26	12.7	NC	169	NC
		Week 52	15.2	17.1	188	321
1200		Week 1	43.6	28.0	453	292
		Week 26	31.6	14.1	400	255
		Week 52	36.3	31.4	438	250

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

結論として、N8-GP は Rowett ヌードラットへの 52 週間静脈内投与（4 日に 1 回投与）において良好な忍容性を示し、有害所見も認められなかった。NOAEL は高用量である 1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）と考えられる。

2.6.6.4.3　カニクイザルにおける反復投与毒性試験

2.6.6.4.3.1　4 週間の休薬期間後のサルにおける 2 週間静脈内投与（注入）毒性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.7.D、209350）

本試験の目的は、サルに 3 日に 1 回、計 5 回の静脈内投与（注入、5 mL/分）後における N8-GP の毒性、トキシコキネティクス及び安全性薬理に及ぼす影響を評価することであった。4 週間の休薬期間中に、免疫原性、遅発性の毒性発現又は毒性可逆性に関する評価を行った。臨床適用集団が血友病 A 型患者であり、主として男性で生じることから、本試験は雄性動物にのみ行った。試験デザインを表 2.6.6-18 に示す。

アドベイト®ならびに ReFacto®のデータ、及びノボエイト®（ツロクトコグ アルファ（N8）：切断型 B ドメイン rFVIII）から得られた知見[18,19,20,21]に基づき、カニクイザルにおける反復投与毒性試験での用量を設定した。

表 2.6.6-18　試験デザイン - カニクイザルにおける 2 週間反復投与毒性試験（209350）

Group number	Description	Dose level (IU/kg/3 days)	Number of animals in group	
			Main dose group (2 weeks)	Treatment-free group (4 weeks)
			Males	Males
1	Control	0	5	-
2	Low	100	5	3
3	Intermediate	500	5	3
4	High	2500	5	3

毒性評価は、死亡数、一般状態の観察、体重、摂餌量（定性的評価）、眼科学的検査、呼吸評価項目（呼吸数及び深度）、循環器評価項目〔心電図（固定四肢誘導）及び血圧（カフ）〕、体温（直腸）、神経学的／CNS 評価項目（行動性、神経学的、自律神経系の測定）、血液学的検査、血液凝固検査、血液生化学的検査、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査に基づいて行われた。トキシコキネティクス評価及び抗体分析に用いる血液試料も採取した。

体重、摂餌量、眼科学的検査、呼吸評価項目、循環器評価項目、体温、神経学的／CNS 評価項目、血液生化学的検査、及び器官重量に関して投与に関連する影響はみられなかった。

試験期間中、1 例の死亡がみられた（動物番号 28、回復試験における高用量群）。広範囲の骨格筋及び皮下の出血と共に APTT の延長が認められたことから、抗薬物抗体による後天性血友病様変化の発現が示された。

投与期間及び休薬期間中、全投与群の数例において損傷又は腫脹が認められた。解剖の結果、これらの所見は局所で認められ、試料の処理／採取操作に関わる軟組織部位と一致するものであった。

フィブリノゲン濃度、PT、D-ダイマー濃度、又はトロンビン・アンチトロンビン（TAT）複合体の測定結果から、凝固系の活性化は概して確認されなかった。

薬効評価バイオマーカーとして、APTT の短縮がみられる。最初の 4 回の投与（すなわち 10 日間）において投与後に APTT が 6 時間短縮し、薬理作用が確認された（表 2.6.6-19）。

表 2.6.6-19　投与後 APTT（秒）－投与 6 時間後に試料採取 - 各投与群における投与前値との差（%）（209350）

Sampling day	Dose groups			
	Control	100 IU/kg/3 days	500 IU/kg/3 days	2500 IU/kg/3 days
Pre-treatment(s)	19.1	18.8	19.9	21.5
Day 1	-1.0	-7.4	-24.1	-39.5
Day 4	-3.7	-8.5	-24.6	-35.8
Day 7	+2.1	-3.7	-22.6	-38.1
Day 10	0.0	-5.3	-24.6	-30.7
Day 13	-1.0	-6.4	+5.5	+28.4

第 12、17、45 日に抗薬物抗体を測定した。ヒト FVIII タンパク質がカニクイザルにおいて外来異種であることと一致し、第 17 日以降に設けられた休薬期間において N8-GP に対する抗体が検出された。休薬期間終了時点で 100、500 又は 2500 IU/kg 投与群の全例（各 3/3、3/3、2/2 例）の試料から、中和活性を有する抗薬物抗体が確認された。このことと一致して、APTT の投与前値（前回投与から約 72 時間後に測定）は第 13 日から延長した（表 2.6.6-19）。この影響は、本試験の休薬期間中、特に 500 又は 2500 IU/kg 投与群において顕著であった。APTT の延長は、抗体と動物の内因性 FVIII の交叉反応に一致していた。APTT の延長とともに試料の処理操作部位における損傷又は腫脹の兆候がみられたこと、また、高用量群において死亡がみられ骨格筋及び皮下の出血の兆候が認められたことから、抗薬物抗体の交叉反応による後天性血友病様変化の発現が示された。

トキシコキネティクス分析はバリデートされた凝固一段法に基づいて行った。本法は内因性 FVIII 活性を測定するため、LLOQ が高くなっている（Module 2.6.4.2.2）。このことと一致して、100 IU/kg 投与群では曝露が確認できなかった。しかしながら、他の投与群と同様、当該群においても N8-GP への曝露に伴い著しい抗体形成が認められた。

500 IU/kg 又は 2500 IU/kg 投与群において認められた曝露は、中和抗体の形成に影響を及ぼしたものと考えられた。全身曝露は概して、500 IU/kg 又は 2500 IU/kg 投与群への 4 回目の投与（第 10 日）までに検出された。第 13 日の最終投与後、LLOQ を超える曝露は数例のみ認められ、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ は第 1 日と比べて大きく減少した。これらの所見から、抗薬物抗体が形成され（第 17 日の抗体検出により確認）内因性 FVIII と交叉反応し、投与前 APTT の延長がみられることが示された。$T_{½}$は 500 IU/kg 又は 2500 IU/kg を投与群においてのみ、第 1 日（$t_{½}$は 20−49 時間）の初回投与後に測定可能であった。500 IU/kg 及び 2500 IU/kg 投与群において、単回投与後、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}72h}$ が用量に伴って増加した。

最終投与後に安楽死処置した動物において、剖検所見から、投与を行った 3/15 例に血液採取部位（鼠径部の皮膚／皮下組織）の出血がみられた。顕微鏡的観察から、このことは出血に関連する変化であった。さらに、2500 IU/kg 投与群の 1 例で、副腎が「剖検時に軟性」であると記録された。顕微鏡的観察から、このことは血液が充満した被膜下部位（局所出血部位と一致）と関連し、周辺組織を圧迫したと考えられる。

4 週間の休薬期間後に安楽死処置した回復試験動物を剖検した結果、1 例（2500 IU/kg）に大型鼠径リンパ節が確認された。顕微鏡的観察から、このことは鼠径リンパ節部分の血腫に関連する変化であった。しかしながら、投与群の鼠径部の皮膚／皮下組織は最終堵殺対照群のものと同様であった（休薬対照群は設けていない）。

すべての臨床検査的及び病理学的所見（出血、網状赤血球の増加及び APTT の延長）は内因性 FVIII への交叉反応性中和抗体の形成に関連し、後天性血友病様変化を生じたと考えられた。

結論として、100、500 及び 2500 IU/kg の N8-GP の静脈内投与により、N8-GP 中和抗体の形成が誘発された。この抗体は、カニクイザルにおいて内因性 FVIII と交叉反応すると考えられた。

中和抗体に関連する変化以外に有害影響が確認されなかったことから、N8-GP が免疫原性に対して影響を及ぼさない NOAEL は 2500 IU/kg と考えられた。

2.6.6.5 遺伝毒性試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.5 に示した。

2.6.6.6 がん原性試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.6 に示した。

2.6.6.7 生殖発生毒性試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.7 に示した。

2.6.6.7.1 幼若動物を用いた試験

実施しなかった。その妥当性を Module 2.4.4.7 に示した。

2.6.6.8 局所刺激性試験

ICH S6(R1)ガイドライン[1]に従って、ラット及びサルにおける反復投与毒性試験の一部に局所刺激性評価を組み入れ、また、ウサギにおける局所刺激性試験より、N8-GP の局所刺激性を評価した。

反復投与毒性試験における剖検及び顕微鏡学的検査により投与部位を評価したところ、Wistar 系ラット及びカニクイザルのいずれにおいても N8-GP の局所毒性の影響は確認されなかった。

Rowett ヌードラットにおける長期毒性試験では、尾部の発赤、尾部の暗色化、腫脹、肥厚、痂皮、紅斑、挫傷、剥離／皮膚脱落、隆起、尾部損傷部位の乾燥又は湿潤といった投与部位反応がみられた。これらの反応は対照群を含む全投与群でみられたため、N8-GP ではなく、投与操作に関連すると考えられた。

ウサギにおける局所刺激性試験を実施し、N8-GP の適用投与（静脈内）及び適用外投与（静脈周囲及び動脈内）による局所刺激性を評価した。いずれの変化も軽度であり、臨床において使用可能と考えられた。

2.6.6.8.1 静脈周囲、静脈内及び動脈内投与 4 日後のウサギにおける局所刺激性試験（GLP 適用）（Table 2.6.7.16、211273）

本試験の目的は、ウサギへの静脈周囲、静脈内、又は動脈内単回投与後の第 5 日の投与部位において、N8-GP の局所刺激性を評価することである。使用した製剤は、臨床適用製剤 500 IU/mL に相当する。

動物（雄性ニュージーランド白色種ウサギ 12 例）へ静脈周囲、静脈内、又は動脈内単回投与を行った。同一動物の右耳に被験物質を、左耳に溶媒（塩化ナトリウム 0.9%）を投与した（表 2.6.6-20）。塩化ナトリウム 0.9%を投与し、投与操作の組織反応を評価した。

表 2.6.6-20　試験デザイン - ウサギにおける局所刺激性（211273）

Group	Route of administration	Dose concentration (IU/mL)	Dose volume (mL/injection site)	Number of animals (males)
1	Perivenous, right ear Perivenous, left ear	500 0	0.15	4
2	Intravenous, right ear Intravenous, left ear	500 0	0.15	4
3	Intra-arterial, right ear Intra-arterial, left ear	500 0	0.15	4

Note: A single dose of 0.15 mL (corresponding to approximately 20 IU/kg) per animal of N8-GP.

投与部位は、投与前、投与後 2 分以内、さらにその 3 時間±15 分に観察し評点を記録した。以降、投与部位を毎日観察した。特に出血、挫傷、紅斑、腫脹を観察した。

第 5 日に動物を安楽死処置し、剖検による評価を行い、*in situ* で器官及び組織の発現を観察した。投与部位の顕微鏡学的検査も行った。

投与部位の炎症及び出血といった軽度の病理組織学的変化が認められた。静脈周囲投与でみられた変化と、N8-GP の投与後又は塩化ナトリウム 0.9%（対照群）投与後の変化の発現率及び重症度は同等であった。N8-GP 静脈内投与後、数例に極微な炎症反応及び出血が確認された一方、塩化ナトリウム 0.9%の静脈内投与群では、病変は全く記録されなかった。N8-GP の静脈内投与群の 1 例において、軽度の局所性の血栓がみられた。血栓は投与操作に起因するものであり、投与には関連しないと考えられた。動脈内投与部位において、塩化ナトリウム 0.9%を投与した対照群と比較して N8-GP 投与後に炎症変化及び出血の発現率・重症度が高くなる傾向が確認された。

概して、いずれの変化も軽度であり、投与経路に起因する出血による結果と考えられた。

2.6.6.8.2 Wistar 系ラットにおける 2 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、209355）

投与部位において、N8-GP に関連した顕微鏡的所見はみられず、高用量群（2500 IU/kg、2 日に 1 回投与）と対照群の投与部位は概して同様であった。

2.6.6.8.3 Rowett ヌードラットにおける 26 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、212512）

試験中に確認された投与部位反応は、尾部の着色（赤色又は橙色）、腫脹、痂皮、紅斑、挫傷、剥離、びらん又は潰瘍、隆起、尾部損傷部位の乾燥又は湿潤であった。これらの反応は、対照群を含む全投与群で認められた。顕微鏡学的評価で、尾部の投与部位反応は対照群及び N8-GP 投与群共に低頻度で発現したが、概ね極微～軽微と判断された。これらの反応は静脈内投与操作に関連するものであり、N8-GP の投与に関連するものではないと考えられた。

2.6.6.8.4 Rowett ヌードラットにおける 52 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、213109)）

試験中に確認された投与部位反応は、尾部の発赤、尾部の暗色化、腫脹、肥厚、痂皮、紅斑、挫傷、剥離／皮膚脱落、隆起、尾部損傷部位の乾燥又は湿潤であった。これらの反応は、対照群を含む全投与群で認められたため、静脈内反復投与操作又は溶媒に関連するものであり、N8-GP に関連するものではないと考えられた。顕微鏡学的評価で、尾部の投与部位反応は対照群及び N8-GP 投与群共に

低頻度で発現したが、概ね極微～軽微と判断された。これらの反応は静脈内投与操作に関連するものであり、N8-GP の投与に関連するものではないと考えられた。

2.6.6.8.5 カニクイザルにおける 2 週間反復投与後の局所刺激性（Table 2.6.7.16、209350）

後天性血友病様変化が生じた動物の試料処理／採取操作に関連した出血を除き、高用量投与群と対照群における顕微鏡的所見は概して同様であった。

2.6.6.8.6 局所刺激性の結論

全体として、N8-GP の投与部位反応は軽度又は認められなかった。

2.6.6.9 その他の毒性試験

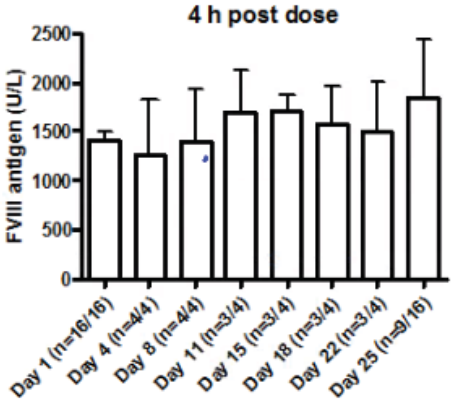
2.6.6.9.1 免疫原性

反復投与毒性試験の期間を支持するために、Wistar 系ラット及びカニクイザルおける 2 種類の 4 週間反復投与 PK 試験及び免疫原性試験（N8-GP を週 2 回静脈内投与）の一部として、抗 N8-GP 中和抗体の形成を評価した。双方の試験において PK 測定値及び中和抗体のバイオマーカーとして APTT 延長を評価し、抗体形成時期を測定した。

免疫系の適応による阻害を回避し、N8-GP（PEG を含む）の長期毒性を評価するため、6 週間反復投与試験において免疫不全ラット（Rowett ヌードラット）の使用可能性を検討した。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており T 細胞依存性の抗体反応が生じないため、抗薬物抗体を阻害せず N8-GP の長期投与が可能となる。

2.6.6.9.1.1 雄性 Wistar 系ラットにおける N8-GP 静脈内反復投与後の PK 及び免疫原性（Table 2.6.7.17、[redacted]）

雄性 Wistar 系ラット 16 例に N8-GP 250 IU/kg を 4 週間にわたり計 8 回（週に 2 回投与）静脈内投与し、反復静脈内投与 PK を検討した。また、動物において他の FVIII 製剤でみられるように N8-GP が中和抗体形成を誘発するか検討した。N8-GP への曝露が検出されたラットの数は、第 1 日及び第 25 日では異なった。第 1 日には、全投与群のラットにおいて曝露が確認された。第 25 日には、9/16 例のラットにおいて曝露が確認された（図 2.6.6-1）。第 12 日に 11/16 例の動物において中和抗体が検出され、抗体形成と曝露の減少に相関関係がみられた。



Note: Exposure 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). Animals without exposure have been excluded from the data.

図 2.6.6-1　曝露が確認されたラットの数－FVIII 抗原濃度の経時変化

結論として、4 週間投与後に大多数の動物において中和抗体の形成がみられ、曝露が減少した。したがって、2～4 週間を超える反復投与毒性試験（GLP 適用）を実施する意義はないと考えられた。

2.6.6.9.2　雄性カニクイザルにおける N8-GP 静脈内反復投与後の PK 及び免疫原性（Table 2.6.7.17、[redacted]）

雄性カニクイザル 3 例に N8-GP 250 IU/kg を 4 週間にわたり計 8 回（週に 2 回投与）静脈内投与し、反復静脈内投与 PK を検討した。また、N8-GP が中和抗体形成を誘発するか検討した。凝固マーカー（APTT、PT 及びフィブリノゲン）は、全投与時点の投与前及び投与後に分析した。また、血漿試料を分析し、N8-GP の PK を測定した。

N8-GP 投与後に APTT が短縮するため、APTT は FVIII 濃度依存性である。投与後における APTT の短縮は第 11 日まで確認された。第 15 日から APTT が著しく延長し、内因性 FVIII に対する交叉反応性中和抗体が動物において形成されたことが示唆された。このことと一致して、第 15 日以降、曝露は減少又は検出されなかった（図 2.6.6-2）。本試験終了時点の全例に FVIII 中和抗体が確認された。後天性血友病様変化の発現に関連する一般状態変化のため、1 例を試験終了前の第 23 日に安楽死処置した。この後天性血友病様変化の発現は、抗薬物抗体が内因性 FVIII と交叉反応したことに起因すると考えられる。このことは、ツロクトコグ アルファ（ノボ ノルディスク社が創製した rFVIII）での知見及びカニクイザルにおいて検査した他のヒト FVIII 製剤に基づき、予測される所見であった[19,20,21]。

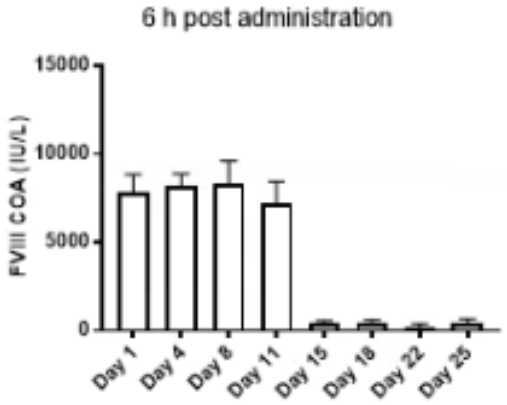


図 2.6.6-2　サル - 第 15 日からの曝露減少 - 投与後 6 時間の発色性合成基質法 FVIII 活性の経時変化

結論として、カニクイザルへの 250 IU/kg の N8-GP 投与（週 2 回投与）を行ったところ、すべての動物において第 11～15 日（投与 4 及び 5 回目）に FVIII 交叉反応性中和抗体が形成され、曝露への影響がみられた。したがって、2 週間を超える反復投与毒性試験（GLP 適用）を実施する意義はないと考えられた。

2.6.6.9.2.1　Rowett ヌードラットにおける 6 週間静脈内投与（週に 2 回）後の PK 及び免疫原性試験（Table 2.6.7.17、212142）

本試験の目的は、免疫不全 Rowett ヌードラット（Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}）における 6 週間投与による N8-GP の PK 及び免疫原性を検討し、6 週間を超える反復投与モデルを評価することであった。雌雄各 10 例から成る 2 群に対し、50 又は 1500 IU/kg の N8-GP を静脈内投与（週 2 回）した。各 5 例の雌雄から成る対照群には、高用量群と同一容量の溶媒を投与した。

試験中、一般状態観察、体重、摂餌量、血液学的検査、生態試料中薬物濃度測定、抗体分析、器官重量、剖検及び顕微鏡学的検査を実施した。さらに、PEG の有無を確認するため、脳、脾臓、筋組織において IHC 染色を行った。

6 週間静脈内投与（週に 2 回）後の PK 分析から、1500 IU/kg 投与群で N8-GP の全身曝露が示された。50 IU/kg 投与群においては、曝露は検出できず、FVIII 凝固一段法の LLOQ と一致した。消失半減期は、1500 IU/kg 群の 6 週間投与後でのみ推定可能であった（$t_{1/2}$：雄性ラットにおいて 10.1 時間、雌性ラットにおいて 11.6 時間）。曝露に明確な性差は確認されなかった。6 週間静脈内投与（週 2 回投与）後の 1500 IU/kg 投与群において、累積比は雌雄でそれぞれ 1.7 及び 1.9 であった。

本試験ではいずれの投与群においても抗薬物抗体形成は認められなかった。

剖検及び顕微鏡学的観察による所見のうち被験物質に起因するものはみられず、いずれの投与群においても、脳、脾臓、筋組織で PEG は検出されなかった。

結論として、1500 IU/kg 投与群の全例に全身曝露が確認された。本投与量では一定の累積がみられた。

本試験の結果、抗薬物抗体の形成がみられず、かつ 6 週間の投与期間中に曝露が認められたことから、N8-GP の長期毒性試験に Rowett ヌードラット（Crl:NIH-Foxn1^{rnu}）が使用可能であることが示された。

2.6.6.9.2.2　製造工程の最適化を支持する試験

N8-GP の臨床開発中に、ノボ ノルディスクは原薬製造工程を最適化し、[redacted]から[redacted]へ[redacted]した。（詳細は 3.2.S.2.6 を参照）。3 種の非臨床試験（薬効、PK 及び免疫原性）を実施し、製造工程の最適化前後における N8-GP の比較を行った。CTD ガイダンスに従うと、3 種類の試験概要は複数のセクション（Module 2.6.2、2.6.4 及び 2.6.6）に属するが、要約として以降にまとめた。

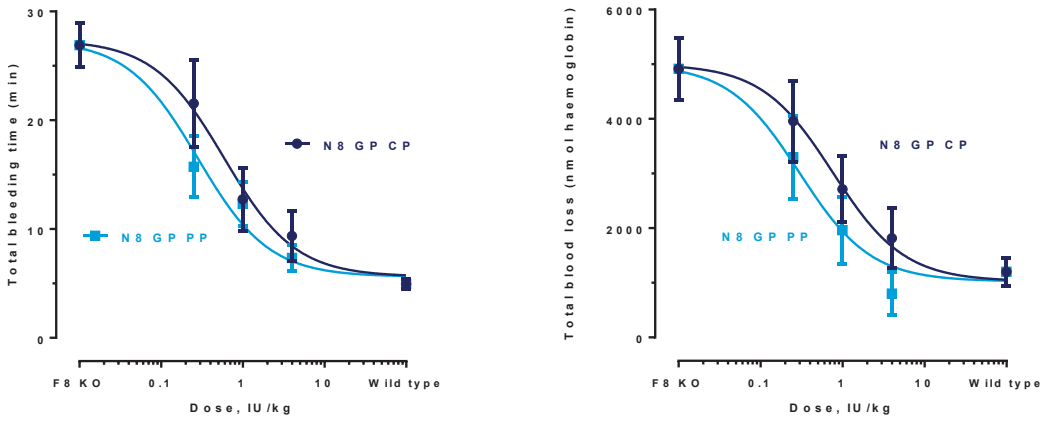
2.6.6.9.2.2.1　N8-GP 製造工程の最適化前後における薬力学的比較 - F8-KO マウスにおける用量反応出血試験（Table 2.6.7.17、[redacted]）

最適化前（N8-GP[redacted]実生産工程）及び最適化後（N8-GP[redacted]実生産工程）における N8-GP の用量反応関係は、麻酔条件下での FVIII ノックアウト（F8-KO）マウスの尾静脈切断（TVT）出血モデルを用いて評価した。

F8-KO マウスをイソフルランで麻酔し、温熱パッド上で尾を生理食塩水に浸した。右外側尾静脈に投与後 5 分に、左外側尾静脈を切断し、尾を生理食塩水で置換した。被験物質用量はそれぞれ 0.25、1、4 IU/kg であり、各群 10 例とした。採取した血液中のヘモグロビン量測定用に採取した 40 分間、出血を目視で確認した。さらに、逆用量反応式をデータにフィッティングし、50%有効量（ED_{50}）値を推定した。データは一元配置分散分析又は独立 Student の t 検定で比較を行い、平均±SEM 又は 95% CI で算出した。

各投与用量において、N8-GP 製造工程最適化前（[redacted]実生産工程）及び最適化後（[redacted]実生産工程）の間に統計学的に有意な差異は認められず、総出血時間及び総出血量に関しても同様であった（図 2.6.6-3）。変更後及び変更前における総出血時間の ED_{50} 推定値は、それぞれ 0.59 IU/kg（0.27～1.3 IU/kg）、0.28 IU/kg（0.12～0.65 IU/kg）であった（p=0.11）。変更後及び変更前における総出血量の

ED_{50}推定値は、それぞれ 0.76 IU/kg（0.26～2.2 IU/kg）、0.30 IU/kg（0.10～0.91 IU/kg）であった（p=0.11）。



Note: Fitted curves with means ± SEM; n=10. Dose level 0.25, 1 and 4 IU/kg. F8-KO mice are negative control (no effect) and wild type mice positive control (full effect).
Abbreviations: CP = commercial process; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; PP = pivotal process.

図 2.6.6-3　F8-KO マウスの尾静脈切断出血モデルにおける N8-GP 製造工程の最適化前（N8-GP[redacted]実生産工程）及び最適化後（N8-GP [redacted]実生産工程）を比較した総出血時間及び総出血量の用量反応関係

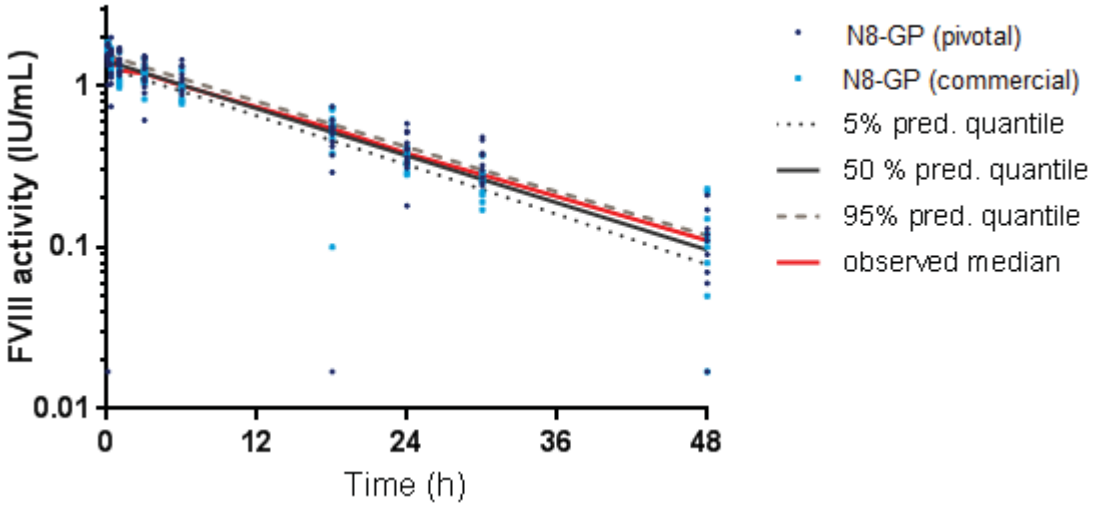
F8-KO マウスの尾静脈切断出血モデルを用いた検討から、結論として N8-GP 製造工程最適化前後における推定力価、ED_{50}、総出血時間及び総出血量は同等であった。

2.6.6.9.2.3　F8-KO マウスにおける N8-GP 製造工程最適化前後の PK 比較（Table 2.6.7.17、[redacted]）

本試験の目的は、最適化前（[redacted]実生産工程）及び最適化後（[redacted]実生産工程）において、N8-GP 原薬の PK プロファイルが AUC0.8～1.25 で同等であるかを評価することであった。最適化前又は最適化後に製造した N8-GP 140 IU/kg を F8-KO マウスに静脈内投与し、投与後 48 時間にわたり血液試料を定期的に採取した。2 投与群に F8-KO マウス各 36 例、計 72 例を本試験に組み入れた。血漿中試料は FVIII 発色性合成基質法を用いて分析した。時間に対する血漿中 FVIII 発色性活性データは非線形混合効果法を用いてモデル化した。本モデルにカテゴリカル型共分散分析を使用し、個体間パラメータ変動に及ぼす 2 種類の製造工程の潜在的影響を検討した。

推定個体数から、N8-GP 製造工程の最適化前及び最適化後の AUC 比は 1.0 であり、0.80～1.25 の範囲内であった。したがって 2 種類の被験物質は同等と考えられる。

マウス集団における予測された PK プロファイルの中央値は、図 2.6.6-4 に示した平均プロファイル測定値と緊密に重なりあった。



Note: Dose 140 IU/kg N8-GP. Curve including 90% CI for median prediction.
Abbreviations: CI = confidence interval; FVIII = coagulation factor eight. Pivotal: N8-GP for the development phase. Commercial: N8-GP for the commercial phase.

図 2.6.6-4　製造工程の最適化前（[redacted]実生産工程）又は最適化後（[redacted]実生産工程）の N8-GP 原薬の F8- KO マウスへの静脈内投与後における FVIII 活性測定値の経時変化

結論として、製造工程の最適化前及び最適化後における N8-GP 原薬の PK プロファイルは同等であった。

2.6.6.9.2.4　ウサギモデルを用いた製造工程最適化前後に製造された N8 中間体の免疫原性評価（Table 2.6.7.17、[redacted]）

比較免疫原性試験は、製造工程の最適化前（[redacted]実生産工程）及び最適化後（[redacted]実生産工程）に製造された中間体であるツロクトコグ アルファ（N8）を投与したウサギを用いて実施した。

PEG 成分により分子の免疫原性が低下する可能性があるため、N8-GP ではなく中間体を使用し本試験の精度を高めた。

ウサギに対し 50 IU/kg を週 2 回、8 週間継続して投与した（表 2.6.6-21）。試験期間中、抗 CHO HCP（チャイニーズハムスター卵巣宿主細胞由来タンパク質）抗体及び抗 N8（rFVIII）抗体の形成をモニ

タリングし、感受性が高い当該動物モデルを用いて製造工程変更による免疫原性への影響を評価した。

表 2.6.6-21　試験デザイン - ウサギにおける免疫原性評価（[redacted]）

Group	Compound	Dose	Number of animals (females)
A	N8- pivotal	50 IU/kg twice per week	20
B	N8 commercial	50 IU/kg twice per week	20

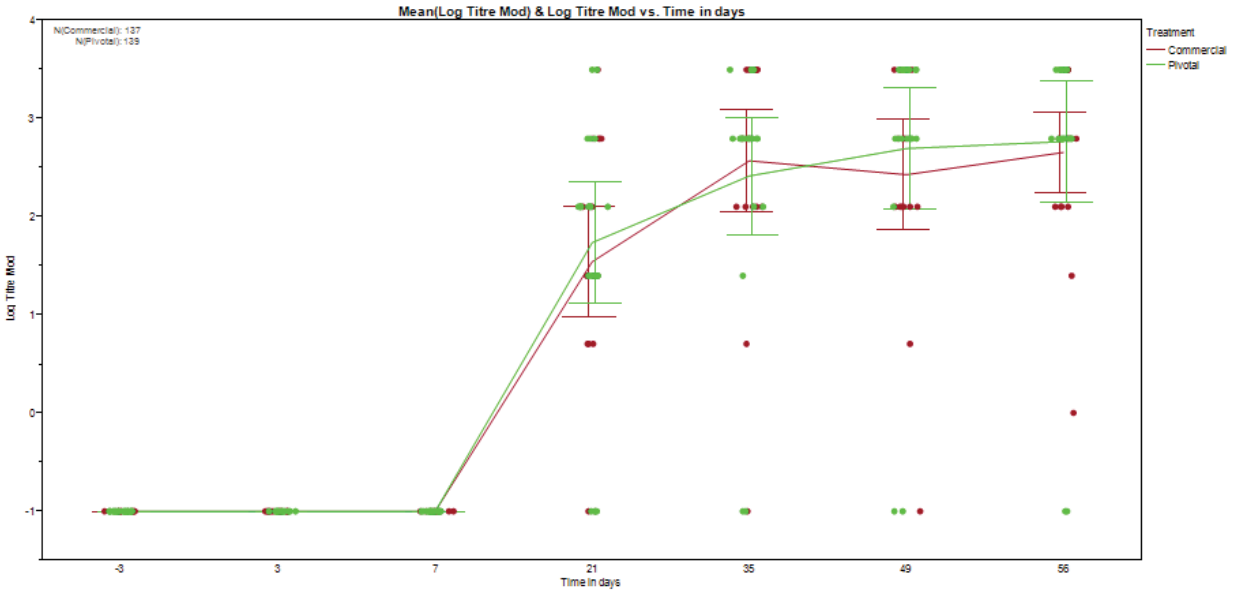
一過性かつ低レベルの抗 CHO HCP 抗体が、製造工程最適化前の N8 中間体投与群において第 21 及び 35 日に 2/20 例、製造工程最適化後の N8 中間体投与群においては第 56 日に 1/20 例確認された（表 2.6.6-22）。

表 2.6.6-22　ウサギにおける N8 中間体を反復投与後の抗 CHO 宿主細胞タンパク質抗体形成の概要

Time point (First dose = day 0)	Pivotal Positive/group size (% positive)	Commercial Positive/group size (% positive)
Day -3	0/19 (0%)[a]	0/19 (0%)[a]
Day 3	0/20 (0%)	0/20 (0%)
Day 7	0/20 (0%)	0/20 (0%)
Day 21	2/20 (5%)[b]	0/20 (0%)
Day 35	2/20 (10%)[c]	0/20 (0%)
Day 49	0/20 (0%)	0/20 (0%)
Day 56	0/20 (0%)	1/20 (5%)

[a]One sample was missing from both the pivotal and commercial group. [b]Due to low sample volume, one sample was defined positive based only on the screening assay. [c]Due to low sample volume, two samples were defined positive based only on the screening assay.

予測したとおり、ほぼすべてのウサギにおいて製造工程の最適化前及び最適化後共に N8 中間体に対する抗体が形成され、かつ抗体力価は経時的に増加した。製造工程の最適化前の N8 投与群及び製造工程最適化後の N8 投与群において、いずれの時点（第 21、35、49、56 日）でも抗 N8 抗体力価に有意差は認められなかった（t 検定）（図 2.6.6-5）。



Note: Development of anti-N8 antibody at each time point (days -3, 3, 7, 21, 35, 49 and 56) comparing treatment (pivotal N8, green and commercial N8, red). The Y-axis represents the log 10 transformed titres. Each error bar is constructed using a 95% confidence interval of the mean.

図 2.6.6-5　　N8 中間体投与（週 2 回投与）を行ったウサギにおける抗 N8 抗体の経時的形成の概要

結論として、製造工程の最適化前及び最適化後の N8 中間体に関して、ウサギモデルを用いたいずれの時点においても、抗 N8 抗体及び抗 CHO HCP 抗体に関連する免疫原性の差異は認められなかった

2.6.6.9.3　　結論

製造工程の最適化前（[redacted]実生産工程）及び最適化後（[redacted]実生産工程）の原料における薬効、PK 及び免疫原性は同等であった。

2.6.6.10　考察及び結論

Wistar 系ラットへの 25000 IU/kg までの単回投与及び 2500 IU/kg までの 2 週間投与（2 日に 1 回投与）ならびに Rowett ヌードラットへの 1200 IU/kg までの 26 及び 52 週間投与（4 日に 1 回）後において、N8-GP は概して良好な忍容性を示した。カニクイザルにおいては、N8-GP を 2500 IU/kg まで 2 週間投与（3 日に 1 回投与）した。反復投与毒性試験において、免疫原性に対する影響が認められなかったことから、各試験の最高用量が無毒性量（NOAEL）であった。

重要な非臨床毒性試験において特定した NOAEL と小児及び成人への予防投与用量の比較、並びに用量及び体表面積〔ヒト等価用量（HED）〕に基づく倍数を表 2.6.6-23 に示す。

表 2.6.6-23　非臨床投与量と小児及び成人への臨床投与量の比較

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

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

2.6.6.10.1　免疫原性

N8-GP タンパク質は外来異種であることから、他の FVIII 製剤でみられたようにラット及びカニクイザルにおいても抗薬物抗体形成が予測・観察された [18,19,20,21]。

Wistar 系ラットを用いた PK 免疫原性試験において、抗薬物抗体と投与（250 IU/kg、週 2 回）第 25 日の薬物曝露量の減少に相関関係が認められた。したがって、投与期間のほぼ全体における曝露を確実にするため、2 週間反復投与毒性試験は適正な投与期間と考えられた。Wistar 系ラットを用いた重要な 2 週間反復投与毒性試験において、第 1 日に曝露が確認され、以降、抗体形成が認められる動物が増加し、曝露は減少した。第 13 日時点で曝露が認められた動物は数例のみであった。

カニクイザルにおける反復投与 PK 及び免疫原性試験から、投与（250 IU/kg、週に 2 回）第 11～15 日後の抗体形成が示唆された。そのため、長期投与は曝露に関して意義があるとは考えられず、むしろ FVIII 交叉反応性中和抗体形成に関連した後天性血友病様変化の臨床的症状を引き起こし、出血傾向につながるリスクが高かった。カニクイザルを用いた重要な 2 週間毒性試験において、第 10 日まで全身曝露が確認された。抗薬物抗体形成により、第 13 日時点で曝露が認められた動物は数例のみであった。抗体が動物の内因性 FVIII と交叉反応した結果、後天性血友病様変化の臨床的及び病理学的兆候を引き起こした。

Rowett ヌードラットを導入し、予測される免疫反応を回避し、N8-GP 及び分子の PEG 部分の長期毒性評価を可能とした。Rowett ヌードラットは胸腺を欠損しており T 細胞依存性の抗薬物抗体を形成しない。

Rowett ヌードラットを用いた 26 及び 52 週間試験のすべての投与群において、抗薬物抗体が検出された動物はわずか（≤ 4%）であった。抗薬物抗体陽性動物では APTT の延長及び曝露の減少が認められたことから、抗薬物抗体形成によって N8-GP の薬理作用が抑制されたことが示唆された。T 細胞欠損ヌードラットにおける T 様細胞（T-like cell）は加齢に伴って増加することが確認されており [5]、このことは本試験において抗薬物抗体を形成した少数の動物とも一致している。

2.6.6.10.2　Rowett ヌードラットにおける薬効の確認

Rowett ヌードラットを用いた 26 及び 52 週間試験において、500 IU/kg 及び 1200 IU/kg 投与群の大多数に LLOQ を超える曝露が確認された。

低用量の 2 群においては、LLOQ により曝露が検出できなかったため、APTT の短縮が曝露における薬力学マーカーとして機能した。全投与群において用量依存的な APTT の短縮がみられたことから、N8-GP の薬効及び曝露が確認された（表 2.6.6-24）。

表 2.6.6-24　APTT（秒） - Rowett ヌードラットを用いた 26 及び 52 週間試験における対照群からの変化

IU/kg/4 days	0		50		150		500		1200	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
26 weeks										
Week 13	16.0	15.5	-13**	+1	-17**	-2	-19**	-6	-30**	-13**
Week 26	18.1	17.1	-3	-6	-13**	-14**	-22**	-16*	-30**	-2
52 weeks										
Week 13	16.9	16.8	-1	-2	-7	-8*	-27**	-16**	-38**	-26**
Week 30	15.6	17.5	9	14	-3	-6	-13**	-18**	-29**	-27**
Week 48	16.5	17.8	5	-3	-9	-8*	-29**	-13**	-33**	-26**

Note: APTT changes in percent of control, antibody-positive animals were excluded.
*p<0.05. **p<0.01.
Abbreviations: APTT = activated partial thromboplastin time.

2.6.6.10.3　製造工程の最適化を支持する試験

ノボ ノルディスク社は原薬製造工程を最適化し[redacted]した。本原料の臨床試験への導入を支持するため 3 種の非臨床試験を実施した。その結果、製造工程の最適化前後の原料における PD、PK 及び免疫原性は同等であった。

2.6.6.10.4　PEG 安全性

52 週間までの N8-GP 長期毒性試験において PEG に関連した安全性の懸念は認められず、非常に頑健な N8-GP の非臨床安全性評価が示された。さらに、N8-GP（PEG 成分を放射能標識化）の分布及び排泄試験から、N8-GP の PEG がすべての組織から経時的に消失し、尿及び糞中へ排泄されることが示された。

PEG は添加剤又は薬物附加体として、食品、化粧品及び医薬品に広く使用されている[22,23,24,25,26,27,28]。PEG 化は十分に確立された技術であり、薬物の循環血中半減期を延長するため一般的に用いられている[22,23,24,25,28]。多数の PEG 化製剤が市販又は開発されており、PEG の非臨床プロファイルの特性が十分明らかになっている[22,23,24,25,27,28,29]。臨床的に意味のある用量において、PEG は不活性であり機能変化又は毒性学的に意味のある変化は認められない[23,24,25,28,29]。PEG が附加されている治療用タンパク質は薬理作用及び毒性作用を示すと考えられるが、全身での薬効の延長以外に、PEG の相加作用はほとんどあるいは全くないと考えられる[28]。一部の毒性試験において高用量の PEG を投与した結果、異なるサイズの PEG 部分に起因する細胞内空胞形成が認められた[22,23,28]。本所見は主に、種々の組織及び排出器官（腎臓、肝臓、脈絡叢など）のマクロファージにおいてみられた[22,28]。PEG に関連した空胞形成

が認められたものの、炎症、変性、壊死といった細胞反応は誘発されず、有害影響又は動物における *in vivo* での機能変化にも関連しなかった [22,23,28]。

ラット及びサルを用いた N8-GP の毒性試験において（ラットは 52 週間まで投与）、投与に関連した細胞内空胞形成はみられなかった。52 週間の長期毒性試験を実施した Rowett ヌードラットの脳組織（脈絡叢を含む）に対して、PEG を高感度に検出する IHC 染色技術を用いて、潜在的な N8-GP の PEG 分布を評価した。N8-GP を 1200 IU/kg まで 52 週間反復投与（4 日に 1 回投与）したが、脳組織における定常状態での PEG は検出できなかった。

1200 IU/kg（4 日に 1 回投与）を 26 週間及び 52 週間反復投与後、2 週間の回復性を評価した 52 週間長期毒性試験において、NMR を用いて血漿中 PEG 濃度を測定した。PEG 濃度の測定値は LLOQ（0.38 µg/mL）付近であるか、又は LLOQ 未満であった。投与 52 週間後及び回復期間終了後の最終堵殺時に採取した CSF 試料を NMR で測定したが、PEG は検出できなかった。

2.6.6.10.5　結論

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

参考文献

[1] ICH S6(R1). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-derived Pharmaceuticals. 12 June 2011.
[2] ICH M3(R2). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. 11 June 2009.
[3] EMA. CHMP Safety Working Party's response to the PDCO regarding the use of PEGylated drug products in the paediactric population. EMA/CHMP/SWP/647258/2012. 16 November 2012.
[4] Rasmussen C, Nowak J, Larsen JM, Moore E, Bell D, Liu KC. Long-Term Safety of PEGylated Coagulation Factor VIII in the Immune-Deficient Rowett Nude Rat. J Tox. 2017;1-13.
[5] Hanes MA. The Nude Rat. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. The Laboratory Rat. 2nd ed. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2006. p. 733-59.
[6] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991-8.
[7] Mueller BU, Pizzo PA. Cancer in children with primary or secondary immunodeficiencies. J Pediatr. 1995;126(1):1-10.
[8] Gopinath C. Spontaneous brain tumours in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol. 1986;24(2):113-20.
[9] Son WC, Bell D, Taylor I, Mowat V. Profile of early occurring spontaneous tumors in Han Wistar rats. Toxicol Pathol. 2010;38(2):292-6.
[10] Son WC, Gopinath C. Early occurrence of spontaneous tumors in CD-1 mice and Sprague-Dawley rats. Toxicol Pathol. 2004;32(4):371-4.
[11] Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Chu KC, Linhart MS. Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1979;48(2):237-48.
[12] Ikezaki S, Takagi M, Tamura K. Natural Occurrence of Neoplastic Lesions in Young Sprague-Dawley Rats. J Toxicol Pathol. 2011;24(1):37-40.
[13] Lewis DJ. Ovarian neoplasia in the Sprague-Dawley rat. Environ Health Perspect. 1987;73:77-90.
[14] Alison RH, Morgan KT. Ovarian neoplasms in F344 rats and B6C3F1 mice. Environ Health Perspect. 1987;73:91-106.
[15] Deschl U, Schaetti P, Krinke G. Spontaneous metastasizing squamous cell carcinoma of the oesophagus in a Sprague Dawley rat. Exp Toxicol Pathol. 1997;49(1-2):123-7.
[16] Davis B. Endometrial stromal polyps in rodents: biology, etiology, and relevance to disease in women. Toxicol Pathol. 2012;40(3):419-24.
[17] Zurcher C, Roholl PJM. Melanocytic Tumors, Rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD, ed. Integument and mammary glands. Springer Verlag; 1989. p. 70-86.
[18] FDA. ReFacto®: Summary of Basis for Approval. Reference Number 98-0137.
[19] EMA. ReFacto®: EPAR - Scientific Discussion. EMEA 2004.
[20] EMA. Advate®: EPAR - Scientific Discussion. EMEA 2005.
[21] Beck W. NN7008: 14 day intravenous administration toxicity study in the male cynomolgus monkey followed by a 6 day recovery period. Study No. 0665/919, Sponsor's Ref. No. NN208012. 2009.
[22] Ivens IA, Bauman A, McDonald TA, Humphries TJ, Michaels LA, Mathew P. PEGylated therapeutic proteins for haemophilia treatment: a review for haemophilia caregivers. Haemophilia. 2013;19:11-20.
[23] 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.
[24] 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.
[25] 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.

[26] Fruijtier-Polloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. Toxicology. 2005;214(1-2):1-38.
[27] D'Souza AA, Shegokar R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. Expert Opin Drug Deliv. 2016;13(9):1257-75.
[28] 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.
[29] 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.

ツロクトコグ アルファ ペゴル（遺伝子組換え）

2.6.7 毒性試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
2.6.7.1 毒性試験の概要 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表 6
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧 7
2.6.7.4 毒性試験：使用バッチ 8
2.6.7.4.A 非臨床試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧 8
2.6.7.4.B 重要な毒性試験及び[redacted]実生産工程製剤への製造変更を支持する試験で使用された各非臨床試験バッチにおける原薬の目的物質由来不純物、提案する有効期間内規格及び含有量 10
2.6.7.4.C 重要な毒性試験及び[redacted]実生産工程製剤への製造変更を支持する試験で使用された各非臨床試験バッチにおける製剤の目的物質由来不純物、提案する有効期間内規格及び含有量 11
2.6.7.5 単回投与毒性試験 12
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 12
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 13
2.6.7.7.A ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 209355） 13
2.6.7.7.B ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 212512） 17
2.6.7.7.C ラットにおける 52 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 213109） 20
2.6.7.7.D カニクイザルにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 209350） 24
2.6.7.8 遺伝毒性試験：*in vitro* 31
2.6.7.9 遺伝毒性試験：*in vivo* 31
2.6.7.10 がん原性試験 31
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 31
2.6.7.12 生殖発生毒性試験：受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験 31
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験 31
2.6.7.14 生殖発生毒性試験：出生前及び出生後の発生ならびに母体の機能に関する試験 31
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 32
2.6.7.16 局所刺激性試験 33
2.6.7.17 その他の毒性試験 35

2.6.7.1 毒性試験の概要

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Type of study	Species and strain	Route of administration	Duration of dosing	Doses tested (NOAEL[a]) (IU/kg/dose)	GLP (Yes/No)	Study ID	Testing facility	Location in CTD
Single-dose toxicity								
Single-dose toxicity	Rat (Wistar Hannover GALAS)	i.v.	Single	0, 20000, 25000	No	212344	Novo Nordisk, DK	4.2.3.1-1
Repeat-dose toxicity								
2 weeks	Rat (HsdHan™:WIST)	i.v.	2 weeks with an additional 4-week arm	0, 100, 500, 2500 every 2nd day for 2 weeks, 2500 for 4 weeks	Yes	209355	Covance, Harrogate, UK	4.2.3.2-1
26 weeks	Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	26 weeks	0, 50, 150, 500, 1200 every 4th day	Yes	212512	Envigo[b], UK	4.2.3.2-2
52 weeks	Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	52 weeks	0, 50, 150, 500, 1200 every 4th day	Yes	213109	Envigo[b], UK	4.2.3.2-3
2 weeks	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis)*	i.v.	2 weeks	0, 100, 500, 2500 every 3rd day	Yes	209350	Covance, Harrogate, UK	4.2.3.2-5
Genotoxicity								
No studies performed								
Carcinogenicity								
No studies performed								
Reproductive and								

Type of study	Species and strain	Route of administration	Duration of dosing	Doses tested (NOAEL[a]) (IU/kg/dose)	GLP (Yes/No)	Study ID	Testing facility	Location in CTD
developmental toxicity No studies performed								
Local tolerance Local tolerance study	Rabbit (New Zealand White)	i.a., i.v., perivenous	Single dose	0 and 0.15 mL	Yes	211273	CiToxLAB Scantox A/S, DK	4.2.3.6-1
2-week repeat-dose toxicity study	Rat (HsdHan™:WIST)	i.v.	2 weeks with an additional 4-week arm	0, 100, 500, 2500 every 2nd for 2 weeks, 2500 for 4 weeks	Yes	209355 (part of repeat-dose toxicity study)	Covance, Harrogate, UK	4.2.3.2-1
26-week repeat-dose toxicity study	Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	26 weeks	0, 50, 150, 500, 1200 every 4th day	Yes	212512 (part of repeat-dose toxicity study)	Envigo[b], UK	4.2.3.2-2
52-week repeat-dose toxicity study	Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	52 weeks	0, 50, 150, 500, 1200 every 4th day	Yes	213109 (part of repeat-dose toxicity study)	Envigo[b], UK	4.2.3.2-3
2-week repeat-dose toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis)*	i.v.	2 weeks	0, 100, 500, 2500 every 3rd day	Yes	209350 (part of repeat-dose toxicity study)	Covance, Harrogate, UK	4.2.3.2-5
Other toxicity studies ***Immunogenicity*** Pharmacokinetic and immunogenicity study	Rat (Wistar)	i.v.	4 weeks	250 twice weekly	No	[redacted] (part of absorption study)	Novo Nordisk, DK	4.2.2.2-6
Pharmacokinetic and	Cynomolgus monkey	i.v.	4 weeks	250 twice	No	[redacted] (part of	Covance,	4.2.2.2-8

Type of study	Species and strain	Route of administration	Duration of dosing	Doses tested (NOAEL[a]) (IU/kg/dose)	GLP (Yes/No)	Study ID	Testing facility	Location in CTD
immunogenicity study	(*Macaca fascicularis)*			weekly		absorption study)	Harrogate, UK	
Pharmacokinetic and immunogenicity study	Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	6 weeks	0, 50, 1500 twice weekly	No	212142 (part of absorption study)	Envigo[b], UK	4.2.2.2-7
Studies supporting optimised manufacturing process								
Comparative pharmacodynamics	F8-KO mouse (B6.129S4_F8tm1Kaz/J)	i.v.	Single dose	0.25, 1, 4	No	[redacted]	Novo Nordisk, DK	4.2.3.7.7-2
Comparative pharmacokinetics	F8-KO mouse (B6.129S4_F8tm1Kaz/J)	i.v.	Single dose	140	No	[redacted]	Novo Nordisk, DK	4.2.3.7.7-3
Comparative immunogenicity	Rabbit (New Zealand White)	i.v.	8 weeks	50 twice weekly	No	[redacted]	Novo Nordisk, DK	4.2.3.7.7-4

[a]The highest NOAEL is underlined. [b]Huntingdon Life Sciences has changed name to Envigo.

Abbreviations: F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; GLP = Good Laboratory Practice; i.a. = intra-arterial(-ly); i.v. = intravenous(-ly); NOAEL = no observed adverse effect level.

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験の一覧表

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (IU/kg/dose)	GLP compliance	Study ID	Location in CTD
Repeat-dose toxicity (2 weeks)	Male and female Wistar rats	i.v.	0, 100, 500, 2500 every 2nd day	Yes	209355	4.2.3.2-1
Repeat-dose toxicity (26 weeks)	Male and female Rowett nude rats (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	0, 50, 150, 500, 1200 every 4th day	Yes	212512	4.2.3.2-2
Repeat-dose toxicity (52 weeks)	Male and female Rowett nude rats (Crl:NIH-*Foxn*^{rnu})	i.v.	0, 50, 150, 500, 1200 every 4th day	Yes	213109	4.2.3.2-3
Repeat-dose toxicity (2 weeks)	Male cynomolgus monkeys	i.v.	0, 100, 500, 2500 every 3rd day	Yes	209350	4.2.3.2-5

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; i.v. = intravenous(-ly).

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験成績の一覧

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Species (strain)	Study length/ Tau[c]	Dose (IU/kg)	C_{max} (IU/mL)		AUC_{0-24h} (h*IU/mL)		C_{max} ratio[a]		AUC ratio[a]		Study ID
			M	F	M	F	M	F	M	F	
Rat (Wistar)	2 weeks/48h	*Week 1*									209355
		500	15.2	16.2	49.4	149	11	12	1.4	4.2	
		2500	89.5	72.3	725	381	66	53	20	11	
Rat (Rowett nude)	26 weeks/96h	*Week 1*									212512
		500	11.0	9.62	NC	NC	8.1	7.1	NC	NC	
		1200	25.3	15.3	371	81.4	19	11.3	10	2.3	
		Week 26									
		500	12.5	NC	111	NC	9.2	NC	3.1	NC	
		1200	23.2	14.3	356	205	17	11	10	5.8	
Rat (Rowett nude)	52 weeks/96h	*Week 1*									213109
		500	17.5	18.2	152	77.7	13	13	4.3	2.2	
		1200	43.6	28.0	453	292	12	21	32	8.2	
		Week 52									
		500	15.2	17.1	188	321	11	12.6	5.3	9.0	
		1200	36.3	31.4	438	250	27	23	12	7.0	
Monkey (cynomolgus)	2 weeks/72h	*Week 1*									209350
		500	10.2	N/A	158[b]	N/A	7.5	N/A	4.4	N/A	
		2500	36.8	N/A	904[b]	N/A	27	N/A	25	N/A	

[a]Ratio of reported C_{max} and AUC from male animals as listed in Nonclinical Summary 2.6.4, Table 12 against human C_{max}=1.358 IU/mL and AUC_{0-inf}=35.57 h*IU/mL (Phase 3, trial 3859, visit 7 [day 28 ± 1 week], FVIII chromogenic activity with product-specific calibrator). [b]AUC_{0-72h}. [c]Dosing interval.

Abbreviations: AUC/AUC_{0-inf} = area under the curve from time zero to infinity; AUC_{0-24} = area under the curve from time zero to 24 h; AUC_{0-72} = area under the curve from time zero to 72 h; C_{max} = maximum concentration; F = female(s); FVIII = coagulation factor eight; M = male(s); N/A = not applicable; NC = not calculable; Tau = dosing interval.

2.6.7.4 毒性試験：使用バッチ

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

2.6.7.4.A 非臨床試験に用いた被験物質（バッチ毎）一覧

Batch	API batch no.	Study ID	Type of study	Other use of API batch[b]
[redacted]	[redacted]	212344	Single-dose, rat	Clinical trials Stability studies Setting specifications
		211273	Local tolerance, rabbit	
		212142	PK and immunogenicity, rat	
		209355	2-week repeat-dose toxicity, rat	Only used nonclinical
		209350	2-week repeat-dose toxicity, monkey	
		209355	2-week repeat-dose toxicity, rat	
		212512	26-week repeat-dose toxicity, rat	Clinical trials Stability studies Setting specifications
		213109	52-week repeat-dose toxicity, rat (batch used in weeks 1−50)	
		213109	52-week repeat-dose toxicity, rat (batch used in weeks 51−52)	Clinical trials Stability studies Setting specifications
		[redacted]	PK and immunogenicity, rat	Only used nonclinical
			PK and immunogenicity, monkey	
			Comparative PD, F8-KO mouse	Clinical trials, Process justification Stability studies Setting specifications
			Comparative PK, F8-KO mouse	
			Comparative PD, F8-KO mouse	Clinical trials Stability studies Setting specifications
			Comparative PK, F8-KO mouse	
			Comparative immunogenicity, rabbit	N8 intermediate before change
			Comparative immunogenicity,	N8 intermediate after change

00434858 20

Batch	API batch no.	Study ID	Type of study	Other use of API batch[b]
			rabbit	

[a]DS batch provided for study, formulated on site prior to dosing animals [b]Further details can be found in 3.2.S.2.6 Manufacturing Process Development.

Abbreviations: DS = drug product; DS = drug substance; F8-KO = coagulation factor eight gene knockout; N/A = not applicable; PD = pharmacodynamic(-s); PK = pharmacokinetic(-s).

2.6.7.4.B 重要な毒性試験及び[redacted]実生産工程製剤への製造変更を支持する試験で使用された各非臨床試験バッチにおける原薬の目的物質由来不純物、提案する有効期間内規格及び含有量

	Analytical method	Drug substance acceptance criteria[a]	Content batch	Content batch	Content batch	Content batch	Content batch	Content batch
			[redacted]					
HCP (ppm)	Y9-442	[redacted]						[b]
[redacted] leakage (ppm)	Y9-443							
*不純物4 (ppm)	M105							
*不純物5 (ppm)	M086							
*不純物6 (ppm)	M049							

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

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

*新薬承認情報提供時に置き換え

2.6.7.4.C 重要な毒性試験及び[redacted]実生産工程製剤への製造変更を支持する試験で使用された各非臨床試験バッチにおける製剤の目的物質由来不純物、提案する有効期間内規格及び含有量

Product-related impurity	Analytical method	DP release limits[a]	DP EOSL specification[a]	Content batch [redacted][d]	Content batch [redacted][d]	Content batch [redacted]	Content batch [redacted]	Content batch [redacted][b]	Content batch [redacted][b]
Purity (%)	[redacted]	[redacted]		[redacted]		[redacted]			
*不純物2 (%)				[redacted][c]	-				
*不純物1 (%)				-	-				

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

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

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Species/Strain	Method of administration (vehicle/formulation)	Doses (IU/kg)	Gender and no. per group	Observed maximum non-lethal dose (IU/kg)	Approximate lethal dose (IU/kg)	Noteworthy findings	Study ID
Rat/Wistar Hannover GALAS	i.v. (Composition of vehicle: $CaCl_2$, H_2O:1.0 mg/mL; L-histidine: 6.0 mg/mL; polysorbate 80: 0.4 mg/mL; sucrose: 12 mg/mL; sodium chloride: 36 mg/mL; L-methionine: 0.22 mg/mL, pH 6.9/2000 IU/mL N8-GP in same vehicle composition after reconstitution in 1 mL NaCl)	0, 20000, 25000	Males, 4 groups with 3 animals in each group	25000	N/A	There was a marked body weight gain in group 4 (25000 IU/kg), which was considered not to be of toxicological significance. A large pulmonary thrombus was under organisation in one animal dosed with 20000 IU/kg N8-GP. This finding was considered due to experimental procedure (injection in a tail vein) or to exaggerated pharmacological effect of N8-GP.	212344

Abbreviations: N/A = not applicable.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed as all repeat-dose studies are considered pivotal.

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

2.6.7.7.A ラットにおける 2 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 209355）

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

Study ID: 209355

Species/Strain: Rat/HsdHan™:WIST	**Duration of dosing:** Groups 1−4: 13 days (Once every alternate day) Group 5: 27 days (Once every alternate day)	**Location in CTD:** 4.2.3.2-1
Initial age: Approximately 10 weeks old	**Duration of postdose:** 3 weeks	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: 20 October 2009	**Method of administration:** Intravenously via a motorised syringe/infusion pump	
	Vehicle/Formulation: $CaCl_2$ $2H_2O$ (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)/N8-GP 449 IU/mL	

Parameters collected:
Clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmologic examination, haematology, coagulation, clinical chemistry, organ weights, macroscopic and microscopic examinations, toxicokinetic evaluation and antibody analysis.

Special features:
An additional high dose group (4-week arm, group 5) was incorporated into the study design and was dosed once every alternate day for a total of 14 administrations. The main purpose of the 4-week arm was to assess the immunogenicity of the compound and to evaluate if longer-term studies are feasible in the rat.
[a]After completion of the original study, a further five (5) animals per sex (additional toxicity cohorts) were included at each dose level (dose groups 1−4) to primarily enable the collection and evaluations of clinical chemistry parameters.

No observed adverse effect level: 2500 IU/kg/dose

Brief conclusion:

Intravenous administration of N8-GP to rats at 100, 500 or 2500 IU/kg/dose was well tolerated with no evidence of local or systemic toxicity. There were minor disturbances in coagulation parameters (prothrombin time [PT] and activated partial thromboplastin time [APTT]) and in haematology parameters (red cell mass parameters and absolute reticulocytes) which were of low magnitude and not considered to be adverse. No N8-GP-related effects were seen on any other in-life parameter, organ weights, macroscopic or microscopic pathology. Neutralising antibodies developed in the majority of animals at all dose levels following treatment. After multiple dosing, exposure generally decreased over time due to development of neutralising antibodies. On day 7, approximately half of the animals at the intermediate and high dose levels showed exposure to N8-GP, while on day 13 exposure could only be confirmed for three out of 30 animals at 500 IU/kg. On day 27, exposure was only observed in one out of 30 animals.

Due to neutralising antibody formation and a decrease in exposure, it was concluded that a study of longer than 14 days of duration would not give any meaningful results. No findings apart from antibody development towards N8-GP were detected in this study, and the NOAEL was considered to be 2500 IU/kg/dose.

Daily dose (IU/kg/dose)	0 (Control)		100 (Low)		500 (Intermediate)		2500 (High I)		2500 (High II)	
Number of toxicity animals[a]	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Number of treatment-free animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Number of toxicokinetic animals	**M: 12**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 18**	**M: 15**	**F: 18**	**M: 15**	**F: 18**	**M: 15**	**F: 18**
Toxicokinetics										
Day 1										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	15.2	16.2	89.5	72.3	53.7	61.7
AUC_{0-24h} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	49.4	149	725	381	721	563
$t_{½}$ (h)	-	-	NC	NC	NC	22.5	12.4	7.35	11.6	9.16
Day 13										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	7.91	NC	33.5	12.1	N/A	N/A
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	98.6	NC	N/A	N/A
Day 27										
C_{max} (IU/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	13.0
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	-	-	-	-	-	-	NC	4.87
No. of antibody positive out of total										
Day – 7	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Day 14	0/5	0/5	2/5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	NR	NR
Day 28	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5
Day 35	0/5	0/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
Day 49	-	-	-	-	-	-	-	-	5/5	5/5
Total	0/10	0/10	7/10	9/10	9/10	9/10	10/10	10/10	10/10	10/10
No. of neutralising antibody out of total with antibodies	-	-	6/7	8/9	9/9	9/9	10/10	8/10	10/10	9/10

Daily dose (IU/kg/dose)	0 (Control)		100 (Low)		500 (Intermediate)		2500 (High I)		2500 (High II)	
Number of toxicity animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Number of treatment-free animals	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**	**M: 5**	**F: 5**
Number of toxicokinetic animals	**M: 12**	**F: 15**	**M: 15**	**F: 18**	**M: 15**	**F: 18**	**M: 15**	**F: 18**	**M: 15**	**F: 18**
Noteworthy findings (toxicity animals)										
Coagulation										
Prothrombin time PT (s, % change from control)										
Day 14	10.8	9.0	-7	+9	-8*	+1	-13***	+3	-	-
Day 35 (Recovery)	10.9	9.2	-3	+1	-6	-2	-6	-1	-	-
APTT (s, % change from controls)										
Day 14	15.9	13.5	-18	+10	-13	+6	-12	+2	-	-
Day 35 (+ 3 weeks off treatment)	18.5	12.8	-5	+24	-6	+11	-4	+30*	-	-
Haematology (% change from control)										
Day 14										
Mean platelet volume (MPV, fl)	9.2	9.0	9*	4	2	6	5	9	-	-
Platelet distribution width, (PDW, %)	49.8	47.9	5*	8	4	9	10***	13	-	-
Day 35 (+ 3 weeks off treatment)										
Mean cell volume (MCV, fl)	52.5	52.9	-5*	-1	-2	-1	-1	1	-	-
Mean platelet volume (MPV, fl)	9.8	9.6	1	2	-2	1	0	4	-	-
Platelet distribution width, (PDW, %)	51.3	49.5	4	3	-4	5	-1	4	-	-

[a]After completion of the original study, a further five (5) animals per sex (additional toxicity cohorts) were included at each dose level to primarily enable the collection and evaluations of clinical chemistry parameters.

* $p<0.05$. ** $p<0.01$. *** $p<0.001$.

Abbreviations: (-) = not reported/measured; F = female(s); M = male(s); NC = not calculable.

2.6.7.7.B ラットにおける 26 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 212512）

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

Study ID: 212512

Species/Strain: Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})	**Duration of dosing:** 26 weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2-2
Initial age: 7−11 weeks old	**Duration of postdose:** 26 weeks	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: Males: 22 April 2013 Females: 29 April 2013	**Method of administration:** Intravenous injection (bolus)	
	Vehicle/Formulation: $CaCl_2$ $2H_2O$ (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)	
Parameters collected: Anti-drug antibody analysis, toxicokinetics, body weight, food consumption, clinical observations, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, urinalysis, organ weights, macroscopic and microscopic examinations.		
Special features: Immunohistochemical staining of the brain tissues (incl. choroid plexus) for the presence of polyethylene glycol (PEG).		
No observed adverse effect level: 1200 IU/kg/dose		
Brief conclusion: Intravenous administration every 4th day of N8-GP to Rowett Nude rats (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) for 26 weeks did not result in adverse findings. There was no treatment-related effect on clinical appearance, mortality, body weight, food consumption, ophthalmoscopy, organ weights, macroscopic and microscopic pathology. An expected (pharmacology) shortening of the activated thromboplastin time (APTT) at all dose levels were seen in all animals. There were no other treatment-related effects on haematology, clinical chemistry or urine analysis. All other inter-group differences were minor, lacked dose-relationship, were only observed in a single sex or were inconsistent between investigations and were therefore considered within normal biological variation. Treatment resulted in anti-drug antibody formation in five animals from the three lower dose groups. Exposure above lower limit of quantification (LLOQ) was verified in the majority of the animals given 1200 IU/kg/dose and in approximately half of the animals receiving 500 IU/kg/dose, but because of the high LLOQ in the assay (due to matrix interference and high endogenous FVIII activity) exposure could not be verified in animals given 50 and 150 IU/kg/dose. Immunohistochemical staining showed that PEG was not detected in the brain tissue (including the choroid plexus) or in blood in the brain blood vessels. Eleven unscheduled deaths occurred during the study. The majority of these deaths appeared to be related to non-specific inflammatory processes, and therefore consistent with findings expected in an animal deficient in T-cells. The deaths were equally distributed in control and treated groups and consequently considered incidental and not treatment-related. As could be expected in an immune compromised rat, a number of incidental tumours were seen across dose groups including control group.		

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		50 (Low)		150 (Intermediate)		500 (High I)		1200 (High II)	
Number of toxicity animals **Number of treatment-free animals (recovery)**	**M: 18** **M: 9**	**F: 18** **F: 9**	**M: 18** **M: 0**	**F: 18** **F: 0**	**M: 18** **M: 0**	**F: 18** **F: 0**	**M: 18** **M: 0**	**F: 18** **F: 0**	**M: 18** **M: 9**	**F: 18** **F: 9**
Toxicokinetics										
Week 1										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	11.0	9.62	25.3	15.3
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	NC	NC	371	81
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	80.0	9.00	371	47
Week 26										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	12.5	NC	23.2	14.3
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	111.0	NC	356	205
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	38.0	NC	356	130
Noteworthy findings										
Died or sacrificed moribund[a]	0	3	0	0	2	2	0	1	3	0
No. of animals with tumours	**1**	**2**	**1**	**0**	**0**	**1**	**0**	**0**	**0**	**1**
Brain malign-astrocytoma	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Brain benign-hemangioma (meninges)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Adrenal benign-adenoma, cortical	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Mammary gland, malign-adenocarcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Ovary, benign-lutemoma	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Hemapoietic system, malign-lymphoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Antibody analysis										
26 week										
Number evaluated	0	0	18	18	18	16	18	17	16	18
Screening positive	-	-	1	1	1	0	0	2	0	0

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		50 (Low)		150 (Intermediate)		500 (High I)		1200 (High II)	
Number of toxicity animals Number of treatment-free animals (recovery)	**M: 18 M: 9**	**F: 18 F: 9**	**M: 18 M: 0**	**F: 18 F: 0**	**M: 18 M: 0**	**F: 18 F: 0**	**M: 18 M: 0**	**F: 18 F: 0**	**M: 18 M: 9**	**F: 18 F: 9**
Recovery										
Number evaluated	0	0	-	-	-	-	-	-	9	9
Screening positive	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
Haematology										
APTT (s, % change from control)										
Week 13	16.0	15.5	-13**	+1	-17**	-2	-19**	-6	-30**	-13**
Week 26	18.1	17.1	-3	-6	-13**	-14**	-22**	-16*	-30**	-2
Recovery	13.8	16.7	-	-	-	-	-	-	-9	0

[a]None of the unscheduled deaths were considered treatment-related. The majority of findings (agonal changes excluded) in these animals appeared to be related to non-specific inflammatory processes and was therefore consistent with findings expected in an animal deficient in T-cells. Anti-drug antibody positive animals excluded.
*p<0.05. **p<0.01.
Abbreviations: (-) = not measured; F = female(s); M = male(s); NC = not calculable.

2.6.7.7.C ラットにおける 52 週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 213109）

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

Study ID: 213109

Species/Strain: Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})	**Duration of dosing:** 52 weeks	**Location in CTD:** 4.2.3.2-3
Initial age: Males: 8−15 weeks old Females: 9−16 weeks old	**Duration of postdose:** 12 weeks	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: Males: 22 May 2013 Females: 29 May 2013	**Method of administration:** Intravenous injection (bolus)	
	Vehicle/Formulation: $CaCl_2$ $2H_2O$ (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)	

Parameters collected: Body weight (%), food consumption (%), clinical observations, ophthalmoscopy, haematology, clinical chemistry, coagulation analysis, urinalysis, toxicokinetics, antibody analysis, organ weights (%), macroscopic and microscopic examinations.

Special features: Immunohistochemistry staining of the brain for the presence of polyethylene glycol (PEG). Measurement of PEG concentration in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) by nuclear magnetic resonance (NMR) (Study 301333 [M 4.2.3.2]).

No observed adverse effect level: 1200 IU/kg/dose

Brief conclusion: In conclusion, intravenous administration every 4th day of N8-GP to Rowett Nude rats (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu}) for 52 weeks did not result in adverse findings. Immunohistochemical staining showed that PEG was not detected in the brain tissue (including the choroid plexus) or in blood in the brain blood vessels. 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. A number (44 out of 258) of unscheduled deaths occurred during the study but the distribution amongst the groups did not indicate a treatment-related effect as the majority of deaths appeared to be related to non-specific inflammatory processes and tumour development consistent with findings expected in an animal deficient in T-cells. Treatment resulted in anti-drug antibody formation in only a very small number of animals across all dose levels. Exposure above LLOQ was verified in the majority of the animals given 500 and 1200 IU/kg/dose, but because of the high LLOQ in the assay (due to matrix interference and high endogenous FVIII activity) exposure could not be verified in animals given 50 and 150 IU/kg/4th day. Shortening of the activated partial thromboplastin time was present in males and females receiving 500 and 1200 IU/kg/dose confirming a pharmacological effect and thus exposure.

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		50		150		500		1200	
Number of toxicity animals	**M: 21**	**F: 21**	**M: 21**	**F: 21**	**M: 21**	**F: 21**	**M: 21**	**F: 21**	**M: 21**	**F: 21**
Number of treatment-free animals	**M: 12**	**F: 12**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 0**	**F: 0**	**M: 12**	**F: 12**
Toxicokinetics										
Week 1										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	17.5	18.2	43.6	28.0
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	152	78	453	292
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	105	42	252	223
Week 26										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	12.7	NC	31.6	14.1
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	169	NC	400	255
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	103	NC	400	153
Week 52										
C_{max} (IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	15.2	17.1	36.3	31.4
$AUC_{0\text{-}24h}$ (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	188	321	438	250
AUC_{last} (h*IU/mL)	-	-	NC	NC	NC	NC	112	58	438	193
Noteworthy findings										
Antibody analysis										
Week 26										
Number evaluated	0	0	21	21	19	21	19	19	20	19
Screening positive	-	-	1	2	0	1	0	0	2	0
Week 52										
Number evaluated	0	0	16	20	14	21	19	15	17	18
Screening positive	-	-	0	2	0	0	0	1	1	0
Recovery phase week 2										
Number evaluated	0	0	-	-	-	-	-	-	12	12
Screening positive	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		50		150		500		1200	
Number of toxicity animals **Number of treatment-free animals**	**M: 21** **M: 12**	**F: 21** **F: 12**	**M: 21** **M: 0**	**F: 21** **F: 0**	**M: 21** **M: 0**	**F: 21** **F: 0**	**M: 21** **M: 0**	**F: 21** **F: 0**	**M: 21** **M: 12**	**F: 21** **F: 12**
Died or sacrificed moribund	**9**	**4**	**5**	**1**	**7**	**0**	**2**	**6**	**5**	**5**
No. of animals with tumours	**0**	**8**	**4**	**4**	**4**	**0**	**0**	**0**	**1**	**5**
Brain, malignant sarcoma	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Brain, malignant oligodenroglioma	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Skin, malignant sarcoma	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Haemapoietic system, malignant lymphoma	0	0	3	0	2	0	0	0	0	0
Esophagus, malignant squamous cell carcinoma	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Tongue, malignant squamous cell carcinoma	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Thyroid, benign follicular cell adenoma	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Thyroid, benign c-cell adenoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Adrenal, benign pheochromocytoma	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Pituitary, benign adenoma pars distalis	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Ovary, benign granular cell tumour	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Uterus, benign endometrial polyp	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
Mammary gland, benign firboadenoma	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Ear, benign melanoma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<u>Haematology (% deviation from control)</u>										
Activated partial thromboplastin time(s)[a]										
Week 13	16.9	16.8	-1	-2	-7	-8*	-27**	-16**	-38**	-26**
Week 30	15.6	17.5	9	14	-3	-6	-13**	-18**	-29**	-27**
Week 48	16.5	17.8	5	-3	-9	-8*	-29**	-13**	-33**	-26**

Daily dose (IU/kg)	0 (Control)		50		150		500		1200	
Number of toxicity animals **Number of treatment-free animals**	**M: 21** **M: 12**	**F: 21** **F: 12**	**M: 21** **M: 0**	**F: 21** **F: 0**	**M: 21** **M: 0**	**F: 21** **F: 0**	**M: 21** **M: 0**	**F: 21** **F: 0**	**M: 21** **M: 12**	**F: 21** **F: 12**
Recovery	16.3	15.7	-	-	-	-	-	-	+10*	+13**
Clinical chemistry (% deviation from control)										
Urea										
Week 13	6.95	6.89	+9	+11*	+4	+16**	+8	+21**	+6	+17**
Week 30	6.78	6.63	-1	-3	+5	+1	+7	+9	+5	+17**
Week 48	7.64	7.31	-10	+3	-7	+9	-3	+11*	-7	+23
Recovery	6.76	7.71	-	-	-	-	-	-	+6	+26
Creatine kinase (U/L)										
Week 13	90	108	+14	-18	-3	-7	+16	-6	+29*	-9
Week 30	82	104	+15	-9	+10	-9	+10	-4	+18	+15
Week 48	84	116	-12	-2	0	-3	-19	+7	-6	+6
Recovery	160	80	-	-	-	-	-	-	-32	+4
Phosphorus (mmol/L)										
Week 13	1.37	1.39	-3	-3	-5	-14**	-5	-16**	-9**	-18**
Week 30	1.25	1.27	-10	-2	-9	-7	-13	-3	-5*	-11*
Week 48	1.18	1.27	0	-6	-3	0	-4	-2	-6	-6
Recovery	1.28	1.12	-	-	-	-	-	-	-2	+9

[a]Excluding antibody-positive animals.
*p<0.05. ** p<0.01.
Abbreviations: (-) = not measured or not applicable; F = female(s); M = male(s); NC = not calculable.

2.6.7.7.D　カニクイザルにおける２週間反復静脈内投与毒性試験（試験番号 209350）

Report title: 14 day intravenous (infusion) administration toxicity study in the monkey followed by a 4 week treatment-free period　**Study ID:** 209350

Species/Strain: Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	**Duration of dosing:** 14 days (at three day intervals for a total of five administrations)	**Location in CTD:** 4.2.3.2-5
Initial age: 106−163 weeks	**Duration of postdose:** 4 weeks	**GLP compliance:** Yes
Date of first dose: 28 October 2009	**Method of administration:** Intravenously via a motorised syringe/infusion pump	
	Vehicle/Formulation: $CaCl_2$ $2H_2O$ (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)	

Parameters collected:
Clinical observations, body weight, food consumption (qualitative assessment), ophthalmologic examination, respiratory rate and depth measurement, electrocardiogram and blood pressure evaluation, rectal temperature, neurological/CNS end points, haematology, coagulation including fibrinogen, d-dimer and thrombin-antithrombin (TAT) levels, clinical chemistry, organ weights, macroscopic and microscopic examinations, blood sampling for toxicokinetic evaluation and antibody analysis

Special features: Only male animals used on study

No observed adverse effect level: 2500 IU/kg/dose

Brief conclusion:
Intravenous administration of N8-GP doses of 100, 500 and 2500 IU/kg/dose gave rise to the development of neutralising antibodies against N8-GP. The antibodies were detected from day 17 onwards and were considered to be cross-reactive to endogenous FVIII in cynomolgus monkeys, resulting in bleeding tendencies in animals from all dose groups. One animal, previously administered 2500 IU/kg/dose, was euthanised during the treatment-free phase of the study due to extensive skeletal muscle and subcutaneous haemorrhage. Systemic exposure could only be generally observed up to and including day 10 in animals dosed 500 or 2500 IU/kg/dose. On day 13, exposure above LLOQ could only be confirmed for a few animals. Based on the absence of adverse events not related to neutralising antibodies, the NOAEL for non-immunogenic effects of N8-GP was considered to be 2500 IU/kg/dose.

Daily dose (IU/kg/dose)		0 (Control)	100 (Low)	500 (Intermediate)	2500 (High)
Number of animals		**M: 5**	**M: 8**	**M: 8**	**M: 8**
Toxicokinetics					
Day 1					
C_{max} (IU/mL)		NR	NC	10.2	36.8
AUC_{0-72h} (h*IU/mL)		NR	NC	158	904
t½ (h)		NR	NC	39.8	32.4
Day 13					
C_{max} (IU/mL)		NR	NC	10.4	15.7
AUC_{0-72h} (h*IU/mL)		NR	NC	75.6	25.0
t½ (h)		NR	NC	24.9	2.26
Main phase					
Noteworthy findings					
Died or sacrificed moribund		0	0	0	0
Clinical signs		Bruising, to the body, chest, arms or scrotum, was noted in two animals given 2500 IU/kg/dose (28M and 29M) from day 18 onwards and was associated with impaired mobility or subcutaneous swelling at the site of venepuncture.			
Haematology:					
Reticulocytes (%)	**Day-12**	0.4	0.3	0.4	0.3
	Day 17	1.0	1.0 DR*	1.2 DR*	2.3 DR*
Absolute reticulocytes (10^9/L)	**Day-12**	29.6	23.4	24.7	21.7
	Day 17	51.4	55.7 DR*	64.6 DR*	103.9 DR*
White blood cell count (10^9/L)	**Day -12**	14.1	12.8	13.2	11.3
	Day 17	8.9	12.7	15.0*	12.0
Main phase (cont.)					
Haematology (cont.)					
Neutrophil count (10^9/L)	**Day -12**	7.6	8.3	8.8	6.6
	Day 17	3.5	6.8	10.4**	7.3

Daily dose (IU/kg/dose)		0 (Control)	100 (Low)	500 (Intermediate)	2500 (High)
Number of animals		**M: 5**	**M: 8**	**M: 8**	**M: 8**
Coagulation:					
Activated partial thromboplastin times (s)					
Pre-treatment	**prior to dosing**	19.1	18.8	19.9	21.5
Day 1	**6 hours post-dose**	18.9	17.4*	15.1***	13.0***
Day 4	**prior to dosing**	18.5	17.9	17.8	16.3
	6 hours post-dose	18.4	17.2	15.0***	13.8***
Day 7	**prior to dosing**	18.0	18.6	17.9	17.3
	6 hours post-dose	19.5	18.1	15.4***	13.3***
Day 10	**prior to dosing**	18.4	17.8	16.9	16.9
	6 hours post-dose	19.1	17.8	15.0**	14.9**
Day 13	**prior to dosing**	18.6	18.6	22.2	26.2
	6 hours post-dose	18.9	17.6	21.0	27.6***
Antibody analysis:					
Day 17					
Number evaluated		5	5	5	5
Screening positive		0	2	5	5
Number evaluated		0	2	5	5
Neutralising positive		N/A	0	5	5

Daily dose (IU/kg/dose)		0 (Control)	100 (Low)	500 (Intermediate)	2500 (High)
Number of animals		**M: 5**	**M: 8**	**M: 8**	**M: 8**
Main phase (cont.)					
Gross pathology:					
Number examined		5	5	5	5
Skin and subcutis	**Red**	0	0	1	0
	Dark	0	1	0	1
Adrenal	**Soft**	0	0	0	1
Histopathology:					
Number examined		5	5	5	5
Skin and subcutis					
	Not remarkable	5	4	4	4
	Haemorrhage				
	Slight	0	0	1	0
	Moderate	0	1	0	1
Inguinal lymph node					
	Haemorrhage				
	Moderate	0	1	0	1
Adrenal					
	Haemangiectasis (unilateral lesion)				
	Moderate	0	0	0	1

Daily dose (IU/kg/dose)		0 (Control)	100 (Low)	500 (Intermediate)	2500 (High)
Number of animals		**M: 0**	**M: 3**	**M: 3**	**M: 3**
Noteworthy findings					
Died or sacrificed moribund		0	0	0	1 (week 3, day 18)
Haematology:					
Reticulocytes (%)	**Day 45**	N/A	0.4	0.3	0.4
Absolute reticulocytes (10^9/L)	**Day 45**	N/A	24.4	20.7	22.8
White blood cell count (10^9/L)	**Day 45**	N/A	10.3	12.9	7.4
Neutrophil count (10^9/L)	**Day 45**	N/A	7.4	7.3	3.6
Coagulation:					
Activated partial thromboplastin times (s)					
Day 45		N/A	22.1	38.8	31.5
Antibody analysis:					
Day 17					
Number evaluated		N/A	3	3	3
Screening positive		N/A	2	2	3
Number evaluated		N/A	2	2	3
Neutralising positive		N/A	2	2	3

Daily dose (IU/kg/dose)		0 (Control)	100 (Low)	500 (Intermediate)	2500 (High)
Number of animals		**M: 0**	**M: 3**	**M: 3**	**M: 3**
Recovery study (cont.)					
Antibody analysis (cont.):					
Day 28					
Number evaluated		N/A	3	3	2
Screening positive		N/A	3	3	2
Number evaluated		N/A	3	3	2
Neutralising positive		N/A	3	2	2
Day 45					
Number evaluated		N/A	3	3	2
Screening positive		N/A	3	3	2
Number evaluated		N/A	3	3	2
Neutralising positive		N/A	3	3	2
Gross pathology:					
Number examined		N/A	3	3	2
Inguinal lymph node	**Large**	N/A	0	0	1
Histopathology:					
Number examined		N/A	3	3	2
Inguinal lymph node					
	Haematoma				
	Present	N/A	0	0	1

Daily dose (IU/kg/dose)		0 (Control)	100 (Low)	500 (Intermediate)	2500 (High)
Number of animals		**M: 0**	**M: 0**	**M: 0**	**M: 1**
Decedents					
Gross pathology:					
Number examined		0	0	0	1
Skin and subcutis	**Red**	0	0	0	1
Muscle	**Thick**	0	0	0	1
	Red	0	0	0	1
	Gelatinous	0	0	0	1
Histopathology:					
Number examined		0	0	0	1
Skin and subcutis					
	Haemorrhage				
	Moderate	0	0	0	1
Muscle					
	Haemorrhage				
	Moderately severe	0	0	0	1

*p<0.05. **p<0.01. ***p<0.001.

Abbreviations: DR = significant dose response test; M = male(s); N/A = not applicable; NC = not calculable; NR = not reported.

2.6.7.8 遺伝毒性試験：*in vitro*

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.5.

2.6.7.9 遺伝毒性試験：*in vivo*

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.5.

2.6.7.10 がん原性試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

No studies performed, justification provided in Nonclinical Overview 2.4, Section 2.4.4.6.

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

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

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

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

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

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児の発生に関する試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

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

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

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

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

00434858 20

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

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

2.6.7.16 局所刺激性試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Species/Strain	Method of administration	Doses (IU/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
Rabbit/New Zealand White	A single dose given by perivenous (group 1), intravenous (group 2 or intra-arterial (group 3) injection in the right ear (test item) and in the left ear (placebo) four days before sacrifice.	Right ear: 0.15 mL test item (500 IU/mL in clinical formulation: L-histidine 1.5 mg/mL; sucrose 3 mg/mL, Polysorbate 80 0.1 mg/mL; sodium chloride 18 mg/mL, L-methionine 0.055 mg/mL; calcium chloride dehydrate 0.25 mg/mL) Left ear: 0.15 mL placebo (0 IU/mL, sodium chloride 0.9%)	4M	No signs of treatment-related local clinical reactions occurred either by perivenous, intravenous or intra-arterial administration of N8-GP. The injections caused minor histopathological changes, mainly due to inflammatory changes and haemorrhage at the injection sites.	211273
Rat/HsdHan™:WIST	i.v.	0, 100, 500, 2500	5M+5F	There were no microscopic findings at the injection site related to N8-GP, and the injection sites of the high dose group (2500 IU/kg every 2nd day) were generally comparable with the control group.	209355 (part of repeat-dose toxicity study)

Species/Strain	Method of administration	Doses (IU/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})	i.v.	0, 50, 150, 500, 1200	18M+18F (+ 9M and 9F included in a treatment-free group for 0 and 1200 IU/kg)	Injection site reactions observed during the study included reddening or orange colouration of the tail, swelling, eschar, erythema, bruising, desquamation, erosion and/or ulceration, raised area and dry or wet abrasions of the tail. These reactions were seen across all dose groups including control. At the microscopic evaluation, the injection site reactions of the tail were also seen both in control and treated animals at low incidence and were generally judged as minimal to slight. These reactions were considered related to the intravenous administration procedure and not considered related to treatment with N8-GP.	212512 (part of repeat-dose toxicity study)
Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})	i.v.	0, 50, 150, 500, 1200	21M+21F (+ 12M and 12F included in a treatment-free group for 0 and 1200 IU/kg)	Injection site reactions observed during the study included reddening of the tail, dark colouration of the tail, swelling, thickening, eschar, erythema, bruising, desquamation/sloughing, raised areas and dry or wet abrasion of the tail. These reactions were seen across all dose groups including control and were therefore considered related to the repeated intravenous injection procedure or vehicle and not to N8-GP. At the microscopic evaluation, the injection site reactions of the tail were also seen in both control and treated animals at low incidence and were generally judged as minimal to slight. These reactions were considered related to the intravenous administration procedure and not considered related to treatment with N8-GP.	213109 (part of repeat-dose toxicity study)
Cynomolgus monkey/ *Macaca fascicularis*	i.v.	0, 100, 500, 2500	8M	Except for haemorrhages in relation to handling and sampling procedure in animals with acquired haemophilia, microscopic findings at the injection sites of the high dose group were generally comparable to controls.	209350 (part of repeat-dose toxicity study)

Abbreviations: F = female(-s); i.v. = intravenous(-ly); M = male(-s).

2.6.7.17 その他の毒性試験

Test article: turoctocog alfa pegol (N8-GP)

Species/Strain	Method of administration	Dose duration	Doses (IU/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
Immunogenicity						
Rat/Wistar	i.v.	4 weeks	250 twice weekly	16M	Exposure was confirmed in all animals after first dosing but could only be confirmed in 9/16 animals after four weeks. Neutralising antibodies developed in 11/16 animals.	[redacted] (part of absorption study)
Cynomolgus monkey/ *Macaca fascicularis*	i.v.	4 weeks	250 twice weekly	3M	Post-dose APTT was shortened until day 11 (evidence of pharmacological action). APTT was prolonged from day 15, indicating formation of neutralising antibodies cross-reacting with the monkeys' endogenous FVIII. Exposure from day 15 was limited or absent. Neutralising antibodies were found in all animals at end of study. One animal was euthanised prematurely on day 23 due to increased bleeding tendency (acquired haemophilia).	[redacted] (part of absor+ption study)
Rat/Rowett nude (Crl:NIH-*Foxn1*^{rnu})	i.v.	6 weeks	50 or 1500 twice weekly	20M+20F	Systemic exposure was confirmed for all animals dosed with 1500 IU/kg/dose and some accumulation was demonstrated at this dose level. However, systemic exposure was not confirmed at 50 IU/kg/dose. Anti-drug antibody formation did not occur. There was no pharmacological effect on the coagulation system at either dose level. PEG was not detected in brain, spleen and muscles one week after the final dose administration at either dose level. The Rowett Nude rat was	212142 (part of absorption study)

Species/Strain	Method of administration	Dose duration	Doses (IU/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
					considered suitable for long-term evaluation of high doses of N8-GP.	
Studies supporting an optimised manufacturing process						
Comparative pharmacodynamics						
F8-KO mouse/ B6.129S4_F8tm1Kaz/J	i.v.	Single dose	0.25, 1, 4	10M+10F	The the potency estimates, ED_{50} values, calculated for total bleeding time and total blood loss were comparable between N8-GP manufactured before or after the optimised process when investigated in the tail vein transection bleeding model in F8-KO mice.	[redacted]
Comparative pharmacokinetics						
F8-KO mouse/ B6.129S4_F8tm1Kaz/J	i.v.	Single dose	140	36 animals per dose group (33M+39F; ~16−17M+19−20F per group)	N8-GP (before change): C_{max}: 1.42 IU/mL; AUC: 28.0 IU*h/mL, AUC_{extrap} (%): 6.88 N8-GP (after change): C_{max}: 1.71IU/mL; AUC: 25.5 IU*h/mL, AUC_{extrap} (%): 10.5 The ratio of the AUC between N8-GP before and after the change, based on the population estimates was 1.0, which is within the range of 0.80-1.25, used as a criteria for defining comparability.	[redacted]

Species/Strain	Method of administration	Dose duration	Doses (IU/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	Study ID
Comparative immunogenicity Rabbit/New Zealand White	i.v.	16 doses, twice weekly for 8 weeks	50	20F	No differences in immunogenicity, anti-N8-antibodies or anti-CHO HCP (Chinese hamster ovary host cell protein) antibodies, was observed for the N8 intermediate material before and after the change in rabbits at any time point.	[redacted]

Abbreviations: F = female(-s); i.v. = intravenous(-ly); M = male(-s).