目次

1. まとめ.....5
2. 単回投与毒性試験.....9
2.1 ADAMTS13 欠損マウスにおけるヒト rVWF の単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1940601 試験）.....9
2.2 C57BL/6J マウスにおけるヒト rVWF の単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1990701 試験）.....10
2.3 VWF 欠損マウスにおけるヒト rVWF 単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1930601 試験）.....11
2.4 ADAMTS13 欠損マウスにおけるヒト rVWF とヒト rADAMTS13 との併用での静脈内投与による急性毒性（AU0507W01 試験）.....12
2.5 ラットにおけるヒト rVWF の単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1950601 試験）.....13
2.6 ウサギにおけるヒト rVWF の単回静脈内投与毒性試験（BAX0009 試験）及びトキシコキネティクス評価（PV2140708 試験）.....14
2.7 カニクイザルにおけるヒト rVWF の単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（BAX0011 試験）及びトキシコキネティクス評価（DI08K001 試験）.....15
3. 反復投与毒性試験.....16
3.1 ラットにおけるヒト rVWF の 14 日間静脈内投与毒性試験（33981 試験）.....16
3.2 VWF 欠損ブタにおけるヒト rVWF の検討試験（RD_VB_110704 試験）.....18
3.3 カニクイザルにおけるヒト rVWF の 14 日間静脈内（ボーラス）投与及び 18 日間の回復期間を設定した毒性試験（EWA0015 試験）.....19
3.4 カニクイザルにおける rVWF の 4 週間静脈内投与及び 2 週間の回復期間を設定した毒性試験（506794 試験）並びにトキシコキネティクス追加評価（179975 試験）.....22
4. 遺伝毒性試験.....25
4.1 rVWF: ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（BAX22 試験）.....25
4.2 rVWF: ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 哺乳類細胞染色体異常試験（BAX0013 試験）.....26
4.3 rVWF: マウス小核試験（BAX24 試験）.....26
5. がん原性試験.....27
6. 生殖発生毒性試験.....27
6.1 受胎能、初期胚及び胚・胎児発生毒性試験.....27
6.2 出生後及び幼若動物の毒性試験.....28
7. 局所刺激性試験.....29
7.1 ウサギにおけるヒト rVWF の単独投与及びアドベイトとの併用投与による局所刺激性の検討（PV2000701 試験）.....29
8. その他の毒性試験.....29

8.1 Balb/c マウスにおけるヒト rVWF 及びヒト pdVWF の比較免疫原性（FS-IM00907 試験）.....29
8.2 2 種類のコンベンショナル E17 血友病マウス及び新規の E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウスにおけるアドベイトの免疫原性に対する VWF とアドベイトとの併用投与の影響（IMM_R&D_017_11 試験）.....31
8.3 ウサギにおける 2 週間静脈内投与毒性試験（528575 試験）.....32
8.4 ヒト rVWF の ADAMTS13 介在性タンパク質分解の動物種依存的変動性（RD_VB_110702 試験）.....32
8.5 rVWF 製剤に含まれる添加物の安全性評価.....32
9. 考察及び結論.....34
9.1 単回投与毒性試験.....34
9.2 反復投与毒性試験.....36
9.3 遺伝毒性.....37
9.4 局所刺激性.....37
9.5 その他の試験：免疫原性.....37
9.6 GLP 適用毒性試験における曝露データに基づく安全域.....38
10. 図表.....43
参考文献.....43

表

表 2.6.6-1. rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与による毒性試験.....8
表 2.6.6-2. マウスでの単回投与毒性試験における投与量.....9
表 2.6.6-3. ラットでの単回投与毒性試験における投与量.....13
表 2.6.6-4. ラットにおける rVWF 及びアドベイト 14 日間投与後の VWF の C_{max} 及び AUC 17
表 2.6.6-5. カニクイザルに rVWF 及びアドベイトを 14 日間投与したときの C_{max} 及び AUC.....21
表 2.6.6-6. 抗 VWF 抗体の発現頻度.....23
表 2.6.6-7. 主要な TK パラメータの要約（rVWF、ベースライン値補正）.....24
表 2.6.6-8. FS-IM00907 試験の試験デザイン.....30
表 2.6.6-9. rVWF の急性毒性試験： マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおけるポリソルベート 80 の曝露量.....33
表 2.6.6-10. 単回投与毒性試験における NOAEL.....34
表 2.6.6-11. 主要な毒性試験における毒性所見、NOAEL 及び安全域の概要.....39

略語一覧

略語	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
ADAMTS13	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13	トロンボスポンジン 1 型モチーフ第 13 番を有するディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ
ADVATE	licensed human recombinant FVIII product	アドベイト（既承認薬である遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子製剤）
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC	area under the curve	濃度–時間曲線下面積
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CK	creatinine kinase	クレアチニンキナーゼ
C_{max}	maximum concentration	最高濃度
C_0	concentration at time zero after dosing	投与後 0 時点の濃度
Da	dalton	ダルトン
DIC	disseminated intravascular coagulopathy	播種性血管内凝固症候群
FVIII	factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
Gamma GT	gamma-glytamyl transferase	ガンマ–グルタミルトランスフェラーゼ
HDL	high-density lipoprotein	高比重リポ蛋白
IU	international unit	国際単位
i.v.	intravenous(ly)	静脈内
kDa	kilo dalton	キロダルトン
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LDL	low-density lipoprotein	低比重リポ蛋白
MPEs	micronucleated polychromatic erythrocytes	小核を有する多染性赤血球
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
pdFVIII	plasma-derived factor VIII	血漿由来血液凝固第 VIII 因子
pdVWF	plasma-derived von Willebrand factor	血漿由来 von Willebrand 因子
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
rADAMTS13	recombinant ADAMTS13	遺伝子組換え ADAMTS13
rFVIII	recombinant factor VIII	遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子
rVWF	recombinant human von Willebrand factor	遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子（製剤）
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
U	unit	単位
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

略語	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
VWF	von Willebrand factor	von Willebrand 因子
VWF:Ag	von Willebrand factor antigen	VWF 抗原
VWd	von Willebrand factor deficient	von Willebrand 因子欠損
VWF:RCo	von Willebrand factor ristocetin cofactor (activity)	von Willebrand 因子リストセチンコファクター（活性）

1. まとめ

遺伝子組換えヒト von Willebrand 因子（rVWF）を単独で又は既承認薬の遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子製剤（rFVIII、アドベイト）との併用によりマウス、ラット、ウサギ及びカニクイザルに投与し、rVWF の毒性を評価した。

マウスはヒト rVWF の薬理活性を示し、また VWF 欠損（VWd）マウス及び ADAMTS13 欠損マウスは病態での試験が可能なため、毒性試験に用いる動物種として選択した。異なる系統のマウスを用いて試験することにより、マウスの内因性 ADAMTS13 によるヒト rVWF の切断の重要性を評価することが可能であった。

ラットは、反復投与毒性試験のための標準的なげっ歯類動物であるため、毒性試験に用いる動物種として当初選択したが、*in vitro* 試験（RD_VB_110702 試験）において、ラットの内因性 ADAMTS13 によるヒト rVWF の切断が低感受性であったため、適切な動物種ではないことが示された。

ウサギは、内因性 ADAMTS13 がヒト rVWF を非常に効率的（ヒト ADAMTS13 と同程度）に切断するため、単回投与安全性試験/毒性試験のために用いる動物種として選択した。しかし、ウサギの反復投与検討試験での抗体産生、抗体に起因する所見及び曝露量減少に基づき、更なるウサギでの反復投与毒性試験の実施は適切ではないと考えられた。

カニクイザルは、内因性 ADAMTS13 がヒト rVWF を非常によく切断する性質を有するため、適切な非げっ歯類動物と考えられたことから、14 日間及び 4 週間反復投与毒性試験のために選択した。更に、カニクイザルとヒトの血液凝固系は非常に類似しており、それゆえ、カニクイザルは血液凝固因子の毒性試験に用いる標準的な動物種と考えられる。

毒性試験結果は以下のとおりである。

- rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与による単回投与毒性は、異なる 3 系統のマウス［ADAMTS13 欠損マウス（PV1940601 試験）、C57BL/6J マウス（PV1990701 試験）、VWd マウス（PV1930601 試験）］、ラット（PV1950601 試験）、ウサギ（BAX0009 試験）及びカニクイザル（BAX0011 試験）を用いて評価した。単回投与後のトキシコキネティクス（TK）評価は、ウサギ（PV2140708 試験）及びカニクイザル（DI08K001 試験）を用いて実施した。マウスでは、過剰な薬理作用として微小血栓の徴候が観察された。最も感受性が高かった系統は ADAMTS13 欠損マウスであった。検討したその他の系統のマウスでは比較的軽度の所見（死亡例なし、より軽度の臨床症状及びより低重症度の病理組織学的所見）が観察された。観察された微小血栓症状は、動物種（マウス）に特異的な過剰な薬理作用と解釈される。マウスの ADAMTS13 はヒト rVWF を十分に切断できない（[22]、RD_VB_110702 試験）。
  ADAMTS13 欠損マウス及び C57BL/6J マウスにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（192 IU FVIII/kg）併用投与時の無毒性量（NOAEL）は 250 IU VWF:RCo/kg であり、VWd マウスにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（385 IU FVIII/kg）併用投与時の NOAEL は 500 IU VWF:RCo/kg であった。

・ rVWF と rADAMTS13 とを併用投与したときの単回投与毒性を ADAMTS13 欠損マウスで検討した（AU0507W01 試験）。本試験で死亡例はなく、rVWF の単独投与時と比較して血栓塞栓誘発性は低かった。

・ ラット、ウサギ及びカニクイザルでは、rVWF の単回投与による毒性及び血栓形成性の徴候は認められなかった（PV1950601 試験、BAX0009 試験、BAX0011 試験）。ラットにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（1077 IU FVIII/kg）併用投与時の NOAEL は 1400 IU VWF:RCo/kg であり、ウサギ及びカニクイザルにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（462 IU FVIII/kg）併用投与時の NOAEL は、それぞれ 1200 及び 600 IU VWF:RCo/kg であった。ウサギ及びカニクイザルにおける TK 解析により、異なる投与量で被験物質の曝露が確認されたため、毒性が認められなかったことは曝露されなかったためではないことが示された。

ラット（33981 試験）、VWd ブタ 1 匹（RD_VB_110704 試験）及びカニクイザル（EWA0015 試験、506794 試験）に反復投与したときの毒性を検討した。

・ ラットにおいて、rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与により一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査所見、尿検査所見、血液凝固及び血清生化学パラメータ、血小板凝集、並びに肉眼的病理所見に問題となる変化は認められなかった。14 日間連日投与後に、再生性貧血、血小板減少、並びに心臓、肝臓及び脾臓に投与に関連した病理組織学的変化が観察された。15 日間の回復期間後に投与に関連した変化が認められなかったことから、これらの変化は投与中止により回復する可逆的変化と考えられた。rVWF を単独又はアドベイトと併用投与したラットで、ヒト VWF 及びヒト FVIII に特異的な抗体が誘導された。

・ ブタにおいて毒性は認められなかった。

・ カニクイザルにおいて、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により 14 日間反復静脈内投与した結果、有害な影響は認められず、溶血、血栓及び血小板減少の徴候も観察されなかった。 rVWF 投与群（単独投与群及びアドベイト併用投与群）及び Haemate P 投与群の全動物にヒト VWF に特異的な抗体の産生が認められた。14 日間投与後、抗体反応の log2 力価は全投与群で同様であった。rVWF 単独投与群、アドベイト併用投与群、Haemate P 投与群のすべてにおいて、ヒト VWF に対する中和抗体が検出された。rVWF 単独投与群では、ヒト FVIII に対する抗体は検出されなかった。rVWF を単独で又はアドベイト（77 IU FVIII/kg）との併用により投与したときの NOAEL は、本試験の最高用量である 100 IU VWF:RCo/kg であった。

・ カニクイザルにおける 4 週間反復投与毒性試験では、rVWF を 1 日 1 回静脈内反復投与した結果、800 IU VWF:RCo/kg で生命を脅かすアナフィラキシー反応及び比較的軽度のアレルギー反応が認められ、カニクイザルに異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられた。したがって、アナフィラキシー反応及びアレルギー反応に関する NOAEL は 300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。毒性の可能性については、800 IU VWF:RCo/kg 投与群の 2 週間及び 300 IU VWF:RCo/kg/日までの投与群の 4 週間にわたり、前記以外のすべての変化に良好な忍容性が認められた。被験物質は血液凝固経路を標的とし、影響は主に抗体産生及び関

連する補体、急性期のタンパク質、血液学的指標並びに血液凝固時間の変化にみられた。これらの結果に基づき、NOAEL は 300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

TK 解析は、ウサギ及びカニクイザルの単回投与毒性試験、並びにラット及びカニクイザルの反復投与毒性試験に含めた。カニクイザルでは、VWF 抗原（VWF:Ag）測定法はサルの内因性 VWF と rVWF とを区別しない。そのため、投与薬物 rVWF の曝露量［最高濃度（C_{max}）及び濃度–時間曲線下面積（AUC）に基づく］は、投与前の内因性 VWF 濃度を差し引いてベースライン値を補正することによっても評価した。ラット及びウサギでは、VWF:Ag 測定法は内因性 VWF と交差反応しない（又はごくわずかしか交差反応しない）ため、内因性ベースライン値の補正は不要であった。

rVWF の遺伝毒性は、2 つの *in vitro* 試験として代謝活性化系の存在及び非存在下でのネズミチフス菌を用いる復帰突然変異試験（エームス試験）（BAX22 試験）及び染色体異常試験（BAX0013 試験）、並びに 1 つの *in vivo* 試験として小核試験（BAX24 試験）で検討した。いずれの試験でも本剤は遺伝毒性を示さなかった。

ウサギに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内、動脈内又は静脈周囲投与した局所刺激性試験の結果、いずれの投与経路でも忍容性は良好であった（PV2000701 試験）。

Balb/c マウスを用いて比較免疫原性試験を実施した結果、ヒト血漿由来 VWF（pdVWF）と rVWF の免疫原性に相違はないことが示された（FS-IM00907 試験）。

rVWF とアドベイトとを併用投与したときのアドベイトの免疫原性に及ぼす影響に関する試験を、異なる 3 種類の血友病マウスモデル（E17 血友病 Balb/c マウス、E17 血友病 C57BL/6J マウス及び E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウス）を用いて実施した。その結果、ヒト rVWF、高純度ヒト pdVWF 及び海外既承認の pdVWF のいずれでもアドベイトと併用投与したとき、アドベイトの免疫原性を増強させなかった（IMM_R&D_017_11 試験）。

ブタでの試験（RD_VB_110704 試験）、ADAMTS13 との併用投与試験（AU0507W01 試験）、免疫原性試験（FS-IM00907 試験、IMM_R&D_017_11 試験）、ウサギでの反復投与検討試験（528575 試験）及び毒性発現機序検討試験（RD_VB_110702 試験）以外のすべての試験は、GLP 適用下で実施した。

rVWF の毒性試験の概要を表 2.6.6-1 に示す。

表 2.6.6-1. rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与による毒性試験

Study Type and Duration	Route of Administration	Species	Test Articles/Vehicle Control
Single-Dose Toxicity	intravenous	ADAMTS13 ko mouse C57BL/6J mouse VWd mouse Rat Rabbit Cynomolgus monkey	rVWF, rVWF+ADVATE, rVWF+ADAMTS13 Vehicle control[a]
Repeat-Dose Toxicity (14 days)	intravenous	Rat	rVWF, rVWF+ADVATE Vehicle control[a]
Repeat-Dose Toxicity (4 days)	intravenous	VWd pig	rVWF+ADVATE
Repeat-Dose Toxicity (14 days)	intravenous	Cynomolgus monkey	rVWF, rVWF+ADVATE Vehicle control[b]
Repeat-Dose Toxicity (4 weeks)	intravenous	Cynomolgus monkey	rVWF Vehicle control[b]
Genotoxicity	*in vitro*	*Salmonella typhimurium* Reverse Mutation Assay (Ames Test)	rVWF
	in vitro	Chromosome aberration test	rVWF
	intravenous	Mouse	rVWF Vehicle control[b]
Local Tolerance	intravenous, intraarterial, paravenous	Rabbit	rVWF, rVWF+ADVATE Vehicle control[a]
Immunogenicity	intravenous	Mouse	rVWF, rVWF+ADVATE, ADVATE Vehicle control[b]
	intravenous	E17 haemophilic Balb/c mouse E17 haemophilic C57BL/6J mouse E17 haemophilic human F8 transgenic mouse	ADVATE, rVWF, ADVATE+rVWF, ADVATE+highly purified pdVWF, ADVATE+Wilfactin
Repeat-Dose feasibility (14 days)	intravenous	Rabbit	rVWF
Mechanistic Study (ADAMTS13 cleavage of human rVWF)	*in vitro*	ADAMTS13 ko mouse C57BL/6J mouse VWd mouse Rat Gunea pig Rabbit Dog Cynomolgus monkey	rVWF

[a] rVWF buffer (glycine, mannitol, trehalose, polysorbate 80, citrate), rVWF buffer + ADVATE buffer (glycine, mannitol, trehalose, polysorbate 80, citrate + mannitol, trehalose, L-histidine, glutathione, polysorbate 80, tris)

[b] rVWF buffer (glycine, mannitol, trehalose, polysorbate 80, citrate)

2. 単回投与毒性試験

マウスでの 3 つの単回投与毒性試験（2.6.6.2.1 項、2.6.6.2.2 項、2.6.6.2.3 項）において、表 2.6.6-2 に示すように、rVWF 1 ロットを単独又はアドベイトと併用投与し、pdVWF/pdFVIII 製剤（Haemate P、ヒト抗血友病因子/VWF 複合体）と比較した。

表 2.6.6-2. マウスでの単回投与毒性試験における投与量

Test Article	Dose	
	IU VWF:RCo/kg	IU FVIII/kg
rVWF	4000, 2000, 1000, 500, and 250	-
rVWF +ADVATE	4000, 2000, 1000, 500, and 250	3077, 1538, 769, 385 and 192
Haemate P (pdVWF + pdFVIII)	4000	3322

-: Not applicable

rVWF の単独投与時の緩衝液及び rVWF とアドベイトとの併用投与時の混合緩衝液（溶媒対照）、並びに等張生理食塩液（陰性対照）を被験物質の最高液量に従い投与した。

即時性及び遅発性影響の可能性を評価するため、各試験は 1 群当たり 10 匹（雌雄各 5 匹）の投与群から成る 2 部構成とした。短期評価群は投与翌日、長期評価群は 14 日間の観察期間後に屠殺した。各試験期間終了時に、全生存動物の体重を測定し、ヘマトクリット、血小板数及び乳酸脱水素酵素（LDH）の測定のために採血した。剖検を実施し、特定の器官（副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び眼球）について病理組織学的検査を実施した。

2.1 ADAMTS13 欠損マウスにおけるヒト rVWF の単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1940601 試験）

本試験の目的は、ADAMTS13 欠損マウスに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内（臨床投与経路）単回投与し、その急性毒性を検討することであった。ADAMTS13 はトロンボスポンジン 1 型モチーフ第 13 番を有するディスインテグリン及びメタロプロテアーゼであり、生理的条件下で内因性 VWF を切断する。

結果

・ 生死及び体重変動

本試験条件下、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内投与したとき、2000 IU VWF:RCo/kg 以上で死亡例が認められた。rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与したとき、体重増加に明らかな用量相関性の変化は認められなかった。

・ 臨床症状、臨床病理及び病理組織学的検査

4000 及び 2000 IU VWF:RCo/kg の単独投与群又はアドベイト併用投与群において、臨床症状が認められた。1000 IU VWF:RCo/kg 以上の単独投与群又はアドベイト併用投与群において、1 日目に貧

血及び血小板減少が認められた。2000 IU VWF:RCo/kg 以上の単独投与群又は併用投与群では、投与翌日に対照群と比較して LDH の増加が認められた。すべての検査値変動は 14 日後には正常レベルに回復した。

1 つ以上の器官（心臓、脳、眼球、腎臓、副腎、肺）に、播種性血管内凝固症候群（DIC）の徴候に類似した微小血栓が生じた。これは、被験物質 rVWF を 500 IU VWF:RCo/kg 以上で単独又はアドベイトと併用投与したときに血栓形成性が高まったことを示していると考えられる。

Haemate P 投与群では、投与翌日に血小板数の軽微な減少のみが認められた。

結論

ADAMTS13 欠損マウスは rVWF 投与に対して感受性を示し、検討した中で最も感受性の高いマウスの系統であった。本試験の結果は、マウスの内因性 ADAMTS13 の欠損の他、マウスの内因性 VWF 及び超巨大 VWF マルチマーの併存による過剰な薬理作用と解釈できると考えられる。ADAMTS13 欠損マウスは、Tyr^{1605}-Met^{1606} で rVWF サブユニットを切断して超巨大 VWF マルチマーをタンパク質分解することができず、結果として複数の器官で微小血栓が生じた（[22]、RD_VB_110702 試験）。

ADAMTS13 欠損マウスにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（192 IU FVIII/kg）との併用投与時の無毒性量（NOAEL）は 250 IU VWF:RCo/kg であった。

2.2 C57BL/6J マウスにおけるヒト rVWF の単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1990701 試験）

本試験の目的は、C57BL/6J マウスに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内（臨床投与経路）単回投与し、その急性毒性を検討することであった。

結果

・ 生死及び体重変動

本試験条件下、rVWF の 4000、2000、1000、500 又は 250 IU VWF:RCo/kg を単独で又はアドベイトの 3077、1538、769、385 又は 192 IU FVIII/kg との併用により静脈内投与した結果、自然死は認められなかった。

体重増加に明らかな用量相関性の変化はみられず、rVWF＋アドベイト投与群と Haemate P 投与群とを比較した結果、統計学的有意差は認められなかった（$P > 0.05$、両側並べ替え検定）。

・ 臨床症状、臨床病理及び病理組織学的検査

高用量 4000 IU VWF:RCo/kg の単独投与群又はアドベイトとの併用投与群において、臨床症状が認められた。2000 IU VWF:RCo/kg 以上の単独投与群又はアドベイトとの併用投与群において、1 日目に血小板減少が認められたが、14 日後には回復した。この他の検査項目には、生物学的に問題となる変化は認められなかった。

特定の血液学的検査値及び血清化学検査値を比較した結果、2000 IU VWF:RCo/kg 以上の単独投与群又はアドベイトとの併用投与群において、1 日目の投与後に血小板数の低下が認められた。2000 IU VWF:RCo/kg 以上のアドベイト併用投与群においては、投与翌日に LDH の増加が認められた。いずれの検査値変動も 14 日後には正常レベルに回復した。

500 IU VWF:RCo/kg 以上の単独投与群又はアドベイトとの併用投与群において、軽度の「虚血性心疾患」に合致した病理組織学的変化が観察された。

Haemate P 投与群では、毒性変化は認められなかった。

結論

マウスの ADAMTS13 は rVWF サブユニットを十分に切断できず、マウスは rVWF の超巨大 VWF マルチマーを減少させない（[22]、RD_VB_110702 試験）。そのため、観察された微小血栓症状は、過剰な薬理作用と解釈できる。

C57BL/6J マウスにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（192 IU FVIII/kg）との併用投与時の NOAEL は、250 IU VWF:RCo/kg であった。

2.3 VWF 欠損マウスにおけるヒト rVWF 単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1930601 試験）

本試験の目的は、VWd マウスに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内（臨床投与経路）単回投与し、その急性毒性を検討することであった。

結果

・ 生死及び体重変動

本試験条件下、rVWF の 4000、2000、1000、500、250 IU VWF:RCo/kg を単独で又はアドベイトの 3077、1538、769、385、192 IU FVIII/kg との併用により静脈内投与した結果、自然死は認められなかった。

rVWF の単独（500 IU VWF:RCo/kg 以下）又は rVWF＋アドベイトの併用（4000 IU VWF:RCo/kg + 3077 IU FVIII/kg 以下）投与により、体重推移に対する影響はみられなかった。Haemate P 投与群の平均体重の推移（0～1 日目及び 0～14 日目）を同用量の rVWF＋アドベイト投与群と比較した結果、統計学的有意差は認められなかった（$P > 0.05$、両側並べ替え検定）。

・ 臨床症状、臨床病理及び病理組織学的検査

4000 IU VWF:RCo/kg の単独又はアドベイトとの併用投与により、臨床症状が観察された。2000 IU VWF:RCo/kg 以上の単独又はアドベイトとの併用投与により、1 日目に血小板減少が認められたが、14 日後には回復した。この他の検査項目に、生物学的に問題となる変化は認められなかった。

1000 IU VWF:RCo/kg 以上の単独又はアベイトとの併用投与により、軽度の「虚血性心疾患」に合致した病理組織学的変化が観察された。

Haemate P 投与群では、毒性作用は認められなかった。

結論

VWd マウスにおける rVWF の単独投与時及びアドベイト（385 IU FVIII/kg）との併用投与時の NOAEL は、500 IU VWF:RCo/kg であった。マウスの ADAMTS13 は rVWF サブユニットを十分に切断できず、マウスは rVWF の超巨大 VWF マルチマーを減少させないことから、観察された微小血栓は、過剰な薬理作用と解釈できる（[22]、RD_VB_110702 試験）。

2.4 ADAMTS13 欠損マウスにおけるヒト rVWF とヒト rADAMTS13 との併用での静脈内投与による急性毒性（AU0507W01 試験）

rVWF は製造過程で ADAMTS13 に特異的なタンパク質分解に曝露されていないため、完全な VWF サブユニットから成る。これに対して、Haemate P は、VWF の A2 ドメインに存在する Tyr^{1605}-Met^{1606} で切断されたサブユニットから成る。完全なサブユニット及び超巨大 VWF マルチマーを含有する rVWF を ADAMTS13 欠損マウスに投与することにより、過剰な薬理作用である rVWF の重度の代謝障害、微小血管血栓の増加及び DIC 症状が生じる可能性が高い。

PV1940601 試験で使用した Haemate P は、超巨大 VWF マルチマーを欠くだけでなく ADAMTS13 を含有しており、これらのことが ADAMTS13 欠損マウスへの投与時に血栓形成性が認められなかったことの一因と考えられる。

そのため、本試験の目的は、ADAMTS13 欠損マウスに対して、Haemate P と同様の濃度で rVWF と rADAMTS13 とを併用投与し、その急性毒性を評価することであった。rVWF の 2000 IU VWF:RCo/kg と rADAMTS13 の 19.4 µg/kg（Haemate P で測定された比に準拠）とを併用投与した。2000 IU VWF:RCo/kg を選択した理由は、この用量において ADAMTS13 欠損マウスの 20%が死亡したためである（PV1940601 試験）。被験物質の投与に際しては、投与直前にシリンジ内であらかじめ混合して投与するか（A 群）、又は rADAMTS13 の投与直後に rVWF を投与した（B 群）。

屠殺時（1 日目）まで毒性徴候を観察すると共に、体重測定の他、ヘマトクリット、血小板数、LDH 及びクレアチニンキナーゼ（CK）の測定のための採血を行った。剖検を実施し、特定の器官（副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び眼球）について病理組織学的検査を実施した。

PV1940601 試験とは異なり、予期せぬ死亡又は被験物質に関連した肉眼的所見は認められず、ADAMTS13 欠損マウスの rVWF 毒性に対する ADAMTS13 の軽減効果が示された。ただし、PV1940601 試験と同様に、rADAMTS13 と rVWF の順次投与の翌日に血小板数の低下が認められた（B 群）。

両群において、心臓の病理組織学的変化（冠動脈微小血栓、心筋壊死及び冠動脈周囲炎の軽微な増加）が認められた。2 群（A 及び B）を比較した結果、これらの変化の重症度及び発現率に著明な差は認められなかった。

これらの変化から、ADAMTS13 欠損マウスにおいて、rADAMTS13 と併用したときでも、rVWF の 2000 IU VWF:RCo/kg により血栓形成性が増加することが示された。本影響についても、この高

感受性動物モデルにおける過剰な薬理作用（被験物質の予想された血液凝固促進活性）と解釈できると考えられる。ただし、死亡例は認められず、rVWF の単独投与時と比較して、血栓塞栓誘発性は低かった。

2.5 ラットにおけるヒト rVWF の単独又はアドベイトとの併用での静脈内投与による急性毒性（PV1950601 試験）

本試験の目的は、ラットに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内（臨床投与経路）単回投与し、その急性毒性を検討することであった。

rVWF 1 ロットを単独又はアドベイトと併用投与し、表 2.6.6-3 に示すように、Haemate P と比較した。

表 2.6.6-3. ラットでの単回投与毒性試験における投与量

Test Article	Dose	
	IU VWF:RCo/kg	IU FVIII/kg
rVWF	1400, 700	-
rVWF + ADVATE	1400	1077
	700	538
Haemate P (pdVWF + pdFVIII)	1400	939

-: Not applicable

rVWF の単独投与時の緩衝液（溶媒対照）の投与液量は 11.1 mL/kg（rVWF 単独高用量群の液量に相当）、混合緩衝液（溶媒対照）は 17.2 mL/kg（rVWF＋アドベイト併用投与時の液量に相当）、等張生理食塩液（陰性対照）は 17.2 mL/kg（併用高用量群の液量に相当）とした。

本試験は、それぞれ 1 群当たり 10 匹（雌雄各 5 匹）の 8 群から成る 2 部構成とした。一方の群の動物は投与翌日に屠殺し、即時性の毒性を検討した。他方の群の動物は 14 日間の観察期間後に屠殺し、遅発性の影響及び回復性を検討した。このデザインにより、本試験に供した動物は合計 160 匹となった。各試験期間の終了時に全生存動物の体重測定の他、ヘマトクリット、血小板数、LDH 及び CK の測定のための採血を麻酔下で心穿刺により実施した。剖検を実施し、特定の器官（副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、脾臓及び眼球）を詳細な病理組織学的検査のために保存した。

結果

・ 生死及び体重変動

試験期間中、いずれの動物においても、死亡又は毒性を示す臨床的異常は認められなかった。

体重推移により、rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与は、全身の健康状態に即時的又は長期的な悪影響を及ぼさないという臨床所見の裏付けが得られた。

・ 臨床症状、臨床病理及び病理組織学的検査

特定の血液学的検査データを比較した結果、ヘマトクリット及び血小板数に被験物質に関連した、又は用量依存性の即時的又は長期的影響は認められなかった。

臨床化学検査項目である LDH 及び CK は、投与群にかかわらず 1 日目の投与後に増加傾向を示し、これらの増加が rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与と直接関連していないことが示された。

検討した器官において、投与に関連した病理組織学的変化、特に血栓塞栓性変化は認められなかった。

結論

Haemate P 投与群又は溶媒対照群と比較して、rVWF の単独投与群又はアドベイトとの併用投与群において、毒性及び血栓形成性増加の明白な徴候は認められなかった。

これに基づき、ラットに対する rVWF の単独投与時及びアドベイト（1077 IU FVIII/kg）との併用投与時の NOAEL は、1400 IU VWF:RCo/kg と推定された。

2.6 ウサギにおけるヒト rVWF の単回静脈内投与毒性試験（BAX0009 試験）及びトキシコキネティクス評価（PV2140708 試験）

rVWF を単独で又はアドベイトとの併用によりニュージーランド白色ウサギに単回静脈内投与したときの急性毒性を評価した。それぞれ雌雄各 6 匹から成る 4 群に rVWF を 100、300、600 又は 1200 IU VWF:RCo/kg の用量で単回投与した。更に別の 2 群に rVWF とアドベイトとを 100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg 又は 600 IU VWF:RCo/kg + 462 IU FVIII/kg の用量で併用投与した。同様の構成の対照群に rVWF のクエン酸緩衝液を最高液量で投与した。

投与翌日に 1 群当たり雌雄各 3 匹を屠殺し、急性の影響を評価した。各群の残りの雌雄各 3 匹は 14 日間の観察期間後に屠殺し、遅発性の影響を評価した。本試験中に、一般状態、体重、摂餌量、血液学的所見、血液生化学所見、イムノアッセイ、TK、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理像を検討した。

結果

1200 IU VWF:RCo/kg 以下の単独投与群及び 600 IU VWF:RCo/kg + 462 IU FVIII/kg（アドベイト）以下の併用投与群において、一般状態、体重、摂餌量、血液学的パラメータ、血液化学パラメータ、血漿中トロポニン I 濃度、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理像の所見に対する影響は認められなかった。

血中濃度–時間データの TK 解析により、被験物質の増量に伴い動物での曝露の程度が増加することが確認された。VWF の TK パラメータは雌雄で概して同様であり、明らかな性差はないことが示唆された。

rVWF 単独投与群又は rVWF＋アドベイト併用投与群で、100～600 IU VWF:RCo/kg の用量範囲において、AUC に基づく VWF:Ag の全身曝露量は用量比例的であった。用量に対して PK が線形性を示すため、全身曝露量の増加又は減少を予測しながら臨床用量を調節することが可能になる。

また、投与された rVWF は血漿中に残存し、定常状態における分布容積（V_{ss}）の結果から示されるとおり末梢組織に広く分布せず、得られた AUC（又は C_{max}）に相当する全身曝露量において毒性作用は認められなかった。

結論

1200 IU VWF:RCo/kg 以下の rVWF 単独投与群及び 600 IU VWF:RCo/kg + 462 IU FVIII/kg 以下のアドベイト併用投与群において、投与に関した変化は認められなかった。

そのため、ウサギに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により単回静脈内投与したときの NOAEL は上記の用量であると考えられた。

2.7 カニクイザルにおけるヒト rVWF の単回静脈内（ボーラス）投与毒性試験（BAX0011 試験）及びトキシコキネティクス評価（DI08K001 試験）

rVWF を単独で又はアドベイトとの併用によりカニクイザルに単回静脈内投与したときの急性毒性を評価した。それぞれ雌雄各 4 匹から成る 4 群に rVWF を 100、300、600 又は 1200 IU VWF:RCo/kg の用量で単回投与した。更に別の 2 群に rVWF とアドベイトとを 100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg 又は 600 IU VWF:RCo/kg + 462 IU FVIII/kg の用量で併用投与した。同様の構成の対照群に rVWF のクエン酸緩衝液を最高液量で投与した。

投与翌日に 1 群当たり雌雄各 2 匹を屠殺し、急性の影響を評価した。各群の残りの雌雄各 2 匹は 14 日間の観察期間後に屠殺し、遅発性の影響を評価した。本試験中に、一般状態、体重、血液学的所見、血液生化学所見、器官重量、肉眼的病理像及び病理組織像を検討し、TK の詳細な評価のために試料を採取した。

結果

一般状態、体重、摂餌量、血液学的所見、血液生化学所見、器官重量、肉眼的及び顕微鏡的病理像に投与の影響は認められなかった。

本試験中に得られた TK パラメータの結果は、カニクイザルを用いた PK 試験の結果と同様であった（DI07K001 試験）。異なる用量の被験物質による曝露が確認されたため、毒性が認められなかったことは曝露されなかったためではないことが示された。

また、VWF の TK 特性は雌雄で同様であると考えられた。

VWF の用量比例性解析より、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与したとき、血中 VWF:Ag 濃度に対する用量の影響は、rVWF の 100～600 IU VWF:RCo/kg、アドベイトの 77～462 IU FVIII/kg の用量範囲において十分に予測可能であることが示された。rVWF と併用投与されたアドベイトは VWF の PK パラメータに明らかな影響を及ぼさなかった。rVWF の 100 及び 600 IU

VWF:RCo/kg の投与レジメン（単独又はアドベイトとの併用）間で C_{max} 又は平均滞留時間に統計学的有意差は認められなかった（両側 p 値の範囲: 0.3280～0.6681、ANOVA: 有意水準 5%）。

要約すると、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与したとき、100～600 IU VWF:RCo/kg の用量範囲において、血中濃度に対する用量効果を予測することが可能であると考えられる。この用量範囲においては、用量を倍増すると VWF:Ag の AUC（又は C_{max}）が 2 倍高くなる。

また、投与された rVWF は血漿中に残存し、V_{ss} の結果から示されるとおり末梢組織に広く分布せず、得られた AUC（又は C_{max}）に相当する全身曝露量において毒性作用は認められなかった。

結論

1200 IU VWF:RCo/kg の rVWF 単独投与群及び 600 IU VWF:RCo/kg + 462 IU FVIII/kg のアドベイト併用投与群において、投与に関連した変化は認められなかった。このため、カニクイザルに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により単回静脈内投与したときの NOAEL は上記の用量であると考えられた。

3. 反復投与毒性試験

3.1 ラットにおけるヒト rVWF の 14 日間静脈内投与毒性試験（33981 試験）

ラットに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により 14 日間にわたり 1 日 1 回静脈内投与したときの毒性を評価した。雌雄各 16 匹の各投与群に rVWF（1400 IU VWF:RCo/kg）を単独で又はアドベイト（1080 IU FVIII/kg）との併用により投与した。別のラットを用いて、TK 及び免疫反応の評価も実施した。対照群には生理食塩液、クエン酸緩衝液（rVWF 緩衝液対照）又は混合緩衝液［クエン酸緩衝液＋アドベイト緩衝液対照（被験物質の混合液と同じ液量比率で調製）］を投与した。14 回投与後に 10 匹（主要群）を屠殺し、残りは回復性評価群として、更に 15 日間投与を行わずに維持した。評価パラメータは、一般状態、体重変化、摂餌量、眼科学的検査、免疫反応、TK、臨床病理学的検査（血小板凝集を含む）、肉眼的病理検査、器官重量及び病理組織学的検査とした。

rVWF 単独投与群又はアドベイト併用投与群において、反復投与後に予想されるヒト VWF 及びヒト FVIII に特異的な抗体が誘導された。rVWF 単独投与群でのヒト FVIII に対するラットの免疫反応は、rVWF 製剤中に不純物として残存する少量の rFVIII により誘発されたものである。抗 VWF 抗体はヒト VWF に対して中和活性を示さなかったが、抗 FVIII 抗体は FVIII 活性に対して中和活性を示した。

rVWF の単独投与又はアドベイトとの併用投与にかかわらず、VWF の全身曝露量に明らかな性差が認められ、各投与群において雌の全身曝露量の方が高かった。ただし、いずれの投与群においても、FVIII の全身曝露量に実質的な性差は認められなかった。

rVWF 又は rVWF＋アドベイトを単回投与及び反復投与したとき、VWF の血漿中の TK に著明な群間差は認められなかった。

性別又は投与された被験物質にかかわらず、単回投与時（1 日目）と比較して反復投与時（14 日目）の VWF の全身曝露量が減少した。しかし、投与終了時の曝露量は、ヒトの曝露量データと比較して安全性を評価するために十分高かった（表 2.6.6-4）。同様に、反復投与時の FVIII の全身曝露量も各群で減少した。これらの全身曝露量の減少は、被験物質に対する抗体反応に起因すると考えられる。抗体産生は、ヒトタンパク質を動物に反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。

表 2.6.6-4. ラットにおける rVWF 及びアドベイト 14 日間投与後の VWF の C_{max} 及び AUC

Nominal dose (IU VWF:RCo/kg + IU FVIII/kg)	Study day	$AUC_{0\text{-}24h}$ (U•hr/mL) [a]		C_{max} (U/mL) [a, b]	
		female	male	female	male
1400+0	1	200.64	108.13	39.73	15.07
	14	128.87	60.48	25.97	10.91
1400+1080	1	177.47	100.87	32.20	16.33
	14	105.23	48.29	21.37	16.33

[a] VWF:Ag was measured.
[b] For comparison: the highest observed C_{max} in Clinical Study 071001/Crossover: PK 50 after treatment with rVWF was 1.39 U VWF:Ag/mL

rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内投与した結果、軽度の再生性溶血性貧血、血小板減少、炎症性病変（心臓、肝臓、まれに唾液腺）及び髄外造血の増加（脾臓）が観察された。

心臓の炎症性病変の特徴は、リンパ系細胞、マクロファージ、紡錘細胞の混合物（アニチコフ細胞、線維芽細胞及び/又は組織球等）の間質性浸潤であった。炎症性病変は、心室壁及び/又は心室中隔の内部に分布していた。内因性 ADAMTS13 が rVWF を切断できないげっ歯類では（RB_VB_11702 試験、2.6.6.8.4）、心筋が超巨大 VWF の過剰な活性による血栓事象の標的器官となる可能性が考えられる[26]。心臓の病変は虚血性障害に一致しており、血栓形成及び虚血性障害における超巨大 VWF マルチマーの役割、並びに対抗因子である ADAMTS13 とのバランス作用に関する Tsai の報告[27]に基づき、rVWF 中の超巨大 VWF マルチマーの血栓形成作用に関連すると結論された。Kopic らは、ADAMTS13 欠損マウスモデルにおいて、心臓が超巨大 VWF マルチマーに関連する血栓の標的器官であることを示した[26]。rVWF 投与群の雌雄各 1 匹に唾液腺の腺極（glandular pole）の壊死及び/又は慢性炎症を特徴とする梗塞巣が認められたことから、散在性血栓の出現が示唆された。

肝臓では、線維増殖と胆管過形成を伴う、リンパ単核球を主体とする好酸球と肥満細胞が混在する細胞の浸潤により、門脈域が拡張していた。このような限局性又は多巣性の門脈反応は、肝臓切片の門脈域全体には影響を及ぼしていなかったが、門脈板（portal plate）への浸潤が高頻度に認められ、肝小葉に広がっていた。更に、門脈の慢性炎症があるラットの一部で、限局性又は多巣性の肝細胞壊死が認められた。肝臓切片の内部における壊死病巣の分布に基づき、肝細胞壊死と慢性炎症の門脈域との間に明らかな関連性はなかった。内因性 ADAMTS13 が rVWF を切断できないげっ歯

類では、肝臓が超巨大 VWF の過剰な活性による血栓事象の標的器官となる可能性が考えられる。肝臓の壊死病変中に血栓は認められなかったが、壊死病巣は超巨大 VWF の血栓形成作用に関連する微小循環不全に関連している可能性が考えられる。門脈炎症の発症機序は不明である。

全般的に、ラット ADAMTS13 に対するヒト rVWF の低感受性に起因する一過性の微小血栓による虚血は、観察された所見の根本的な原因として妥当と考えられる。しかし、いずれの投与群のラット組織でも投与に関連した血栓は顕微鏡的検査で検出されなかったため、血栓事象は確認できなかった。rVWF 単独又はアドベイトと併用投与したラットでは、動物に対する異種タンパク質を反復投与したときに予測されるヒトの VWF 及び FVIII に対する特異抗体の反応が誘導されるため、観察された所見は、特に反復投与後ではヒトのタンパク質に対するラット特異的な免疫応答でもあった。これらの根本的な両原因のヒトへの関連は限定的であると考えられる。

ラットは反復投与毒性試験のための標準的な動物種であり、rVWF はラットにおいて薬理学的活性を示すが、留意すべきこととして、ラットの ADAMTS13 に対するヒト rVWF の低感受性のため、ラットから得られた結果は、rVWF に対するヒトの薬理学的反応の過剰な予測をもたらす。rVWF を切断可能な内因性 ADAMTS13 を有する他の動物種（ウサギ及びサル）では、毒性試験及び安全性薬理試験において、過剰な血栓形成は観察されなかった。このことは、rVWF は臨床において ADAMTS13 により速やかに切断され、血栓形成作用を示さないことを示唆している。

実際、臨床試験データでも rVWF に関連した炎症反応の臨床的及び実験的エビデンスは示されなかった。ADAMTS13 が低値の患者については、潜在的な血栓形成反応について添付文書で注意喚起する。

一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査所見、尿検査所見、血液凝固及び血清化学パラメータ、血小板凝集、並びに肉眼的病理像に毒性学的に問題となる変化は認められなかった。

15 日間の回復期間後に投与に関連した変化が認められなかったことから、再生性貧血、血小板減少、並びに心臓、肝臓及び脾臓での投与に関連した病理組織学的変化は、投与中止により回復すると考えられた。rVWF＋アドベイト投与群の雌 1 匹で、回復期間後に唾液腺の慢性炎症が認められたため、梗塞巣が生じた場合には、回復により瘢痕組織が形成されることが示唆された。

結論

本試験条件下、ラットに rVWF を単独で（1400 IU VWF:RCo/kg/日）又はアドベイトとの併用により（1400 IU VWF:RCo/kg/日＋1080 IU FVIII/kg/日）14 日間連日静脈内投与した結果、軽度の再生性溶血性貧血、血小板減少、炎症性病変（心臓、肝臓、まれに唾液腺）及び髄外造血の増加（脾臓）が観察された。投与に関連した変化はいずれも、15 日間の回復期間後に回復した。

3.2 VWF 欠損ブタにおけるヒト rVWF の検討試験（RD_VB_110704 試験）

ヒト 3 型 von Willebrand 病と同じ VWF 欠損を示すブタを当該試験に用いた。これらの VWd ブタは、検討対象のヒト VWF を阻害しうる内因性 VWF を持たない。また、内因性 FVIII を安定化させる VWF を欠損しているため、正常ブタと比較して FVIII 濃度が低い。

ブタ 3 匹（ブタ A、B 及び D）に下記の被験物質を単回投与した。

- rVWF 単独投与（ブタ A: 100 IU VWF:RCo/kg）
- rVWF とアドベイトとの併用投与（ブタ B: 100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg）
- Haemate P（pdFVIII/VWF）（ブタ D: 100 IU VWF:RCo/kg + 83 IU FVIII/kg）

更に、1 匹（ブタ C）には rVWF とアドベイト（100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg の反復投与）を 4 日間連日併用投与した。投与 8 日後まで血液及び血漿試料を採取した。

アデノシン二リン酸（ADP）5 μmol/L 存在下での血小板凝集及び全血凝固における被験物質間の差はごくわずかであった。出血時間は常に 15 分超であり、各被験物質投与後の全血凝固時間に変化は認められなかった。異なる試料採取時点において、赤血球及びヘモグロビンの変動は認められなかったが、白血球はわずかに増加した。本所見は 4 匹すべてで認められた。ブタ A の試料でのみ、血小板は軽度に増加し、ヘマトクリットは安定して推移した。一方、他のブタ B、C 及び D の全試料では、いずれの検査値も経時的にやや減少した。

投与から 24 時間後の生化学検査値の測定により、ブタ A、C 及び D においてアミラーゼ、リパーゼ及びクレアチンキナーゼ（CK）の増加が示された。投与 24 時間後のその他の生化学検査値には、著しい変動は認められなかった。屠殺時点において、ブタ A、C 及び D でコレステロール、トリグリセリド、高比重リポ蛋白（HDL）コレステロール、低比重リポ蛋白（LDL）コレステロール、尿素、ガンマ–グルタミルトランスフェラーゼ（Gamma GT）、リン酸塩及び CK の減少が認められた。rVWF の投与前から持続的な鼻出血が認められ、投与から 56 時間後に死亡したブタ B では、投与から 24 時間後の臨床化学パラメータに著明な変動は認められなかった。

結論

血液学的検査値、肝検査値及び生化学検査値において、投与により重度の副作用は認められなかった。1 匹（ブタ B）が、試験開始前から始まった持続的な鼻出血により、試験終了前に死亡した。この動物の自然死については、被験物質との関連はないと考えられた。いずれの動物においても、被験物質の毒性に関連した病理組織学的変化は認められなかった。本試験結果から、被験物質 rVWF による血栓形成性又は血小板凝集性の増加の可能性は示唆されなかった。使用動物数が少なかったことから、本試験の意義には限界がある。

3.3 カニクイザルにおけるヒト rVWF の 14 日間静脈内（ボーラス）投与及び 18 日間の回復期間を設定した毒性試験（EWA0015 試験）

カニクイザルを用いた 14 日間静脈内（ボーラス）投与試験において、rVWF の全身毒性を評価した。6 群の動物を用いて評価した。

- 第 1 群: 緩衝液投与群（対照）
- 第 2 群: rVWF 単独投与群（50 IU VWF:RCo/kg）
- 第 3 群: rVWF 単独投与群（100 IU VWF:RCo/kg）

・ 第 4 群: Haemate P 投与群（100 IU VWF:RCo/kg + 42 IU FVIII/kg）

・ 第 5 群: rVWF 及びアドベイト併用投与群（100 IU VWF:RCo/kg + 77 IU FVIII/kg）

・ 第 6 群: アドベイト単独投与群（77 IU FVIII/kg）

18 日間の回復期間において、あらゆる影響からの回復を評価した。主要群の動物数は雌雄各 4 匹とし、14 日間の投与期間終了後に屠殺した。回復性評価群は雌雄各 2 匹とし、14 日間の投与期間と 18 日間の回復期間の終了後に屠殺した。第 2 群には回復性評価群を設定しなかった。

本試験中、一般状態観察、体重測定、眼科学的検査、心電図検査、血液学的検査、血小板動態評価、血液化学検査、TK 測定、トロポニン I 評価、抗体分析、尿検査、器官重量測定、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査を実施した。

動物の生死、一般状態、体重、眼底検査所見、心電図、血液学的所見、血液凝固、血小板動態、血液化学所見、トロポニン I 濃度、尿検査所見、肉眼的及び病理組織学的所見に関して、rVWF の単独又はアドベイト併用投与による有害な影響は認められなかった。rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により反復静脈内投与したとき、溶血、血栓及び血小板減少の徴候は認められなかった。

rVWF 投与群（単独投与群及びアドベイト併用投与群）及び Haemate P 投与群の全動物で、ヒト VWF に特異的な抗体の産生が認められた。14 日間の投与後、抗体反応の log2 力価は全投与群で同様であった。緩衝液対照及びアドベイトを投与した動物では、抗 VWF 抗体は検出されなかった。

回復性検討動物では、完全な回復性が認められた。アドベイトの 77 IU FVIII/kg/日を投与した雄 1 匹において、18 日間の回復期間後に、尾腹部の挫傷と背部の液体貯留による巨大な腫脹が認められた。肉眼的病理検査で腰部に出血領域が認められ、この部位では凝固血（血腫）の他、下腹部に及ぶ軽度の浮腫を伴う出血が認められた。アドベイト投与時に検出された抗 FVIII 中和抗体により、血液凝固機能が低下したと考えられる。

rVWF 単独投与群、アドベイト併用投与群及び Haemate P 投与群のすべてにおいて、ヒト VWF に対する中和抗体が検出された。

Haemate P 投与群及びアドベイト投与群（単独投与群及び rVWF 併用投与群）において、抗ヒト FVIII 抗体の産生が認められた。14 日間の投与後、これらの投与群の log2 抗体価は同様であった。rVWF 単独投与群では、抗ヒト FVIII 抗体の産生は認められなかった。

第 4 群（Haemate P）、第 5 群（rVWF＋アドベイト併用）及び第 6 群（アドベイト単独）において、抗 FVIII 中和抗体が検出された。14 日目に Haemate P 投与群の雌雄各 1 匹及び rVWF＋アドベイト投与群の雄 1 匹で認められた活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）の延長は、この抗 FVIII 中和抗体に起因する可能性が考えられる。抗 FVIII 抗体の産生は、ヒトタンパク質を動物に反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。

表 2.6.6-5 に VWF 及び FVIII 曝露後の C_{max} 及び AUC を示す。初回投与後（1 日目）と比較して反復投与後（14 日目）に、アドベイト、rVWF 単独、Haemate P 及び rVWF＋アドベイト投与群にお

いて、VWF:Ag の非補正 C_{max} 及び非補正 AUC の有意な減少（両側 p 値の範囲: <0.0001～0.0010、ANOVA: 有意水準 5%）が認められた。また、初回投与後と比較して反復投与後に、アドベイト、Haemate P（AUC のみ）及び rVWF＋アドベイト投与群（C_{max} のみ）において、FVIII 活性の非補正 C_{max} 及び非補正 AUC の統計学的に有意な減少（両側 p 値の範囲: 0.0003～0.0297、ANOVA: 有意水準 5%）がみられ、Haemate P 投与群の C_{max} の減少は統計学的に有意な減少傾向（両側 p 値 =0.0559、ANOVA: 有意水準 5%）を示していると考えられた。

表 2.6.6-5. カニクイザルに rVWF 及びアドベイトを 14 日間投与したときの C_{max} 及び AUC

Group	Treatment	Nominal dose (IU VWF:RCo/kg + IU FVIII/kg)	Study Day	VWF		FVIII	
				AUC (hr*U/mL)	C_{max}[a] (U/mL)	AUC (hr*IU/mL)	C_{max} (IU/mL)
1	Buffer[b]	0+0	1	14.3	1.79	15.00	2.15
			14	13.3	1.64	13.90	1.75
2	rVWF	50+0	1	18.6 (1.8)	2.90 (1.07)	c	1.97
			14	14.2 (1.21)	1.72 (0.36)	c	1.92
3	rVWF	100+0	1	23.1 (4.02)	4.01 (1.96)	10.10	2.15
			14	16.0 (0.69)	2.00 (0.38)	12.30	1.81
4	Haemate P	100+42	1	36.7	5.03	21.00	3.38
			14	19.8	3.40	11.00	2.10
5	rVWF + ADVATE	100 + 77	1	22.1 (3.64)	3.89 (1.89)	14.00	4.02
			14	15.6 (0.66)	1.98 (0.44)	10.50	1.84
6	ADVATE	0 + 77	1	19.5	2.37	23.5	4.10
			14	16.3	1.91	7.41	1.55

[a] For comparison: the highest observed C_{max} in Clinical Study 071001/Crossover: PK 50 after treatment with rVWF was 1.39 U VWF:Ag/mL
[b] Assay also detects endogenous VWF and FVIII (VWF antigen and FVIII activity were measured). Therefore, total VWF (endogenous monkey VWF + rVWF) are presented here. The baseline adjusted values for rVWF groups are presented in brackets.
[c] No AUC FVIII presented due to missing values

この他に評価したすべてのパラメータに、被験物質の単独投与又は併用投与による影響は認められなかった。

結論

rVWF を単独で（50 又は 100 IU VWF:RCo/kg/日）又はアドベイトとの併用（100 IU VWF:RCo/kg/日＋77 IU FVIII/kg/日）により 14 日間にわたり連日静脈内（ボーラス）投与した結果、有害な影響の所見はみられなかった。したがって、本試験において rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与したときの NOAEL は、100 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

3.4 カニクイザルにおける rVWF の 4 週間静脈内投与及び 2 週間の回復期間を設定した毒性試験（506794 試験）並びにトキシコキネティクス追加評価（179975 試験）

本試験の目的は、カニクイザルに rVWF を 0（溶媒対照群）、100、300 及び 800 IU VWF:RCo/kg の用量で 28 日間連日静脈内投与して毒性を評価し（主要試験群には雌雄各 3 匹の動物を使用）、2 週間の回復期間後に発現した所見の回復性を評価する（回復性試験には対照群の雌雄各 2 匹及び高用量群の雌雄各 2 匹を使用）ことであった。本試験では、以下のパラメータ及びエンドポイントを評価した: 動物の生死、一般状態観察、体重、体重増加量、眼科学的検査、心電図、血圧、呼吸数、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固、血液化学的検査、血液ガス及び尿検査）、サイトカイン分析、補体検査、VWF:Ag のバイオアナリシス、TK 評価、抗薬物抗体分析、FVIII 活性分析、VWF:RCo（von Willebrand 因子リストセチンコファクター）分析、肉眼的病理所見、器官重量、体重比相対器官重量、並びに病理組織学的検査。VWF:Ag 測定法はサルの内因性 VWF と rVWF とを区別しないため、総 VWF（内因性 VWF＋投与した rVWF）に基づき TK を評価した。また、別の TK 試験報告書（179975 試験）では、内因性 VWF 濃度を用いてベースライン値を補正することにより、薬物（rVWF）曝露について特別に評価した。

800 IU VWF:RCo/kg/日を投与した雌雄各 3 匹は、予定投与期間中の 13 日目に投与を終了し、この雌雄各 3 匹を 16 日目に屠殺した。最初は、12 日目に動物 4003M への持続注入中に半眼、呼吸困難及び活動低下が観察された。13 日目には、動物 4004M で持続注入終了後 6 分以内に筋緊張の低下を伴う刺激に対する不調和、不活性及び無反応状態が観察された。これらの動物はいずれも、投与後 1 時間以内に自然回復した。また、13 日目には動物 4504F で投与により生命を脅かすアナフィラキシー反応（重度の浅呼吸、口腔粘膜の暗赤色化、活動低下、筋緊張低下、中等度流涎、閉眼、口吻赤色化）がみられた。アナフィラキシー反応に対する処置が奏功し、この動物は持続注入中止後 3.5 時間までに回復した。

上記所見は免疫原性反応に一致し、カニクイザルに異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応である。

臨床病理学的パラメータの群平均値は、対応する対照群（適用可能な場合）及び投与前値と比較して、800 IU VWF:RCo/kg/日群の 15 日目及び 300 IU VWF:RCo/kg/日群の 4 週目に、以下のような用量依存的な倍数変化が認められた。

- 血小板数減少: 800 及び 300 IU VWF:RCo/kg/日群で、0.5～0.8 倍
- 網状赤血球数増加: 300 及び 800 IU VWF:RCo/kg/日群で、1.2～3.6 倍
- aPTT の軽度延長: 300 及び 800 IU VWF:RCo/kg/日群で、1.1～1.2 倍。各個体の投与前値からの変化は動物 3003M、4003M、4004M 及び 4501F で大きかった。
- これらの変化は回復期間中に完全に回復した。

- 800 IU VWF:RCo/kg/日群で平均 C 反応性タンパク値は、対照群と比較して 1.7～3.3 倍高かった（15 日目に測定、投与前値を測定していないため 4 週目の対照群の値と比較した）。
- 800 IU VWF:RCo/kg/日群で平均 BB 及び SC5b-9 値は、対照群と比較して 1.7～2.3 倍高かった（15 日目に測定、投与前値を測定していないため 4 週目の対照群と比較した）。高濃度の血漿補体タンパク質 BB 及び SC5b-9 は、抗体産生により活性化していることに合致する。

体重、眼科学的検査、血圧、呼吸数測定、血液ガス、心電図、臨床化学的検査、尿検査、サイトカイン、器官重量、肉眼的病理検査及び病理組織学的検査で、被験物質に関連した影響はみられなかった。

rVWF を投与したすべての動物が 2 週目から回復期間を通して結合抗 VWF 抗体を産生し、大部分の動物が rVWF に対する中和抗体を発現した（表 2.6.6-6）。

表 2.6.6-6. 抗 VWF 抗体の発現頻度

Treatment (IU VWF:RCo/kg)	**Week 2**		**Week 4**		**Recovery week 2**	
	Binding	**Neutralizing**	**Binding**	**Neutralizing**	**Binding**	**Neutralizing**
Vehicle control (0)	0/10	NA	0/10	NA	0/4	NA
rVWF (100)	6/6	3/6	6/6	4/6	NA	NA
rVWF (300)	6/6	2/6	6/6	3/6	NA	NA
rVWF (800)	10/10	10/10	NA	NA	4/4	4/4

NA: Not applicable

主要な TK パラメータの平均値（内因性 VWF のベースライン値で補正）を表 2.6.6-7 に要約する。中和抗体が陽性の動物は計算から除外した。

表 2.6.6-7. 主要な TK パラメータの要約（rVWF、ベースライン値補正）

Dose level (IU/kg)	C_0 (mU/mL)	AUC_{0-t} (mU.h/mL)	AUC_{0-t} /D (mU.h/mL)/(IU/kg)
Day 1	Male (n=3)/Female (n=3)	Male (n=3)/Female (n=3)	Male (n=3)/Female (n=3)
100	2260/1960	12500/11300	125/113
300	5760/4810	46000/33400	153/111
800	17000/13800	181000/143000	226/178
Day 16	Male/Female	Male/Female	Male/Female
100	2350 (n=2)*/1530 (n=1)*	8840 (n=2)*/8910 (n=1)*	88.4 (n=2)*/89.1 (n=1)*
300	4930 (n=1)*/5500 (n=3)	10700 (n=1)*/20800 (n=3)	35.6 (n=1)*/69.4 (n=3)
Day 28	Male/Female	Male/Female	Male/Female
100	1420 (n=2)*/NC	1430 (n=2)*/NC	14.3 (n=2)*/NC
300	NC/4570 (n=3)	NC/13900 (n=3)	NC/46.2 (n=3)

* One or two animals exhibiting ADA positive responses were excluded from descriptive statistics calculations
NC: Not calculated - All three animals exhibiting ADA positive responses were excluded from descriptive statistics calculations

16 日目には、結合抗体が陽性であった動物での投与後 0 時点の濃度（C_0）及び AUC_{0-t} 値は、抗体反応のない動物（1 日目）での対応する値よりも概して低かった。28 日目には、結合抗体が陽性であった動物での C_0 値は、同投与量で抗体反応のない動物（1 日目）での対応する値よりも概して低かった。反復投与後の rVWF への曝露量（C_0 及び AUC_{0-t} に基づく）は、VWF に対する抗体産生と一致して大幅に減少した。28 日目には、大部分の動物（7/12）に中和抗体の産生が認められ、これを反映して rVWF の曝露量は 1 日目と比較して顕著に低かった（179975 試験）。

全投与量で静脈内緩徐ボーラス投与又は持続注入後のいずれにおいても、C_0、C_{max} 又は AUC_{0-t} に性差はみられなかった。

FVIII 活性のベースライン値（1.3～1.4 IU FVIII/mL）は、rVWF の反復投与によりわずかに低下した。抗 VWF 抗体が存在するため、内因性 VWF と FVIII との結合阻害によって内因性 FVIII が部分的に不安定化/分解した可能性が考えられる。

VWF:RCo のベースライン値は、被験物質の注入後に用量依存的に増加し、その後、低下した。反復投与後には VWF:RCo の平均値が 1 日目よりも低く、これはヒト rVWF タンパク質に対する抗体産生に起因する可能性が考えられた。

結論

カニクイザルに rVWF を 1 日 1 回静脈内反復投与した結果、800 IU VWF:RCo/kg/日で 1 匹の動物に生命を脅かすアナフィラキシー反応が発現し、2 匹にそれよりも軽度のアレルギー反応が認められた。15 日目の測定では、これら 3 匹の動物は結合抗 VWF 抗体価が>10 であり、中和抗体が最高値であった。総合すると、これらの所見は、高用量を投与した個体におけるアレルギー反応を示唆しており、このような免疫反応は、サルに反復投与した異種タンパク質（この場合、ヒト rVWF）に対する抗体産生による、予想されるものであった。

したがって、アナフィラキシー反応及びアレルギー反応等の免疫原性反応に関する NOAEL は、300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。800 IU VWF:RCo/kg/日でのアナフィラキシー反応及びアレルギー反応の発現、全用量での中和抗体の産生、並びに 100 又は 300 IU VWF:RCo/kg/日を反復投与した大多数の動物での rVWF の曝露量の実質的な減少により、4 週間を超える投与期間のサル反復投与毒性試験の実施は困難と判断された。

rVWF の毒性の可能性については、アナフィラキシー反応及びアレルギー反応を除いて、800 IU VWF:RCo/kg/日で 2 週間、300 IU VWF:RCo/kg/日までは 4 週間にわたり、忍容性が良好であった。被験物質は血液凝固経路を標的とし、影響は主に抗体産生及び関連する補体、急性期のタンパク質、血液学的指標並びに血液凝固時間の変化として認められた。これらの結果及び本 4 週間投与試験の観点から、毒性学的エンドポイントに関する NOAEL は 300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

4. 遺伝毒性試験

通常、rVWF 等のバイオテクノロジー応用医薬品の安全性評価に遺伝毒性試験は適用されないが、遺伝毒性試験を実施して、すべての成分を含む本 rVWF 製剤の遺伝毒性を評価した。

4.1 rVWF: ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（BAX22 試験）

ネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）により、rVWF の変異原性を検討した。

被験物質 rVWF を非希釈又は緩衝液で希釈して、以下の濃度で試験した。

- 100、33、11、3.7 及び 1.2 µL/plate、代謝活性化系非添加
- 100、33、11、3.7 及び 1.2 µL/plate、代謝活性化系として Aroclor-1254 誘導ラット肝ミクロソーム S9 mix 添加

試験は細菌及び被験物質（及びミクロソーム）の溶液を、先行培養なしにプレート上で接触させる「直接プレート取り込み法」に従って実施した。

試験系として、ネズミチフス菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 及び TA1535 を使用した。陰性対照及び陽性対照を含めた。rVWF の溶媒を陰性対照として使用した。更に、活性成分と溶媒の影響を区別するため、無処置対照群として脱イオン水を 100 µL/plate で試験した。独立した試験を反復して実施した。

すべての陽性対照群で突然変異発現頻度が有意に上昇し、試験系の感度が証明された。

技術的に可能な溶液の最高濃度 100 µL/plate まで、細菌に対する被験物質又は対照物質（緩衝液）の毒性は観察されなかった。被験物質は透明な溶液であった。いずれの濃度においても、被験物質又は対照物質（溶媒）の沈殿は認められなかった。

試験に用いたいずれの濃度又は菌株においても、閾値（TA98 及び TA1535 については対照群の 250%、TA97a、TA100 及び TA102 については対照群の 167%）を超える突然変異発現頻度の増加は観察されなかった。代謝活性化はこれらの結果に影響を及ぼさなかった。

本試験で得られた結果から、エームス試験の試験菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 及び TA1535 で代謝活性化系添加の有無にかかわらず、rVWF は 100 µL/plate まで変異原性を示さなかった。この濃度は、本試験系で評価した被験物質溶液の技術的に可能な最高濃度である。

4.2 rVWF: ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 哺乳類細胞染色体異常試験（BAX0013 試験）

rVWF の染色体異常誘発能を評価するため、培養ヒトリンパ球を用いた *in vitro* 染色体異常試験を実施した。

全血培養したヒトリンパ球にフィトヘマグルチニンを添加して分裂を刺激し、ラット肝由来 S9 mix の非存在及び存在下で被験物質に曝露した。溶媒及び陽性対照の培養も作製した。培養期間終了の 2 時間前に Colcemid®を使用して細胞分裂を停止させ、分裂中期細胞の染色体損傷を検査できるように、細胞を採取してスライドを作製した。rVWF の培養ヒトリンパ球に対する毒性を評価するため、被験物質、溶媒対照及び注射用滅菌水で処理したすべての培養について分裂指数を算出した。加えて、0.9%（w/v）滅菌食塩水を用いた対照培養も同時に評価した。これらのデータを基に、分裂中期細胞の分析に以下の濃度を選択した。

試験 1

- S9 mix 非存在下で 3 時間処理、18 時間培養: 3.15、6.3 及び 12.6 IU VWF:RCo/mL
- S9 mix（2% v/v）存在下で 3 時間処理、18 時間培養: 3.15、6.3 及び 12.6 IU VWF:RCo/mL

試験 2

- S9 mix 非存在下で 21 時間連続処理: 3.15、6.3 及び 12.6 IU VWF:RCo/mL
- S9 mix（5% v/v）存在下で 3 時間処理、18 時間培養: 3.15、6.3 及び 12.6 IU VWF:RCo/mL

S9 mix 非存在及び存在の両条件下で、両試験のいずれの用量においても、rVWF は溶媒対照群と比較して統計学的に有意な染色体異常を有する分裂中期像の出現頻度増加を誘発しなかった。いずれの試験でも、分裂中期細胞の分析において倍数体細胞の割合の統計学的に有意な増加はみられなかった。陽性対照物質はすべて、統計学的に有意な（$P < 0.001$、片側 Fisher の直接確率検定）染色体異常細胞の出現頻度の増加を誘発し、試験系の感度及び S9 mix の効果が示された。

以上より、上記試験条件下の *in vitro* 細胞遺伝学試験系において、rVWF が構造的染色体異常の出現頻度の増加を誘発する所見はなかった。

4.3 rVWF: マウス小核試験（BAX24 試験）

染色体損傷又は分裂装置に対する障害の結果として、被験物質により誘発される小核形成の可能性を *in vivo* 試験系で検出するために、本試験を実施した。

1 群 5 匹の雄 Crl:NMRI BR マウスに、158、315 又は 631 IU VWF:RCo/kg の rVWF をクエン酸緩衝液に溶解して、尾静脈内に単回持続注入した。陰性対照の 2 群（両群ともクエン酸緩衝液を静脈内

投与）及び陽性対照の 1 群（シクロホスファミド、脱イオン水に溶解して経口投与）も試験に加えた。高用量群で予期しない死亡例が出た場合の交換用に、予備動物として雄 5 匹の 1 群に 631 IU VWF:RCo/kg を投与した。投与液量は、陰性対照群及び被験物質投与群では体重当たり 5 mL/kg、陽性対照群では 10 mL/kg とした。

Directive 2000/32/EC, B.12 及び OECD ガイドライン 474（1997）に準拠して、骨髄細胞の調製及び検査を実施した。

シクロホスファミド（陽性対照）は小核を有する多染性赤血球（MPEs）を誘発したことから、本試験で検討するエンドポイントのために使用した試験系の感度が証明された。

すべての群のいずれの動物でも有害反応は認められなかった。全動物が予定した試験終了時まで生存した。

被験物質の投与 24 及び 48 時間後に、いずれの投与量でも細胞毒性は認められなかった。すべての値は対応する陰性対照の背景データの範囲内であった。

被験物質投与群の 158、315 又は 631 IU VWF:RCo/kg では、投与 24 及び 48 時間後に対応する陰性対照群と比較して、いずれの動物でも特記すべき又は統計学的に有意な MPEs の増加はみられなかった。すべての値は対応する陰性対照の背景データの範囲内にあった。被験物質投与群の動物では、投与 24 及び 48 時間後に対応する陰性対照群と比較して、特記すべき又は統計学的に有意な小核を有する正染性赤血球の増加もみられなかった。

5. がん原性試験

rVWF は遺伝子組換えタンパク質であり、変異原性及び染色体異常を誘発するとは考えられない。遺伝毒性試験において rVWF は遺伝毒性を示さないことが確認された。現行の ICH S6(R1)（バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価）ガイドラインで言及されているとおり、がん原性に対する懸念がない限り、バイオテクノロジー応用医薬品のがん原性試験は必要とされない。したがって、rVWF にがん原性の懸念はないため、がん原性試験は実施していない。

6. 生殖発生毒性試験

6.1 受胎能、初期胚及び胚・胎児発生毒性試験

申請者は rVWF の生殖発生毒性のリスクは低いと考える。それゆえ、以下の考察に基づき、rVWF の生殖発生毒性に関する非臨床試験は実施していない。

- ラット及びカニクイザルでの反復投与毒性試験において、ヒト VWF 及びヒト FVIII に対する抗体が観察され、ウサギではヒト VWF に対する抗体が認められている。抗体産生は、異種タンパク質を動物に反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。抗体は単回投与後と比較して、反復投与後に全身曝露量を減少させる。
- rVWF はげっ歯類の ADAMTS13 による切断作用に対して感受性が低いため（[22]、RD_VB_110702 試験）、ヒトでの状況とは異なる過剰な薬理作用が誘導される可能性がある。

- 分子量が 500 Da を超える薬剤は胎盤通過性が不十分であり、1000 Da を超える薬剤は胎盤通過性が極めて不良であることがよく知られている[21]。rVWF は分子量が 500 kDa から最大 10000 kDa 以上の多量体を形成する大糖タンパク質である。したがって、受胎産物との接触又は DNA を含む細胞内器官との相互作用はあるとしてもごく限られると予想される。ヒトの *ex vivo* 胎盤移行性試験（Plac-lab-12-12 試験）で、rVWF はヒト胎盤を通過しないことが示されている。
- ヒトの内因性タンパク質と同一の分子構造を有し、患者を正常な生理的状態に戻すことを意図したレベルで投与されるタンパク質補充療法剤は生殖発生毒性に対する懸念が少ないと考えられる[15]。
- 反復投与毒性試験において、雌雄の生殖器官に有害所見は認められなかった。
- 妊娠は血栓形成状態を誘起し、この血液凝固亢進状態の病理学的増強がますます流産及び胎盤介在性合併症に関連している[7]。この血液凝固亢進状態はまた、正常動物に存在する血液凝固因子に加えて高濃度の血液凝固因子を投与したとき、正確かつ予測性のある生殖発生毒性のリスク評価に影響を及ぼす可能性がある。したがって、rVWF を投与した動物で生殖発生毒性試験を実施することは、臨床における生殖リスクの評価に適切ではないと考えられる。

以上から、生殖発生毒性に関する非臨床試験は実施しなかった。

6.2 出生後及び幼若動物の毒性試験

典型的な成人の VWF 多重体パターンに至るまでの成熟は、健康な出生児では生後 3 週間で達成される[14]。満期出産乳児の血漿中 VWF 濃度は成人よりもわずかに高いが、VWF 濃度は生後 6 カ月で徐々に低下する[1, 13]。生後 1 カ月から 1 年の間で血液凝固第 V、VIII 及び XIII 因子レベルは成人の値に類似する[4]。実際、乳児の血液凝固因子のほとんど（フィブリノーゲンを含む）は 6 カ月齢までに成人の値付近まで達しており、PT 及び aPTT は正常範囲内にある[1]。

乳児においてビタミン K 依存性血液凝固因子レベルは低下するが、全体としてこれらのレベルの違いにより血栓性合併症のリスクは低減すると考えられる[2]。加えて、新生児及び小児の ADAMTS13 活性レベルは成人と同程度であるため、ADAMTS13 の VWF 切断活性は成人に類似している[19]。

以上の知見に基づき、幼若動物を用いた非臨床毒性試験は実施しなかった。成人と小児集団との間で VWF の薬力学、PK 及び安全性に関連する違いは予想されない。rVWF 投与に関連する有害事象は、未成熟、若しくは成熟動物の試験で検出できるか又は成人の安全性データから外挿可能である。

7. 局所刺激性試験

7.1 ウサギにおけるヒト rVWF の単独投与及びアドベイトとの併用投与による局所刺激性の検討（PV2000701 試験）

本試験の目的は、ウサギに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内（臨床投与経路）、動脈内又は静脈周囲（誤投与の可能性のある経路）投与し、その局所刺激性を評価することであった。

rVWF 1 ロットの単独投与及びアドベイト併用投与をそれぞれの緩衝液（溶媒対照）及び等張食塩水（陰性対照）と比較した。各被験物質の投与液量は、静脈内投与又は動脈内投与時には 10 mL/匹（2 分間）、静脈周囲投与時には 0.5 mL/匹（ボーラス投与）とし、4 匹（雌雄各 2 匹）の右耳に投与した。その結果、本試験に供した動物は合計 48 匹となった。同量の等張食塩水を陰性対照として、同じ投与経路によりそれぞれの動物の左耳に投与した。

動物の行動を観察し、注射部位で起こりうる変化について、投与後最初の 30 分間、その後 6 時間まで間欠的に、更に 24、48 及び 72 時間に肉眼的に調べた。病理組織学的検査を観察期間終了時に実施した。

観察期間中、いずれの動物においても行動変化は認められなかった。静脈内投与時（臨床投与経路）又は動脈内投与時（誤投与の可能性のある経路）には、被験物質又は対照物質のいずれにおいても、肉眼的変化は認められなかった。静脈周囲投与時（誤投与の可能性のある経路）には、投与部位の中心部に投与手技自体によって生じた小血腫のみが認められた。これ以外には、局所組織刺激に関する臨床所見はなかった。

rVWF の単独投与群又はアドベイトとの併用投与群において、対照群との病理組織学所見の差は認められなかった。この結果は、試験した用量レベルで rVWF を単独で又はアドベイトとの併用によりウサギに静脈内、動脈内又は静脈周囲投与したとき、局所刺激性及び血栓形成性の増加がないことを示している。

8. その他の毒性試験

8.1 Balb/c マウスにおけるヒト rVWF 及びヒト pdVWF の比較免疫原性（FS-IM00907 試験）

Balb/c マウスを用いて免疫原性試験を実施し、ヒト pdVWF との比較による rVWF の相対的な免疫原性を評価した。また、アドベイトを rVWF 又は pdVWF と併用投与したときのアドベイトの相対的な免疫原性についても評価した。なお、本試験のために高純度ヒト pdVWF 製剤を作製した。

10 匹（雌雄各 5 匹）から成る投与群を使用した。表 2.6.6-8 に示すとおり、各マウスに被験物質、対照物質又は陰性対照のいずれかを 4 回静脈内投与した。投与は 1 週間間隔で行った。最終投与の 1 週間後、各マウスから血液試料を採取し、ヒト VWF 及びヒト FVIII に対する抗体の有無を検討した。

表 2.6.6-8. FS-IM00907 試験の試験デザイン

Group	Treatment per dose	Total volume and application route
1	10 µg rVWF	200 µL i.v.
2	10 µg pdVWF	200 µL i.v.
3	50 µg rVWF	200 µL i.v.
4	50 µg pdVWF	200 µL i.v.
5	Formulation buffer	200 µL i.v.
6	50 µg rVWF premixed with 0.464 µg rFVIII	200 µL i.v.
7	50 µg pdVWF premixed with 0.464 µg rFVIII	200 µL i.v.
8	50 µg rVWF 60 min later: 0.464 µg rFVIII	200 µL i.v. 200 µL i.v.
9	50µg pdVWF 60 min later: 0.464 µg rFVIII	200 µL i.v. 200 µL i.v.
10	0.464 µg rFVIII	200 µL i.v.

低用量の VWF（10 µg/回）を投与したとき、pdVWF により誘導された抗 VWF 抗体の力価は rVWF と比較して低く、統計学的有意差が認められた（p=0.0012、両側並べ替え検定）。高用量の VWF（50 µg/回）を投与したとき、rVWF と pdVWF により誘導された抗 VWF 抗体の力価に差は認められなかった。

rVWF 投与群においては、検出可能な力価の抗 FVIII 抗体は産生されなかった。しかし、pdVWF 投与群の 10 匹中 1 匹（低用量の pdVWF）及び 10 匹中 2 匹（高用量の pdVWF）では、低力価（低用量の pdVWF 群では 1 log2 力価、高用量の pdVWF 群では 1 及び 6 log2 力価）の抗 FVIII 抗体の産生が認められた。抗 FVIII 抗体の産生は、おそらく VWF 製剤中の FVIII によるものと考えられた。

Balb/c マウスに対して、rVWF 又は pdVWF との併用によりアドベイトを 4 回静脈内投与した。アドベイトは VWF とあらかじめ混合して投与するか、VWF 投与の 60 分後に投与した。アドベイト＋rVWF 併用投与群とアドベイト＋pdVWF 併用投与群との間で、抗 VWF 抗体の力価に有意差は認められなかった。また、アドベイト＋rVWF 併用投与群とアドベイト＋pdVWF 併用投与群との間で、抗 VIII 抗体の力価に有意差は認められなかった。

Balb/c マウスにおいて、rVWF と pdVWF の免疫原性に生物学的意義のある差は認められなかった。低用量の rVWF 群と pdVWF 群との間で認められた統計学的有意差は、rVWF と pdVWF の実組成の差に起因すると考えられる（例えば、rVWF は超巨大マルチマーを含有する）。また、rVWF と pdVWF は原材料物質が異なるため（rVWF は CHO 細胞、pdVWF はヒト血漿プール）、その不純物が Balb/c マウスの免疫原性を調整する程度が異なっている可能性が考えられる。更に、rVWF はクローンタンパク質であるのに対し、pdVWF は巨大な血漿プールから分離されるため、異なる多

形の VWF の混合物である可能性が高い。pdVWF の異なる多形により、Balb/c マウスにおいて、低用量で免疫原性に差が生じた可能性が考えられる。

アドベイトを rVWF 又は pdVWF と併用投与したとき、アドベイトの免疫原性に差は認められなかった。更に、アドベイトを rVWF 又は pdVWF とあらかじめ混合して投与したときと、rVWF 又は pdVWF の投与から 60 分後に投与したときとの間で、アドベイトの免疫原性に差は認められなかった。これらの結果から、rVWF は Balb/c マウスにおけるアドベイトの免疫原性を増強しないことが示された。

8.2 2 種類のコンベンショナル E17 血友病マウス及び新規の E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウスにおけるアドベイトの免疫原性に対する VWF とアドベイトとの併用投与の影響（IMM_R&D_017_11 試験）

本試験の目的は、血友病 A 患者への rVWF の使用をサポートするため、3 種類の異なる血友病マウスモデル（E17 血友病 Balb/c マウス、E17 血友病 C57BL/6J マウス及び E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウス）において、アドベイトの免疫原性に対する VWF とアドベイトとの併用投与の影響に関する試験データを収集することであった。

E17 血友病 Balb/c マウス及び E17 血友病 C57BL/6J マウスにおける FVIII に対する結合抗体産生

E17 血友病 Balb/c マウス（1 群当たり雄 9 匹、4 群）又は E17 血友病 C57BL/6J マウス（1 群当たり雄 9 匹、4 群）にアドベイト（200 ng/匹）を単独で又は VWF（ヒト rVWF、高純度ヒト pdVWF 又は海外既承認の pdVWF である Wilfactin、2 μg/匹）との併用により 1 週間間隔で 8 回静脈内投与した。4 回及び 8 回投与後 1 週目に採血し、得られた血漿について FVIII に対する結合抗体の有無を ELISA で検討した。

本試験に用いた 2 種類の血友病マウスモデルの試験結果より、検討したいずれの VWF でもアドベイトと併用投与したとき、アドベイトの免疫原性を増加させなかった。

E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウスにおける FVIII に対する結合抗体産生

E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウス（1 群当たり雌雄各 5 匹、4 群）に rVWF（10 又は 50 μg/匹）を単独で、アドベイト（464 ng/匹）を単独で又は rVWF とアドベイトとの併用（50 μg/匹＋464 ng/匹）により、1 週間間隔で 8 回静脈内投与した。E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウスは天然のヒト FVIII に対して中枢性免疫寛容を示すが、高用量の天然の FVIII を投与した場合又は免疫原性の高い FVIII 製剤を投与した場合に限り、ヒト FVIII に対する抗体を産生する。8 回投与後 1 週目に採血し、得られた血漿について FVIII に対する結合抗体の有無を ELISA で検討した。

E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウスにおいて、rVWF をアドベイトと併用投与したとき、アドベイトの免疫原性を増加させなかった。更に、rVWF は FVIII に対する免疫寛容を破綻させなかった。rVWF の低用量を投与した動物 1 例における抗体産生は外れ値と考えられた。

結論

rVWF は、これらの試験で用いた 3 種類のいずれの血友病マウスモデルにおいても、アドベイトの免疫原性に悪影響を及ぼさなかった。

8.3 ウサギにおける 2 週間静脈内投与毒性試験（528575 試験）

ウサギで生殖発生毒性試験を実施することの実現可能性を評価し、試験に適切な用量レベルを決定するため、反復投与検討試験を実施した。その結果、抗体産生、抗体に起因する所見及び曝露量減少のため、反復投与による更なる毒性試験の実施は適切ではないと考えられた（2.6.7、表 2.6.7-17-2）。

8.4 ヒト rVWF の ADAMTS13 介在性タンパク質分解の動物種依存的変動性（RD_VB_110702 試験）

本試験の目的は、非臨床試験系として用いた異なる動物種の血漿中 ADAMTS13 に対する rVWF の感受性を特徴付けることであった。

異なる動物種の ADAMTS13 に対する rVWF の感受性を *in vitro* で検討した。マウス（C57BL/6J マウス、VWd マウス、ADAMTS13 欠損マウス）、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ブタ及びサルの血漿を rVWF（濃度：1 U VWF:Ag/mL）と共に 37ºC で 24 時間インキュベート（タンパク質変性条件）し、残存コラーゲン結合活性及び ADAMTS13 に特異的な切断生成物を測定することにより、また VWF マルチマーの解析により、rVWF の感受性を評価した。その結果、異なる動物種の ADAMTS13 に対するヒト rVWF の感受性に顕著な違いがあることが明らかになった。ウサギ及びサルの血漿中 ADAMTS13 は rVWF を切断でき、ブタ及びイヌの血漿中 ADAMTS13 は rVWF の切断程度がより弱く、一方、ラット、モルモット及びマウスの血漿には rVWF の切断活性が示されなかった。

本試験の後半部分では、マウス及びウサギに極めて高用量の rVWF を投与し（マウス：2000 及び 4000 IU VWF:RCo/kg、ウサギ：1200 IU VWF:RCo/kg）、特定の抗体を用いた免疫ブロット法で血漿試料中の切断生成物を可視化することにより、ADAMTS13 介在性のタンパク質分解を評価した。その結果、VWd マウスにおいては rVWF の切断はないか、又は軽微であった。ADAMTS13 欠損マウスにおいては rVWF の切断は認められなかったが、少量のヒト rADAMTS13（19.4 µg/kg）をヒト rVWF（2000 IU VWF:RCo/kg）と併用投与したとき、これらの動物に軽微な切断が認められた。一方、rVWF はウサギの ADAMTS13 により十分に切断され、*in vivo* と *in vitro* で得られたデータの良好な相関性が示された。

8.5 rVWF 製剤に含まれる添加物の安全性評価

rVWF 製剤は、添加物としてクエン酸三ナトリウム二水和物、D-マンニトール、トレハロース二水和物、グリシン及びポリソルベート 80 を含有している。本剤の投与時、これらの添加物の静脈内投与における予定臨床 1 日最大投与量は、いずれも本邦での使用前例の範囲内にある。したがって、これらの添加物の臨床使用における安全性は確保されていると考えられる。しかし、ポリソル

ベート 80 に関連する過敏性反応のリスクの可能性のため（2.5.6.3.6 添加物の影響）、ポリソルベート 80 に関して入手可能な毒性情報を以下に評価する。

rVWF の予定臨床 1 日最大投与量 200 IU VWF:RCo/kg（8 時間間隔で 80 + 60 + 60 IU VWF:RCo/kg）、並びに rVWF 及びポリソルベート 80 のそれぞれのバイアル濃度 130 IU VWF:RCo/mL 及び [redacted] mg/mL（3.2.P.1 Description and Composition of the Drug Product）に基づき、ポリソルベート 80 の予定臨床 1 日最大投与量は、体重 60 kg の患者で約 9 mg と算出される。9 mg/日は、「医薬品添加物事典 2016」[24]に報告されている静脈内投与経路における 1 日最大投与量（500 mg）の約 1/55 である。

rVWF の毒性は動物試験で評価されている。ポリソルベート 80 の体重当たりの試験用量及び予定臨床用量を表 2.6.6-9 に示す。

表 2.6.6-9. rVWF の急性毒性試験：
マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒトにおけるポリソルベート 80 の曝露量

	Mouse[a] 4000 IU VWF:RCo /kg BW	**Rat[a] 1400 IU VWF:RCo/kg BW**	**Rabbit[a] 1200 IU VWF:RCo/kg BW**	**Monkey[a] 1200 IU VWF:RCo/kg BW**	**Human[b] 80 IU VWF:RCo/kg BW**
Polysorbate 80 (mg/kg)	2.7	0.95	0.82	0.82	0.062

[a] Based on lot [redacted], used in the acute toxicity studies (126 IU VWF:RCo/mL) (PV1940601, PV1990701, PV1930601, PV1950601, BAX0009, BAX0011)
[b] Based on a clinical dose of 80 IU VWF:RCo/kg rVWF and a concentration of 130 IU VWF:RCo/mL (3.2.P.1 Description and Composition of the Drug Product)

ポリソルベート 80 の毒性リスク評価が別途得られている[18]。ポリソルベート 80 は、食品、化粧品及び医薬品の添加物として広く用いられている非イオン界面活性剤である。ポリソルベート 80、並びに関連物質であるポリソルベート 20、40 及び 60 は、FDA 添加物一覧[9]に掲載されているように、経口及び非経口適用の様々な医薬品に添加物として用いられている。ポリソルベート 80 は安全性に関して広範に試験されている。WHO JECFA は許容 1 日摂取量 25 mg/kg/日と設定し、本邦では 20、60、65 及び 80 を含む数種類のポリソルベートの合計がこれよりも低い 10 mg/kg/日とされた[11, 12]。高用量のポリソルベート 80 を含む医薬品の例はアミオダロン[6]及び Eraxis[17]であり、アミオダロンではポリソルベート 80 の 1 日投与量は 70 kg の患者で 2100 mg/日に達する。本邦では、アミオダロン製剤中に含まれるポリソルベート 80 の 1 日最大静脈内投与量は、2500 mg/日と算出される[25]。最高用量のポリソルベート 80 を含む小児用医薬品は M.V.I.® Pediatric[3]である。本非経口総合ビタミン剤は新生児及び早産児に適応される。処方情報に従い投与するとき、体重 1 kg の早産新生児は 1 日当たり最高 32.5 mg のポリソルベート 80 に曝露される可能性がある。新生児に対する本総合ビタミン剤の毒性の可能性は、3 カ月間に M.V.I.製剤を介して 33 mg/日ポリソルベート 80 を投与された出生時体重 1500 g 未満の乳児 30 人において検討された。M.V.I.® Pediatric を投与された乳児に毒性作用は観察されなかった。したがって、M.V.I.® Pediatric 治療によりもたらされる

ポリソルベート 80 量は最高 32.5 mg/kg/日となり、これは最も若年の患者集団に対する安全な投与量を表すと考えられる。

2012 年に欧州医薬品庁の小児用医薬品委員会（EMA PDCO）は、処方製剤ワーキンググループ（FWG）が医薬品中最高 1～3 mg/kg/用量のポリソルベート 80 の使用に合意したと通達した。それゆえ、医薬品中のポリソルベート 80 の最高用量として 1～3 mg/kg/用量が推奨される。rVWF の 80 IU VWF:RCo/kg から算出される 0.062 mg/kg 用量のポリソルベート 80 は、当該最高推奨用量の 1/48～1/16 である。

しかし、ポリソルベート 80 はイヌで非特異的にヒスタミン遊離を引き起こし、また、ヒトにより摂取されたとき実質的に非毒性であることが示されているにもかかわらず、ポリソルベート 80 を含む静脈内投与治療を受けた数名の患者における重度の過敏症反応と関連している[8, 10, 16, 20]。過敏症反応の原因の可能性として、ポリソルベート 80 による補体活性化が仮定されている[23]。本公表論文中、*in vitro* で補体系の有意な活性化を示す濃度は、1%ポリソルベート 80（10 mg/mL）以上であった。更に、Weiszhar らは試験した 1%ポリソルベート 80 よりも低いすべての濃度では、*in vitro* で補体系の有意な活性化は認められなかったことを示している。体重当たりの仮定血液量 77.8 mL/kg[18]に基づくと、rVWF の 80 IU VWF:RCo/kg から算出される 0.062 mg/kg 用量のポリソルベート 80 は血液 1 mL 当たり 0.001 mg 未満のポリソルベート 80 と算出される。したがって、患者におけるポリソルベート 80 の算出濃度は、*in vitro* でヒト補体系が活性化される濃度よりもはるかに低い。

9. 考察及び結論

9.1 単回投与毒性試験

rVWF の単独又はアドベイトとの併用投与による 6 つの単回投与毒性試験は、異なる 3 系統のマウス（ADAMTS13 欠損マウス、C57BL/6J マウス及び VWd マウス）、ラット、ウサギ並びにカニクイザルを用いて実施した。ラット、ウサギ及びカニクイザルでは毒性徴候は観察されなかった。NOAEL を表 2.6.6-10 にまとめる。これらの結果より、有害な影響が認められなかった試験用量と臨床用量（80 IU VWF:RCo/kg）との間に、十分に大きな安全域が確保されている。

表 2.6.6-10. 単回投与毒性試験における NOAEL

Species	**Study Number**	**NOAELs and safety margins to highest clinical dose (80 IU VWF:RCo/kg + 62 IU FVIII/kg)**		
		rVWF alone (IU VWF:RCo/kg BW)	**rVWF + ADVATE (IU VWF:RCo/kg BW + IU FVIII/kg BW)**	**Safety Margin**
ADAMTS13 knock out mouse	PV1940601	250	250 + 192	3.1
C57BL/6J mouse	PV1990701	250	250 + 192	3.1
VWd mouse	PV1930601	500	500 + 385	6.3
rats	PV1950601	1400	1400 + 1077	17.5
rabbits	BAX0009	1200	600 + 462	7.5

Species	Study Number	NOAELs and safety margins to highest clinical dose (80 IU VWF:RCo/kg + 62 IU FVIII/kg)		
		rVWF alone (IU VWF:RCo/kg BW)	rVWF + ADVATE (IU VWF:RCo/kg BW + IU FVIII/kg BW)	Safety Margin
Cynomolgus monkeys	BAX0011	1200	600 + 462	7.5

rVWF をウサギ及びカニクイザルに単回投与したときの TK を評価した。カニクイザルでは、VWF:Ag 測定法はサルの内因性 VWF と rVWF とを区別しない。そのため、投与薬物 rVWF への曝露量（C_{max} 及び AUC に基づく）は、投与前の内因性 VWF 濃度を差し引いてベースライン値を補正することによっても評価した。ウサギでは、VWF:Ag 測定法は内因性 VWF と交差反応しない（又はごくわずかしか交差反応しない）ため、内因性ベースライン値の補正は不要であった。

異なる用量の被験物質に対するこれらの動物の曝露が確認された。投与された rVWF は血漿中に残存し、V_{ss} の結果から示されるとおり、末梢組織に広く分布せず、得られた AUC 又は C_{max} に相当する全身曝露量において毒性作用は認められなかった。

毒性徴候は過剰な薬理作用として評価され、程度の違いがあるものの、すべての系統のマウスにおいて観察された。ADAMTS13 欠損マウスは rVWF 投与に対する感受性が比較的高く、これはおそらく超巨大 VWF マルチマーの切断に必要なマウス ADAMTS13 を完全に欠失しているためである。内因性 VWF を有しない VWd マウスでは、毒性徴候は顕著ではなかった（死亡例なし、より軽度の臨床症状及びより低重症度の病理組織学的所見）。活性対照物質として用いた Haemate P を投与したマウスに所見は観察されなかった。

これらの動物種間の違いは、マウスの内因性 ADAMTS13 は、Tyr^{1605}-Met^{1606} で rVWF サブユニットを十分に切断できず、超巨大 VWF マルチマーをタンパク質分解できないという事実により説明できる。ヒト rVWF はマウス ADAMTS13 のタンパク質分解作用に対して抵抗性を示す。このことは、マウスを含む様々な動物の血漿へのヒト rVWF の曝露、若しくは残存 VWF 活性の測定又は多量体構成の視覚化により *in vitro* で示されている。ヒト rVWF のマウス ADAMTS13 に対する抵抗性は、rVWF をマウスに注入した後の *ex vivo* でも示されている。複数の採血時点で得られた血漿試料には、ADAMTS13 活性により Tyr^{1605}-Met^{1606}（C 末端 176 kD 及び N 末端 140 kD）で切断後の VWF 断片は何ら認められず、*in vivo* でのマウス ADAMTS13 に対する rVWF の抵抗性と一致している。pdVWF は、VWF の A2 ドメインに存在する Tyr^{1605}-Met^{1606} で切断されたサブユニットから成る。正常 C57BL/6J マウス及び VWd マウスは、完全なサブユニットを有する rVWF を切断できないマウス ADAMTS13 を保有している。そのため、rVWF をマウスに投与しても、rVWF は代謝されず、結果として巨大な VWF マルチマーになる。

一方、rVWF をウサギに投与した結果、モノクローナル抗体を用いた免疫ブロットにより断片の出現を伴う VWF サブユニットがみられ、予想された切断パターンが認められた。

9.2 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は複数の動物種を用いて以下のとおり実施した。

- ラットでは、rVWF を 1400 IU VWF:RCo/kg の用量で単独（主要群では雌雄各 10 匹、回復性評価群では雌雄各 6 匹）又はアドベイトの 1080 IU FVIII/kg と併用（主要群では雌雄各 10 匹、回復性評価群では雌雄各 6 匹）投与した。
- VWd ブタ 1 匹では、rVWF を 100 IU VWF:RCo/kg の用量でアドベイトの 77 IU FVIII/kg と併用投与した。
- カニクイザルでは、rVWF を 50 IU VWF:RCo/kg（雌雄各 4 匹）又は 100 IU VWF:RCo/kg（主要試験では雌雄各 4 匹、回復性評価群では雌雄各 2 匹）の用量で単独、若しくは 100 IU VWF:RCo/kg の用量でアドベイトの 77 IU FVIII/kg と併用（主要群では雌雄各 4 匹、回復性評価群では雌雄各 2 匹）投与した。
- 更にカニクイザルでは、rVWF を 100、300 又は 800 IU VWF:RCo/kg の用量で（主要群では雌雄各 3 匹、回復性評価群では雌雄各 2 匹）投与した。

ラットでは、14 日間連日反復投与した結果、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、尿検査、血液凝固及び血清生化学パラメータ、血小板凝集、並びに肉眼的病理像に毒性変化は認められなかった。軽度の再生性溶血性貧血、血小板減少、炎症性病変（心臓、肝臓、まれに唾液腺）及び髄外造血の増加（脾臓）が観察された。心臓及び唾液腺の病変は虚血性障害に一致していた。投与に関連したすべての変化は 15 日間の回復期間後に回復した。rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により投与したラットでは、ヒト VWF 及びヒト FVIII に対する特異的な抗体が産生された。

反復投与毒性試験で観察された変化は次の所見の結果と考えることができる。

- 特に反復投与後のヒトタンパク質に対するラットに特異的な免疫反応
- ラットの ADAMTS13 に対するヒト rVWF の低感受性に起因する一過性の微小血栓による虚血

これらの結果より、rVWF の作用に関する ADAMTS13 の切断活性の重要性が示された。

rVWF をアドベイトとの併用により 4 日間連日投与した VWd ブタにおいて、毒性は認められなかった。

カニクイザルでは、rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により 1 日 1 回、14 日間静脈内投与した結果、有害な影響は認められず、溶血、血栓及び血小板減少の徴候は観察されなかった。rVWF（単独又はアドベイトとの併用）又は Haemate P を投与した全動物でヒト VWF に特異的な抗体の産生が認められ、14 日間の投与後、全投与群の log2 抗体価は同様であった。rVWF 単独投与群、アドベイト併用投与群及び Haemate P 投与群のすべてにおいて、ヒト VWF に対する中和抗体が検出された。抗体産生は、異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられる。rVWF を単独投与したいずれの動物にもヒト FVIII に対する抗体は産生されなかった。

カニクイザルでの 4 週間反復投与毒性試験において、rVWF を 1 日 1 回静脈内投与した結果、800 IU VWF:RCo/kg/日で生命を脅かすアナフィラキシー反応及び比較的軽度のアレルギー反応が認められ、カニクイザルに異種タンパク質を反復投与したときに予想される免疫反応と考えられた。そのため、アナフィラキシー反応及びアレルギー反応に対する rVWF の NOAEL は、300 IU VWF:RCo/kg と考えられた。毒性の可能性については、800 IU VWF:RCo/kg/日の 2 週間投与及び 300 IU VWF:RCo/kg/日までの 4 週間投与において、前記以外のすべての変化に良好な忍容性が認められた。被験物質は血液凝固経路を標的とし、影響は主に抗体産生及び関連する補体、急性期のタンパク質、血液学的指標並びに血液凝固時間の変化として認められた。これらの結果より、rVWF の NOAEL は 300 IU VWF:RCo/kg/日と考えられた。

カニクイザルでの反復投与毒性試験において、800 IU VWF:RCo/kg でのアナフィラキシー反応及びアレルギー反応の発現、全用量での中和抗体の産生、並びに 100 又は 300 IU VWF:RCo/kg を反復投与した大多数の動物での rVWF の曝露量の実質的な減少により、4 週間を超える投与期間のサルでの反復投与毒性試験の実施は困難と判断された。

rVWF を投与したすべての動物は VWF に対する結合抗体を産生し、大部分の動物には中和抗体が確認された。抗体産生により 4 週間投与後の曝露量は著しく減少し、薬理関連パラメータは抗体産生による影響を受けた。

- rVWF の反復投与により、FVIII 活性のベースライン値（1.3～1.4 IU FVIII/mL）は軽度に低下した。抗 VWF 抗体の存在により内因性 VWF と FVIII との結合が低下し、内因性 FVIII が部分的に不安定化／分解した可能性がある。
- 被験物質の投与後、VWF:RCo のベースライン値は用量依存的に増加した後減少した。反復投与後には VWF:RCo の平均値が 1 日目よりも低く、これはヒト rVWF タンパク質に対する抗体産生に起因する可能性がある。

9.3 遺伝毒性

rVWF の遺伝毒性は、2 つの *in vitro* 試験として代謝活性化系の存在及び非存在下でのネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（エームス試験）及び染色体異常試験、並びに 1 つの *in vivo* 試験として小核試験で検討した。いずれの試験においても、本剤の遺伝毒性を示唆するエビデンスは認められなかった。

9.4 局所刺激性

ウサギに rVWF を単独で又はアドベイトとの併用により静脈内、動脈内又は静脈周囲投与した *in vivo* 試験において、良好な忍容性が認められた。

9.5 その他の試験：免疫原性

BALB/c マウスを用いて rVWF 及び pdVWF の比較免疫原性試験を実施した結果、被験物質間の免疫原性に顕著な差はなかった。rVWF とアドベイトとを併用投与したときのアドベイトの免疫原性に及ぼす影響に関する試験を、3 種類の異なる血友病マウスモデル（E17 血友病 Balb/c マウス、E17

血友病 C57BL/6J マウス及び E17 血友病ヒト F8 トランスジェニックマウス）を用いて実施した結果、3 種類のいずれの血友病マウスモデルにおいても rVWF はアドベイトの免疫原性に悪影響を及ぼさなかった。

9.6 GLP 適用毒性試験における曝露データに基づく安全域

主要な非臨床試験で観察された臨床的意義のある毒性所見、NOAEL 及び安全域を表 2.6.6-11 にまとめる。予定臨床用量に関連する安全域を評価するため、ヒト推奨最高用量である 80 IU VWF:RCo/kg（体重当たりの用量）、AUC 及び C_{max} に基づき計算した。

臨床推定曝露量と比較し、ウサギ単回投与毒性試験（BAX0009 試験、PV2140708 試験）での NOAEL における曝露量は、AUC で 12 倍、C_{max} で 28 倍、サル単回投与毒性試験（BAX0011 試験、DI08K001 試験）での NOAEL における曝露量は、AUC で 9.7 倍、C_{max} で 25 倍、サル反復投与毒性試験（506794 試験、179975 試験）での NOAEL における曝露量（1 日目）は、AUC で 1.1～1.6 倍、C_{max} で 4.8～5.7 倍であった。サル反復投与毒性試験（506794 試験、179975 試験）では、高用量（800 IU VWF:RCo/kg）で毒性所見（アナフィラキシー反応、アレルギー反応）が観察されたため、300 IU VWF:RCo/kg を上回る用量での曝露量は測定できなかった。

以上のように、ウサギ及びサル毒性試験での NOAEL における VWF 曝露量は臨床推定曝露量を上回り、rVWF の安全性は十分に評価されていたと考えられる。サル反復投与毒性試験（506794 試験、179975 試験）での NOAEL における VWF の曝露量（AUC）は、試験初期には臨床推定曝露量よりもわずかに高かったが（1.1～1.6 倍）、反復投与により曝露量は臨床推定曝露量未満に減少した。曝露量の大幅な減少及び毒性所見により、更なる高用量での追加評価は実施できず、4 週間を超える投与期間のサル反復投与毒性試験の実施は困難と判断された。

留意すべきこととして、ラットは反復投与毒性試験のための標準的なげっ歯類動物であるため、毒性学的に用いる動物種として当初選択したが、*in vitro* 試験（RD_VB_110702 試験）において、ラットの内因性 ADAMTS13 によるヒト rVWF の切断が低感受性であったため、ラットは rVWF の毒性評価のための適切な動物種でないと考えられた。

表 2.6.6-11. 主要な毒性試験における毒性所見、NOAEL 及び安全域の概要

Study Number	**Toxicological Findings**	**Species**	**NOAEL (IU VWF:RCo/kg) / multiple of clinical dose [a]**	**Corresponding AUC (h*U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]**	**Corresponding C_{max} (U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]**
Single-dose Toxicity					
PV1950601[c]	none	Rat	1400/ 17.5×	Males: 108.68 Females: 202.04/ Males: 3.7× Females: 6.9×	Males:15.07 Females: 39.73/ Males: 15× Females: 40×
BAX0009+ PV2140708	none	Rabbit	1200/ 15×	Males and Females Combined: 353/ 12.0×	Males and Females Combined: 28.1/ 28×
BAX0011+ DI08K001	none	Cynomolgus Monkey	1200/ 15×	Males and Females Combined: 284/ 9.7×	Males and Females Combined: 24.6/ 25×
Repeat-dose Toxicity					

Study Number	Toxicological Findings	Species	NOAEL (IU VWF:RCo/kg) / multiple of clinical dose [a]	Corresponding AUC (h*U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]	Corresponding C_{max} (U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]
33981	regenerative anemia, thrombocytopenia reversible inflammatory lesions in the heart, liver and salivary gland consistent with ischemic damage a higher incidence of increased extramedullary hematopoiesis in the spleen represents a response to the mild anemia	Rat	1400[d]/ 17.5×	Day 14: Males: 61.34 Females: 129.53/ Males: 2.1× Females: 4.4×	Day 14: Males: 10.91 Females: 25.97/ Males: 11× Females: 26×
EWA0015[e]	none	Cynomolgus monkey	100/ 1.25×	Males and Females Combined Day 1: 4.02 Day 14: 0.69/ Day 1: 0.14× Day 14: 0.02×	Males and Females Combined Day 1: 1.96 Day14: 0.38/ Day 1: 2× Day 14: 0.4×

Study Number	Toxicological Findings	Species	NOAEL (IU VWF:RCo/kg) / multiple of clinical dose [a]	Corresponding AUC (h*U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]	Corresponding C_{max} (U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]
506794+ 179975[e]	life-threatening anaphylactic reactions in one animal and less serious allergic reactions in two animals at 800 IU VWF:RCo/kg/day consistent with an immunogenic response after dosing with foreign protein.	Cynomolgus monkey	300/ 3.75×	Day 1: Males: 46.0 Females: 33.4/ Males: 1.6x Females: 1.1x Day 16: Males: 10.7 Females: 20.8/ Males: 0.4x Females: 0.7x Day 28 Males: not applicable Females: 13.9/ Males: not applicable Females: 0.5x	Day 1: Males:5.76 Females: 4.81/ Males:5.7x Females:4.8x Day 16: Males: 4.93 Females: 5.50/ Males: 4.9x Females: 5.5x Day 28 Males: not applicable Females: 4.57/ Males: not applicable Females: 4.5x

[a] The values for C_{max} and AUC reflect the administered rVWF. In cynomolgus monkeys, the VWF:Ag assay does not differentiate between endogenous monkey VWF and rVWF. Therefore, the exposure to the drug rVWF (based on C_{max} and AUC) was evaluated baseline-adjusted by subtracting the pre-dose endogenous VWF levels. In rats and rabbits, the VWF:Ag assay does not cross-react (or cross-reacts only very slightly) with endogenous VWF, therefore no adjustment for the endogenous baseline was needed.

[b] Maximum recommended clinical dose: 80 IU VWF:RCo/kg; maximum targeted plasma level: 1 IU VWF:RCo/mL; AUC at 80 IU VWF:RCo/kg: 29.39 h*IU VWF:RCo/mL (per Vonvendi Label [5])

Study Number	Toxicological Findings	Species	NOAEL (IU VWF:RCo/kg) / multiple of clinical dose [a]	Corresponding AUC (h*U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]	Corresponding C_{max} (U VWF:Ag/mL) [a]/ multiple of clinical exposure [b]

[c] No toxicokinetic evaluation was performed in this specific study. Values were obtained from the repeat-dose toxicity Study 33981 after the first dose.

[d] No NOAEL was determined for this study. Dosing at 1400 IU VWF:RCo/kg for 14 days produced a mild regenerative hemolytic anemia, thrombocytopenia, and inflammatory lesions involving the heart, liver and, rarely, salivary gland, and a higher incidence of increased extramedullary hematopoiesis in the spleen. All treatment related changes were reversible following a 15-day recovery period. The mechanism underlying the inflammatory lesions found in the repeat-dose toxicity study in rats (Study 33981) is deemed to be related to ischemic damage and microcirculatory disturbance caused by an exaggerated pharmacological effect of rVWF. The results generated in the rat over-predict the human pharmacological response to rVWF as an impaired susceptibility of human rVWF to rat ADAMTS13 cleavage was shown (Study RD_VB_110702) and are therefore not relevant for the human situation.

[e] Based on baseline adjusted rVWF levels. For study 506794, animals exhibiting anti-drug antibody positive responses were excluded from the calculations of AUC and C_{max} (see Table 2.6.6-6).

10. 図表

表は適切な項に示す。

参考文献

1. Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, et al. Development of the human coagulation system in the full term infant. Blood 1987; 70:165-72.

2. Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. Blood 1992; 80:1998-2005.

3. Astra Pharmaceuticals, L.P., M.V.I.® Pediatric (Multi-Vitamins for infusion). Package Insert No. 704101-02, Rev Nov. 2000.

4. Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. J Thromb Haemost 2013; 11:1850-4.

5. Baxalta US Inc. Vonvendi. Highlights of Prescribing Information, Revised 07/2018.

6. Bedford Laboratories. Amiodarone hydrochloride injection. Package Insert AMI P06, May 2005.

7. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. Br J Haematol 2012; 157:529-42.

8. Eschalier A, Lavarenne J, Burtin C, Renoux M, Chapuy E, Rodriguez M. Study of histamine release induced by acute administration of antitumor agents in dogs. Cancer Chemother Pharmacol 1988; 21:246-50.

9. FDA inactive ingredient list of approved drug products.

   http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm

10. Gough WB, Zeiler RH, Barreca P, El-Sherif N. Hypotensive Action of Commercial Intravenous Amiodarone and Polysorbate 80 in Dogs. J Cardiovasc Pharmacol 1982; 4:375-80.

11. Japanese Food Safety Commission Evaluation Report of Food Additives: Polysorbates (Polysorbates 20, 60, 65 and 80). 2007; 35 pages.

    http://www.fsc.go.jp/english/evaluationreports/foodadditive/polysorbate_report.pdf

12. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluations Performed on Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monooleate; Report NMRS 53/TRS 539-JECFA 17/20 1973; 1 page.

13. Kuhle S, Male C, Mitchell L. Developmental hemostasis: pro- and anticoagulant systems during childhood. Semin Thromb Hemost 2003; 29:329-37.

14. Manco-Johnson MJ. Development of hemostasis in the fetus and neonate. Thromb Res 2007; 119 Suppl. 1:S4-5.

15. Martin PL, Breslin W, Rocca M, Wright D, Cavagnaro J. Considerations in assessing the developmental and reproductive toxicity potential of biopharmaceuticals. Birth Defects Res Part B 2009; 86:176-203.

16. Masini E, Planchenault J, Pezziardi F, Gautier P, Gagnol JP. Histamine-releasing properties of Polysorbate 80 *in vitro* and *in vivo* : correlation with its hypotensive action in the dog. Agents Actions 1985; 16:470-7.

17. Pfizer Inc. Eraxis (anidulafungin) for injection. Package Insert LAB-0336-1.0, February 2006.

18. RA12BM08R1 Toxicological evaluation of Tween 80 (Polysorbate 80) 2014.

19. Schmugge M, Dunn MS, Amankwah KS, Blanchette VS, Freedman J, Rand ML. The activity of the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS-13 in newborn infants. J Thromb Haemost 2004; 2:228-33.

20. Steele RH, Limaye S, Cleland B, Chow J, Suranyi MG. Hypersensitivity reactions to the polysorbate contained in recombinant erythropoietin and darbepoietin. Nephrology 2005; 10:317-20.

21. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. Clin Pharmacokinet. 2004; 43:487-514.

22. Varadi K, Rottensteiner H, Vejda S, Weber A, Muchitsch E-M, Turecek PL, et al. Species-dependent variability of ADAMTS13-mediated proteolysis of human recombinant von Willebrand factor. J Thromb Haemost 2009; 7:1134-42.

23. Weiszhár Z; Czúcz J; Révész C, Rosivall L; Szebeni J; Rozsnyay Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants:Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. Eur J Pharm Sci 2012; 45:492-8.

24. 医薬品添加物事典 2016、薬事日報社、p515

25. アミオダロン塩酸塩静注 150mg「TE」添付文書. トーアエイヨー. 2018 年 7 月改訂（第 3 版）

26. Kopic A, Benamara K, Piskernik C, Plaimauer B, Horling F, Hoebarth G, et al. Preclinical assessment of a new recombinant ADAMTS-13 drug product (BAX930) for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. J Thromb Haemost 2016;14:1410-9.

27. Tsai HM. Shear stress and von Willebrand factor in health and disease. Semin Thromb Hemost.2003;29:479-88.

目次

2.6.7.1 毒性試験：一覧表 3
2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表 7
2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧 8
2.6.7.4 毒性試験: 被験物質（バッチ毎）一覧 16
2.6.7.5 単回投与毒性試験 19
2.6.7.6 反復投与毒性試験: 重要な試験以外の試験 22
2.6.7.7 反復投与毒性試験: 重要な試験 23
2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験 42
2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験 46
2.6.7.10 がん原性試験 47
2.6.7.11 生殖発生毒性試験: 重要な試験以外の試験 47
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 47
2.6.7.13 生殖発生毒性試験: 胚・胎児発生に関する試験 47
2.6.7.14 生殖発生毒性試験: 出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 48
2.6.7.15 新生児を用いた試験 48
2.6.7.16 局所刺激性試験 49
2.6.7.17 その他の毒性試験 50

表目次

表 2.6.7-1-1. Toxicology Overview 3
表 2.6.7-2-1. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies 7
表 2.6.7-3-1. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data PV2140708 VWF 8
表 2.6.7-3-2. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data PV2140708 FVIII 8
表 2.6.7-3-3. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data DI08K001 VWF 9
表 2.6.7-3-4. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data DI08K001 FVIII 9
表 2.6.7-3-5. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 33981 VWF 10
表 2.6.7-3-6. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 33981 FVIII 11
表 2.6.7-3-7. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 528575 VWF 12
表 2.6.7-3-8. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data EWA0015 VWF 13
表 2.6.7-3-9. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data EWA0015 FVIII 14
表 2.6.7-3-10. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 506794 and 179975 VWF 15
表 2.6.7-4-1. Toxicology: Drug Substance 16
表 2.6.7-5-1. Single Dose Toxicity 19
表 2.6.7-6-1. Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies 22
表 2.6.7-7-1. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies 23

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats....24
表 2.6.7-7-3. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant Von Willebrand Factor (rVWF) Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Cynomolgus Monkeys for 14 Days Followed by a 18 Day Recovery Period....34
表 2.6.7-7-4. A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period....36
表 2.6.7-8-1. Genotoxicity: *In Vitro*....42
表 2.6.7-8-2. Genotoxicity: *In Vitro*....44
表 2.6.7-9-1. Genotoxicity: *In Vivo*....46
表 2.6.7-10-1. Carcinogenicity....47
表 2.6.7-11-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies....47
表 2.6.7-12-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development to Implantation (Pivotal)....47
表 2.6.7-13-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryofetal Development (Pivotal)....47
表 2.6.7-14-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function (Pivotal)....48
表 2.6.7-15-1. Studies in Juvenile Animals....48
表 2.6.7-16-1. Local Tolerance....49
表 2.6.7-17-1. Other Toxicity Studies: Immunogenicity in mice....50
表 2.6.7-17-2. Other Toxicity Studies: Repeat-dose feasibility in rabbits....51
表 2.6.7-17-3. Other Toxicity Studies: *In vitro* mechanistic study....51

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

表 2.6.7-1-1. Toxicology Overview

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Type of Study/ Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses IU/kgVWF:RCo ± FVIII IU/kg [a]	GLP [b]	Testing Facility	Study Number	Location of Final Report
Single-Dose Toxicity							
Mouse (ADAMTS13 knockout)	intravenous	bolus	250, 500, 1000, 2000, 4000 250 + 192 500 + 385 1000 + 769 2000 + 1538 4000 + 3077	yes	Baxter 20 [c]	PV1940601	4.2.3.1-1
Mouse (C57BL/6J)	intravenous	bolus	250, 500, 1000, 2000, 4000 250 + 192 500 + 385 1000 + 769 2000 + 1538 4000 + 3077	yes	Baxter 20	PV1990701	4.2.3.1-2
Mouse (VWF deficient)	intravenous	bolus	250, 500, 1000, 2000, 4000 250 + 192 500 + 385 1000 + 769 2000 + 1538 4000 + 3077	yes	Baxter 20	PV1930601	4.2.3.1-3
Mouse (ADAMTS13 ko)	intravenous	bolus	2000 IU/kg VWF:RCo + 19.4 µg/kg rADAMTS13	no	Baxter 20	AU0507W01	4.2.3.1-4
Rat (SD/CD)	intravenous	bolus	700, 1400 700 + 538 1400 + 1077	yes	Baxter 20	PV1950601	4.2.3.1-5

表 2.6.7-1-1. Toxicology Overview (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Type of Study/ Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses IU/kgVWF:RCo ± FVIII IU/kg [a]	GLP [b]	Testing Facility	Study Number	Location of Final Report
Single-Dose Toxicity							
Rabbit (NZW)	intravenous	bolus	100, 300, 600, 1200 100 + 77 600 + 462	yes	[redacted] [d]	BAX0009	4.2.3.1-6
Cynomolgus Monkey	intravenous	bolus	100, 300, 600, 1200 100 + 77 600 + 462	yes	[redacted] [d]	BAX0011	4.2.3.1-7
Repeat-Dose Toxicity							
Rat (HSD/SD)	intravenous	14 daily doses	1400 1400+1080	yes	Baxter RL [e]	33981	4.2.3.2-1
VWd Pig	intravenous	4 daily doses	100 single-dose 100+77	no	[redacted] [h]	RD_VB_110704	4.2.3.2-2
Cynomolgus Monkey	intravenous	14 daily doses	50, 100 100+77, 0+77	yes	[redacted] [d]	EWA0015	4.2.3.2-3
Cynomolgus Monkey	intravenous	28 daily doses	100, 300, 800	yes	[redacted] [j]	506794	4.2.3.2-4
Genotoxicity							
Salmonella Typhimurium/ TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535	*In vitro*	na	100, 33, 11, 3.7, 1.2 µL/plate	yes	[redacted] [f]	BAX22	4.2.3.3.1-1
Chromosome Aberration Test in human lymphocytes	*In vitro*	na	3.15, 6.3 and 12.6 IU VWF:RCo/mL	yes	[redacted] [k]	BAX0013	4.2.3.3.1-2
Mouse (Crl:NMRI BR)	intravenous	Single dose	158, 315, 631	yes	[redacted]	BAX24	4.2.3.3.2-1

表 2.6.7-1-1. Toxicology Overview (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Type of Study/ Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses IU/kgVWF:RCo ± FVIII IU/kg [a]	GLP [b]	Testing Facility	Study Number	Location of Final Report
Carcinogenicity	Na						
Reproduction Toxicity	Na						
Local Tolerance							
Rabbit (NZW)	intravenous intraarterial paravenous	bolus	10 mL 10 mL 0.5 mL (126.17 IU/mL VWF:RCo)	yes	Baxter 20	PV2000701	4.2.3.6-1
Other Toxicity Studies							
Immunogenicity							
Mouse (Balb/c)	intravenous	4 doses given at weekly intervals	10 µg, 50 µg 50 µg + 0.464 µg 0.464 µg rFVIII	no	Baxter 72 [g]	FS-IM00907	4.2.3.7.2-1
E17 hemophilic Balb/c mice; E17 hemophilic C57BL/6J mice; E17 hemophilic human F8 transgenic mice	intravenous	8 doses given at weekly intervals	E17 Balb/c and C57BL/6J mice 200 ng rFVIII 200 ng rFVIII + 2 µg rVWF 200 ng rFVIII + 2 µg highly purified pdVWF 200 ng rFVIII + 2 µg Wilfactin E17 F8 Tg mice 10, 50 µg rVWF, 464 ng rFVIII 464 ng rFVIII + 50 µg rVWF	no	Baxter 72	IMM_R&D_017_11	4.2.3.7.2-2
Rabbit (NZW)	intravenous	14 daily doses	80, 400, 800	no	[redacted] [j]	528575	4.2.3.7.2-3

表 2.6.7-1-1. Toxicology Overview (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Type of Study/ Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses IU/kgVWF:RCo ± FVIII IU/kg [a]	GLP [b]	Testing Facility	Study Number	Location of Final Report
Mechanistic Studies							
ADAMTS13 cleavage of human rVWF/ ADAMTS13 ko mouse; C57BL/6J mouse; VWd mouse; rat; guinea pig; rabbit; dog; cynomolgus monkey	*In vitro*	na	1 U VWF:Ag/mL	no	Baxter BG [i]	RD_VB_110702	4.2.3.7.3-1
Impurities	na						

[a] Unless otherwise specified, the highest No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) is underlined

[b] An entry of "yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement

[c] Baxter AG, Industriestrasse 20, 1220 Vienna, Austria

[d] [redacted] England

[e] Baxter Healthcare Corp, 25212 W. Illinois Route 120, Round Lake, Illinois USA

[f] [redacted] Austria

[g] Baxter, Industriestraße 72, 1220 Vienna, Austria

[h] [redacted], France

[i] Baxter, Benatzkygasse 2-6, A-1220 Vienna, Austria

[j] [redacted] UK

[k] [redacted], UK

2.6.7.2 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7-2-1. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Studies

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Type of Study	Test System	Method of Administration	Dose IU/kg VWF: RCo ± FVIII IU/kg	GLP [a]	Study Number	Location of Final Report
Single dose Toxicity Study incl. TK	Rabbit (NZW)	intravenous	100, 300, 600, 1200 100 + 77 600 + 462	yes	BAX0009 + PV2140708	4.2.3.1-6
	Cynomolgus Monkeys	intravenous	100, 300, 600, 1200 100 + 77 600 + 462	yes	BAX0011+ DI08K001	4.2.3.1-7
Repeat-dose Toxicity Study incl. TK	Rat (HSD/SD)	intravenous	1400 1400+1080	yes	33981	4.2.3.2-1
	Cynomolgus monkey	intravenous	50, 100 100+77, 0+77	yes	EWA0015	4.2.3.2-3
	Cynomolgus monkey	intravenous	100, 300, 800	yes	506794 + 179975	4.2.3.2-4
Other Toxicity Study incl. TK (Repeat-dose)	Rabbit (NZW)	intravenous	80, 400, 800	no	528575	4.2.3.7.2-3

[a] An entry of "yes" indicates that the study includes a GLP compliance statement except studies DI08K001 and 179975 (non-GLP)

2.6.7.3 トキシコキネティクス：トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7-3-1. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data PV2140708 VWF

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for VWF:Ag	**Rabbit (NZW) / PV2140708**					
	IU/kg VWF:RCo	**IU/kg VWF:RCo**	**IU/kg VWF:RCo**	**IU/kg VWF:RCo**	**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**	**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**
	100	**300**	**600**	**1200**	**100+77**	**600+462**
N (pooled Sex)	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**	**6**
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (U•h/mL)	16.2	49.3	114	262	16	112
$AUC_{0-\infty}$ (U•h/mL)	20.6	54.8	130	353	17.5	126
C_{max} (U/mL)	2.9	8.35	14.9	28.1	2.74	14.8
$t_{1/2}$ terminal (h)	8	6.2	6.1	9.5	5.5	6.3

表 2.6.7-3-2. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data PV2140708 FVIII

Test Articles: rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for FVIII:Ag	**Rabbit (NZW) / PV2140708**	
	IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg	**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**
	n=6 pooled sex	**n=6 pooled sex**
	100+77	**600+462**
Toxicokinetics after single dose (day 1)		
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	4.9	32.4
$AUC_{0-\infty}$ (IU•h/mL)	6.2	37.7
C_{max} (IU/mL)	1.11	5.85
$t_{1/2}$ terminal (h)	3.8	7.0

表 2.6.7-3-3. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data DI08K001 VWF

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for VWF:Ag	**Cynomolgus Monkey / DI08K001**					
	IU/kg VWF:RCo	**IU/kg VWF:RCo**	**IU/kg VWF:RCo**	**IU/kg VWF:RCo**	**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**	**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**
	100	**300**	**600**	**1200**	**100+77**	**600+462**
N (pooled Sex)	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (U•h/mL)	8.3	54.2	116	247	10.2	89.7
$AUC_{0-\infty}$ (U•h/mL)	9.7	58.2	117	284	10.7	91.4
C_{max} (U/mL)	2.42	8.5	14.8	24.6	2.65	13.7
T_{max} (min)	10	10	5	15	10	15
$t_{1/2}$ terminal (h)	3.0	4.2	5.1	8.0	4.7	4.3

表 2.6.7-3-4. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data DI08K001 FVIII

Test Articles: rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for FVIII Activity	**Cynomolgus Monkey / DI08K001**	
	IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg	**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**
	100+77	**600+462**
N (pooled Sex)	**3**	**4**
Toxicokinetics after single dose (day 1)		
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	1.6	33.7
$AUC_{0-\infty}$ (IU•h/mL)	1.7	37
C_{max} (IU/mL)	1.90	8.59
T_{max} (min)	5	15
$t_{1/2}$ terminal (h)	0.4	2.6

表 2.6.7-3-5. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 33981 VWF

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for VWF:Ag	**Rat / 33981**			
	IU/kg VWF:RCo		**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**	
	1400		**1400+1080**	
Sex (N)	**M(3)**	**F(3)**	**M(3)**	**F(3)**
Toxicokinetics after single dose (day 1)				
AUC_{0-t} (U•h/mL)	108.13	200.64	100.87	177.47
$AUC_{0-\infty}$ (U•h/mL)	108.68	202.04	101.88	179.05
C_{max} (U/mL)	15.07	39.73	16.33	32.20
T_{max} (h)	3.00	0.08	0.08	0.5
Ke (1/h)	0.2165	0.2071	0.1950	0.1865
$t_{1/2}$ (h)	3.20	3.35	3.55	3.72
Toxicokinetics after multiple dose (day 14)				
AUC_{0-t} (U•h/mL)	60.48	128.87	48.29	105.23
$AUC_{0-\infty}$ (U•h/mL)	61.34	129.53	48.91	105.80
C_{max} (U/mL)	10.91	25.97	16.33	21.37
T_{max} (h)	0.5	0.08	0.08	0.08
Ke (1/h)	0.1462	0.2216	0.1829	0.2158
$t_{1/2}$ (h)	4.74	3.13	3.79	3.21

M = male
F = female

表 2.6.7-3-6. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 33981 FVIII

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for FVIII:Ag	**Rat / 33981**			
	IU/kg VWF:RCo		**IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg**	
	1400		**1400+1080**	
Sex (N)	**M(3)**	**F(3)**	**M(3)**	**F(3)**
Toxicokinetics after single dose (day 1)				
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	6.21	7.63	43.96	60.64
$AUC_{0-\infty}$ (IU•h/mL)	6.28	7.81	45.54	61.12
C_{max} (IU/mL)	2.01	2.89	13.57	16.14
T_{max} (h)	0.08	0.08	0.08	0.08
Ke (1/h)	0.5986	0.4445	0.2863	0.2227
$t_{1/2}$ (h)	1.16	1.56	2.42	3.11
Toxicokinetics after multiple dose (day 14)				
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	1.72	1.57	0.2224	0.0916
C_{max} (IU/mL)	1.15	0.84	0.73	0.28
T_{max} (h)	0.08	0.5	0.08	0.08

M = male
F = female

表 2.6.7-3-7. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 528575 VWF

Test Article: rVWF

Toxicokinetic Parameters for VWF:Ag	**NZW Rabbits / 528575**		
	IU VWF:RCo /kg		
	80	**400**	**800**
N (Sex)	**6 (F)**	**6 (F)**	**6 (F)**
Toxicokinetics after single dose (day 1)			
$AUC_{0\text{-}t}$ (U•h/mL)	9.579	54.77	142.5
C_{max} (U/mL)	1.978	7.354	17.05
Toxicokinetics after multiple dose (day 14)			
$AUC_{0\text{-}t}$ (U•h/mL)	-	-	-
C_{max} (U/mL)	-	-	-

- Only data from Day 1 could be evaluated, as there was no measurable VWF:Ag on Day 14, due to the presence of neutralising antibodies.

表 2.6.7-3-8. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data EWA0015 VWF

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for VWF:Ag	**Cynomolgus Monkey / EWA0015**					
	IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg					
	0+0	**50+0**	**100+0**	**100+42[a]**	**100+77**	**0+77**
N (pooled Sex)	**6**	**4**	**6**	**6**	**6**	**6**
Toxicokinetic Parameters for total VWF (endogenous VWF + rVWF)						
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (U•h/mL)	14.3	18.6	23.1	36.7	22.1	19.5
C_{max} (U/mL)	1.79	2.9	4.01	5.03	3.89	2.37
Toxicokinetics after multiple dose (day 14)						
AUC_{0-t} (U•h/ mL)	13.3	14.2	16.0	19.8	15.6	16.3
C_{max} (U/mL)	1.64	1.72	2.00	3.40	1.98	1.91
Toxicokinetic Parameters for VWF (adjusted for endogenous baseline)						
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (U•h/mL)	0.12	1.8	4.02	9.34	3.64	0.03
C_{max} (U/mL)	0.11	1.07	1.96	2.75	1.89	0.11
Toxicokinetics after multiple dose (day 14)						
AUC_{0-t} (U•h/ mL)	0.42	1.21	0.69	1.03	0.66	0.04
C_{max} (U/mL)	0.16	0.36	0.38	1.12	0.44	0.07

[a] Haemate P

表 2.6.7-3-9. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data EWA0015 FVIII

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Toxicokinetic Parameters for FVIII Activity	**Cynomolgus Monkey / EWA0015**					
	IU/kg VWF:RCo + FVIII IU/kg					
	0+0	**50+0**	**100+0**	**100+42**	**100+77**	**0+77**
N (pooled Sex)	**6**	**4**	**6**	**6**	**6**	**6**
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	15.0	11.2 (n=2)	10.10	21.00	14.00	23.5
C_{max} (IU/mL)	2.15	1.97	2.15	3.38	4.02	4.10
Toxicokinetics after multiple dose (day 14)						
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	13.9	13.1	12.3	11.00	10.50	7.41
C_{max} (IU/mL)	1.75	1.92	1.81	2.10	1.84	1.55

表 2.6.7-3-10. Toxicokinetics: Overview of Toxicokinetics Data 506794 and 179975 VWF

Test Article: rVWF

Toxicokinetic Parameters for VWF:Ag	**Cynomolgus Monkey / 506794**					
	IU VWF:RCo /kg					
	100		**300**		**800**	
N (Sex)	**3 (M)**	**3 (F)**	**3 (M)**	**3 (F)**	**5 (M)**	**5 (F)**
Toxicokinetic Parameters for total VWF (endogenous VWF + rVWF)						
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	44900	46300	77200	80800	214000	200000
C_0 (mU/mL)	3610	3410	7060	7250	C_{max}: 18400	C_{max}: 15500
Toxicokinetics after multiple dose (day 16)						
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	38400 (n=2)*	40400 (n=1)*	51200 (n=1)*	53600	-	-
C_0 (mU/mL)	3570 (n=2)*	2300 (n=1)*	6510 (n=1)*	6850	-	-
Toxicokinetics after multiple dose (day 28)						
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	34600 (n=2)*	NC	NC	48700	-	-
C_0 (mU/mL)	2820 (n=2)*	NC	NC	5900	-	-
Toxicokinetic Parameters for VWF (adjusted for endogenous baseline) (Report 179975)						
Toxicokinetics after single dose (day 1)						
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	12500	11300	46000	33400	181000	143000
C_0 (mU/mL)	2260	1960	5760	4810	C_{max}: 17000	C_{max}: 13800
Toxicokinetics after multiple dose (day 16)						
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	8840 (n=2)*	8910 (n=1)*	10700 (n=1)*	20800	-	-
C_0 (mIU/mL)	2350 (n=2)*	1530 (n=1)*	4930 (n=1)*	5500	-	-
Toxicokinetics after multiple dose (day 28)						
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	1430 (n=2)*	NC	NC	13900	-	-
C_0 (mU/mL)	1420 (n=2)*	NC	NC	4570	-	-

*, One or two animals exhibiting ADA positive responses were excluded from descriptive statistics calculations

NC, Three animals exhibiting ADA positive responses were excluded from descriptive statistics calculations

2.6.7.4 毒性試験: 被験物質（バッチ毎）一覧

表 2.6.7-4-1. Toxicology: Drug Substance

Test Article: rVWF

Lot No.	BDS Batches Used	Purity (%)			Specified Impurities			Study Number	Type of Study
		1	2	3	A	B	C		
Proposed Specification [a]:	n/a	[redacted]≤X≤[redacted]	report	complies	report	report	< [redacted] mmol/L		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	PV1940601 PV1990701 PV1930601 AU0507W01 PV1950601 BAX0009 BAX0011	Single dose Toxicity
								BAX22 BAX0013 BAX24	Genotoxicity
								PV2000701	Local Tolerance
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	33981	Repeat-dose Toxicity

表 2.6.7-4-1. Toxicology: Drug Substance (Continued)

Test Article: rVWF

Lot No.	BDS Batches Used	Purity (%)			Specified Impurities			Study Number	Type of Study
		1	2	3	A	B	C		
Proposed Specification [a]:	n/a	[redacted]≤X≤[redacted]	report	complies	report	report	report		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	528575	Repeat-dose Toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	RD_VB_110704	Repeat-dose Toxicity
[redacted] [b]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	EWA0015	Repeat-dose Toxicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	506794	Repeat-dose Toxicity

表 2.6.7-4-1. Toxicology: Drug Substance (Continued)

Test Article: rVWF

Where:
1 = [redacted]
2 = [redacted]
3 = [redacted]
A = [redacted]
B = [redacted]
C = [redacted]
[a] [redacted]
[b] [redacted]

2.6.7.5 単回投与毒性試験

表 2.6.7-5-1. Single Dose Toxicity

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/Strain /Treatment	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Gender and No. Per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Approximate Lethal Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse (ADAMTS13 knock out)							
rVWF	intravenous	250, 500, 1000, 2000, 4000	5M/5F	1000 (M) 2000 (F)	2000 (M) 4000 (F)	Anemia and thrombocytopenia, microthrombosis in lungs, kidneys, eyes, adrenals, brain, heart	PV1940601
rVWF + rFVIII		250 + 192 500 + 385 1000 + 769 2000 + 1538 4000 + 3077	5M/5F	2000+1538	4000+3077		
Haemate P		2000 + 1664 4000 + 3322	5M/5F	2000 + 1664	4000 + 3322	Slight decrease in platelet counts	
Mouse (C57BL/6J)							
rVWF	intravenous	250, 500, 1000, 2000, 4000	5M/5F	4000	>4000	Thrombocytopenia, increase of LDH (both being reversible after 14 days), pathological picture of a low grade “ischemic heart disease”	PV1990701
rVWF + rFVIII		250 + 192 500 + 385 1000 + 769 2000 + 1538 4000 + 3077	5M/5F	4000+3077	>4000+3077		
Haemate P		2000 + 1347	5M/5F	2000 + 1347	>2000 +1347	none	

表 2.6.7-5-1. Single Dose Toxicity (Continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/Strain /Treatment	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Gender and No. Per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Approximate Lethal Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse (VWF-deficient)							
rVWF	intravenous	250, 500, 1000, 2000, 4000	5M/5F	4000	>4000	Thrombocytopenia, (reversible after 14 days), pathological picture of a low grade “ischemic heart disease”	PV1930601
rVWF + rFVIII		250 + 192 500 + 385 1000 + 769 2000 + 1538 4000 + 3077	5M/5F	4000 + 3077	>4000 + 3077		
Haemate P		2000 + 1347	5M/5F	2000 + 1347	>2000 + 1347	none	
Mouse (ADAMTS13 knock out)							
rVWF + rADAMTS13	intravenous	2000 IU/kg VWF:RCo + 19.4 µg/kg rADAMTS13	5M/5F	2000 IU/kg VWF:RCo + 19.4 µg/kg rADAMTS13	> 2000 IU/kg VWF:RCo + 19.4 µg/kg rADAMTS13	Thrombocytopenia, microthrombosis, myocardial necrosis in heart	AU0507W01
Rat (SD/CD)							
rVWF	intravenous	700, 1400	5M/5F	1400	>1400	none	PV1950601
rVWF + rFVIII		700 + 538 1400 + 1077	5M/5F	1400 + 1077	> 1400 + 1077	none	
Haemate P		1400 + 939	5M/5F	1400 + 939	> 1400 + 939	none	
Rabbit (NZW)							
rVWF	intravenous	100, 300, 600, 1200	3M/3F	1200	>1200	none	BAX0009
rVWF + rFVIII		100 + 77 600 + 462	3M/3F	600 + 462	>600 + 462	none	

M = male
F = female

表 2.6.7-5-1. Single Dose Toxicity (Continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/Strain /Treatment	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Gender and No. Per Group	Observed Maximum Nonlethal Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Approximate Lethal Dose IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Noteworthy Findings	Study Number
Cynomolgus Monkey							
rVWF	intravenous	100, 300, 600, 1200	2M/2F	1200	>1200	none	BAX0011
rVWF + rFVIII		100 + 77 600 + 462	2M/2F	600 + 462	>600 + 462	none	

M = male
F = female

2.6.7.6 反復投与毒性試験: 重要な試験以外の試験

表 2.6.7-6-1. Repeat-Dose Toxicity: Nonpivotal Studies

Test Articles: rVWF + ADVATE

Species/Strain /Treatment	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Duration of Dosing	Doses IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Gender and No. Per Group	NOAEL [a] IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Noteworthy Findings	Study Number
Pig (VWF-deficient)							
rVWF + rFVIII	intravenous	4 daily doses	100+77	1M	100 + 77	none	RD_VB_110704

[a] No observed adverse effect level

2.6.7.7 反復投与毒性試験: 重要な試験

表 2.6.7-7-1. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/Strain /Treatment	Method of Administration (Vehicle/ Formulation)	Duration of Dosing	Doses IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Gender and No. Per Group	NOAEL [a] IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg	Noteworthy Findings	Study Number
Rat (HSD/SD)							
rVWF	intravenous	14 daily doses	1400	10 M/10 F	< 1400	Mild regenerative hemolytic anemia, thrombocytopenia, inflammatory lesions involving the heart, liver and, rarely, salivary gland, and a higher incidence of increased extramedullary hematopoiesis in the spleen. All changes were reversible following a 15-day recovery period.	33981
rVWF + rFVIII			1400 + 1080	10 M/10 F	< 1400 + 1080		
Cynomolgus Monkey							
rVWF	intravenous	14 daily doses	50, 100	4 M/4 F	100	none	EWA0015
rVWF+rFVIII			100+77	4 M/4 F	100+77	none	
rFVIII			0+77	4 M/4 F	0+77	none	
Haemate P			100+42	4M/4F	100+42	none	
rVWF	intravenous	28 daily doses	100, 300, 800	3 M/3 F	300	800 IU/kgVWF:RCo group: life-threatening anaphylactic reactions in one animal and less serious allergic reactions in two animals (only these reactions were considered toxicological findings), higher mean values for C-reactive protein, BB and SC5b-9 300 and 800 IU/kgVWF:RCo groups: lower platelet count, higher reticulocyte count, slightly longer APTT. Complete reversibility of these changes occurred over the recovery period.	506794

[a] No observed adverse effect level M=male F=male

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Initial Age: 2-3 months			Duration of Postdose: 15 days				Location in CTD: 4.2.3.2-1			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: intravenous				GLP Compliance: yes			
			Vehicle/Formulation: Sterile water for injection (WFI)				Special Features: none			
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080										
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Toxicokinetics after single dose (day 1):										
Number of Animals	M: 9	F: 9	M: 9	F: 9	M: 9	F: 9	M: 9	F: 9	M: 9	F: 9
AUC_{0-t} (U•h/mL)	-	-	-	-	-	-	108.13	200.64	100.87	177.47
$AUC_{0-\infty}$ (U•h/mL)	-	-	-	-	-	-	108.68	202.04	101.88	179.05
C_{max} (U/mL)	-	-	-	-	-	-	15.07	39.73	16.33	32.20
T_{max} (h)	-	-	-	-	-	-	3.00	0.08	0.08	0.5
Ke (1/h)	-	-	-	-	-	-	0.2165	0.2071	0.1950	0.1865
$t_{1/2}$ (h)	-	-	-	-	-	-	3.20	3.35	3.55	3.72
Toxicokinetics after multiple dose (day 14):										
AUC_{0-t} (U•h/mL)	-	-	-	-	-	-	60.48	128.87	48.29	105.23
$AUC_{0-\infty}$ (U•h/mL)	-	-	-	-	-	-	61.34	129.53	48.91	105.80
C_{max} (U/mL)	-	-	-	-	-	-	10.91	25.97	16.33	21.37
T_{max} (h)	-	-	-	-	-	-	0.5	0.08	0.08	0.08

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Initial Age: 2-3 months			Duration of Postdose: 15 days				Location in CTD: 4.2.3.2-1			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: intravenous				GLP Compliance: yes			
			Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080										
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Ke (1/h)	-	-	-	-	-	-	0.1462	0.2216	0.1829	0.2158
$t_{1/2}$ (h)	-	-	-	-	-	-	4.74	3.13	3.79	3.21
Primary Body Weight, Feed Consumption, Observations, Ophthalmic Evaluation [a]										
Number of Animals	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16	M: 16	F: 16
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (g/week) Week 2	135.2 ± 1.8	99.0 ± 2.3	138.0 ± 1.9	94.5 ± 1.6	137.9 ± 2.4	92.6 ± 1.4	141.0 ± 2.7[b]	94.0 ± 1.4	134.8 ± 2.2	88.9 ± 1.2[d]
Water Consumption	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiography	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)	**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**	
	Duration of Dosing: 14 daily doses	Study No. 33981
Initial Age: 2-3 months	Duration of Postdose: 15 days	Location in CTD: 4.2.3.2-1
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous	GLP Compliance: yes
	Vehicle/Formulation: WFI	Special Features: none

No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080

Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Primary Hematology, Serum Chemistry and Histopathology Evaluation [a]										
Number of Animals	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10	M: 10	F: 10
Hematology										
RBC (million/µL)	7.62±0.08	7.48±0.07	7.68±0.07	7.58±0.05	7.60±0.10	7.60±0.07	7.23±0.14[c,h]	6.92±0.09[e,i]	7.29±0.08[b,j]	6.74±0.12[e,m]
Hgb (g/dL)	14.5±0.1	13.9±0.1	14.5±0.1	13.9±0.1	14.5±0.1	14.0±0.1	14.0±0.2[c,g]	13.2±0.1[d,h]	14.0±0.1[c,k]	12.9±0.2[e,m]
Hct (%)	42.0±0.4	40.0±0.3	42.3±0.4	40.1±0.3	42.2±0.4	40.3±0.4	40.1±0.6[c,h]	37.5±0.4[e,i]	40.4±0.5[b,k]	36.6±0.6[e,m]
MCH (pg)	19.0±0.1	18.6±0.2	18.9±0.1	18.4±0.2	19.1±0.2	18.4±0.1	19.3±0.2	19.0±0.1[g]	19.2±0.2	19.1±0.2[b,k]
MCHC (g/dL)	34.5±0.1	34.7±0.1	34.4±0.1	34.7±0.1	34.4±0.1	34.8±0.0	34.8±0.2[f]	35.1±0.1[b,f]	34.6±0.1	35.1±0.1[b,j]
PLT (thous/µL)	1028±40	1020±26	1093±29	1031±32	1095±34	1109±25	858±36[c,h]	1013±83	980±56	932±53[k]
Lymphocyte (%)	80±2	83±2	85±1	80±2	86±1	86±2	85±2[b]	84±1	88±1[d]	84±2
Neutrophil (%)	16±2	14±2	13±1	18±2	13±1	11±1	12±1	12±1[g]	10±1[c]	12±1
Monocyte (%)	1.9±0.4	0.8±0.4	0.7±0.3	0.2±0.1	0.0±0.0	0.3±0.2	0.5±0.2[d]	0.3±0.2	0.4±0.2[d]	0.6±0.2
PT (sec)	16.4±0.1	16.7±0.1	15.9±0.1	16.6±0.1	16.4±0.1	16.8±0.1	16.3±0.1[g]	16.8±0.1	16.5±0.1	17.0±0.1

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Initial Age: 2-3 months			Duration of Postdose: 15 days				Location in CTD: 4.2.3.2-1			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: intravenous				GLP Compliance: yes			
			Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080										
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
APTT (sec)	16.3±0.3	16.9±0.7	15.1±0.4	16.5±0.4	16.0±0.4	16.3±0.3	15.0±0.4[b]	16.8±0.4	17.1±0.3	18.6±0.5[c,l]
Reticulocytes (%)	1.6±0.2	2.2±0.1	1.8±0.2	2.6±0.2	1.5±0.3	2.2±0.2	3.3±0.3[d,h]	4.4±0.6[e,i]	3.2±0.3[d,m]	3.9±0.4[e,m]
Serum Chemistry										
ALT (U/L)	39±2	33±2	37±2	31±1	35±1	28±1	42±2[f]	31±1	38±2	31±2
Total Bilirubin (mg/dL)	0.1±0	0.2±0	0.1±0	0.2±0	0.1±0	0.2±0	0.1±0	0.1±0[c,f]	0.1±0	0.2±0
Glucose (mg/dL)	109±4	114±3	121±6	102±2	104±4	106±3	102±3[h]	114±3[f]	105±3	114±4
Calcium (mg/dL)	10.4±0.1	10.4±0.1	10.7±0.1	10.5±0.1	10.4±0.1	10.6±0.1	10.6±0.1	10.6±0.1	10.6±0.1[b]	10.6±0.1[b]
Phosphorus (mg/dL)	8.7±0.1	6.7±0.2	9.1±0.2	7.2±0.1	8.9±0.1	7.4±0.1	8.9±0.2	7.2±0.2[b]	8.9±0.2	7.3±0.2[b]
Triglycerides (mg/dL)	22±2	18±1	19±2	19±1	15±1	18±1	21±2	20±1	16±1[c]	18±1
Sodium (mEq/L)	142±0	141±0	142±0	142±0	143±0	142±0	144±0[c,h]	142±0[e]	143±0[b]	142±0[d]
Chloride (mEq/L)	103±0	103±0	103±0	104±0	104±0	104±0	105±0[c,g]	105±0[c]	104±0[b]	105±0[c]
Cholesterol (mg/dL)	92±3	83±2	88±4	84±4	81±3	86±3	90±4	104±4[d,h]	92±2[j]	86±5

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Initial Age: 2-3 months			Duration of Postdose: 15 days				Location in CTD: 4.2.3.2-1			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: intravenous				GLP Compliance: yes			
			Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080										
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
LDH (U/L)	176±40	159±44	114±26	199±30	138±21	131±24	79±16[b]	108±16[f]	55±12[d,k]	49±7[c,k]
A/G ratio	2.08±0.04	2.08±0.05	1.94±0.03	2.03±0.05	1.98±0.04	2.00±0.03	1.94±0.06[b]	2.17±0.08[f]	1.88±0.03[c]	2.11±0.05
Urinalysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights absolute (g)										
Spleen	0.571±0.023	0.550±0.015	0.618±0.015	0.508±0.010	0.627±0.026	0.477±0.014	0.658±0.034[c]	0.591±0.015[g]	0.654±0.029[c]	0.569±0.024[k]
Liver	7.034±0.080	5.225±0.084	7.410±0.114	5.037±0.111	6.862±0.145	4.796±0.065	7.415±0.148[b]	5.260±0.066	6.975±0.117	5.009±0.092
Gross Pathology										
Gross Pathology	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology										
Spleen										
Increased hematopoiesis	1	2	2	0	3	0	8	7	8	4
Liver										
Mononuclear cell aggregates	8	8	6	9	7	6	5	4	3	5

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)	**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**	
	Duration of Dosing: 14 daily doses	Study No. 33981
Initial Age: 2-3 months	Duration of Postdose: 15 days	Location in CTD: 4.2.3.2-1
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous	GLP Compliance: yes
	Vehicle/Formulation: WFI	Special Features: none
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080		

Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Histopathology										
Liver										
Subacute portal inflammation	0	2	1	2	1	1	0	1	0	0
Chronic portal inflammation	0	0	0	0	0	0	9	7	8	8
Necrosis, hepatocellular	0	0	0	0	0	0	3	1	1	1
Bile duct hyperplasia	0	0	0	0	0	0	8	4	8	4
Heart										
Mononuclear cell infiltrate	2	0	2	0	5	0	2	2	4	1
Subacute inflammation	0	0	0	0	0	0	1	5	3	6
Necrosis, myocardium	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Degeneration, myocardium	0	0	1	0	0	0	1	2	1	1
Pigment, yellow-brown	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)	**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**	
	Duration of Dosing: 14 daily doses	Study No. 33981
Initial Age: 2-3 months	Duration of Postdose: 15 days	Location in CTD: 4.2.3.2-1
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous	GLP Compliance: yes
	Vehicle/Formulation: WFI	Special Features: none

No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080

Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Histopathology										
Salivary gland										
Necrosis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Chronic inflammation (infarct)	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Additional Examinations	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Postdose Evaluation [a]										
Number Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Hematology										
Hgb (g/dL)	15.3±0.2	14.6±0.2	15.2±0.2	15.2±0.2	15.7±0.2	15.0±0.1	15.3±0.2	15.1±0.2	15.5±0.1	15.7±0.0[e,j]
Hct (%)	44.4±0.3	41.9±0.7	43.8±0.8	43.2±0.7	44.4±0.5	43.1±0.4	43.9±0.6	43.6±0.6[b]	44.3±0.2	45. 8±0.6[e,k]
MCV (fL)	53.5±0.3	52.7±0.2	52.3±0.8	52.8±0.4	52.1±0.6	53.8±0.6	53.2±0.4	55.6±0.6[d,h]	53.4±0.4	55.4±0.5[d,j]
MCH (pg)	18.4±0.1	18.3±0.1	18.1±0.2	18.6±0.2	18.5±0.3	18.8±0.3	18.6±0.2	19.2±0.3[c]	18.7±0.2	19.0±0.2[b]
MCHC (g/dL)	34.4±0.3	34.8±0.2	34.6±0.1	35.4±0.3	35.4±0.3	34.9±0.2	35.0±0.2	34.5±0.2[f]	35.0±0.1	34.3±0.4
PLT (thous/µL)	1018±32	944±21	958±38	1113±47	1057±28	968±17	950±35	1030±33[b]	959±14[j]	1003±19

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Initial Age: 2-3 months			Duration of Postdose: 15 days				Location in CTD: 4.2.3.2-1			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: intravenous				GLP Compliance: yes			
			Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080										
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Number Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Hematology										
Lymphocyte (%)	89±1	90±1	87±3	84±3	86±3	89±1	89±2	89±2[f]	90±1	94±1
Neutrophil (%)	11±1	9±1	12±3	14±3	14±3	10±2	10±2	9±2	9±1	5±1[j]
Eosinophil (%)	0.0±0.0	0.7±0.2	1.2±0.4	1.7±0.4	0.3±0.2	1.7±0.6	1.0±0.5[b]	1.5±0.5	0.8±0.3[c]	1.0±0.5
Monocyte (%)	0.0±0.0	1.0±0.4	0.0±0.0	0.7±0.3	0.0±0.0	0.2±0.2	0.0±0.0[c,f]	0.0±0.0[c,f]	0.0±0.0[c]	0.0±0.0[c]
Reticulocytes (%)	1.2±0.2	0.9±0.2	1.1±0.1	1.4±0.2	1.0±0.1	1.6±0.1	1.4±0.1	1.7±0.1[c]	1.5±0.1[j]	1.7±0.2[c]
Serum Chemistry										
AST (U/L)	71±2	76±2	76±4	72±4	81±3	79±4	71±3	69±3	74±1	69±2[j]
Glucose (mg/dL)	103±3	119±3	112±4	107±6	108±6	101±4	110±5	107±2	120±8[b]	96±2[d]
Creatinine (mg/dL)	0.33±0.01	0.46±0.02	0.34±0.02	0.45±0.02	0.32±0.01	0.43±0.02	0.32±0.02	0.42±0.01[b]	0.28±0.01[b]	0.41±0.02[b]
Calcium (mg/dL)	10.4±0.1	10.3±0.1	10.1±0.1	10.5±0.1	10.1±0.1	10.0±0.1	10.3±0.1	10.2±0.1[f]	10.1±0.1[b]	10.3±0.1[j]
Phosphorus (mg/dL)	7.8±0.3	6.1±0.2	7.4±0.1	6.8±0.2	7.7±0.1	6.3±0.1	8.1±0.3[f]	5.9±0.1[g]	8.0±0.1	6.9±0.2[c,j]
Triglycerides (mg/dL)	18±1	20±2	23±3	25±1	16±1	16±2	21±4	18±1[f]	15±1	17±1
LDH (U/L)	106±21	69±15	52±11	75±25	109±13	218±63	91±16	64±13	89±15	86±17[k]

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats
(continued) Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Initial Age: 2-3 months			Duration of Postdose: 15 days				Location in CTD: 4.2.3.2-1			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]			Method of Administration: intravenous				GLP Compliance: yes			
			Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): <1400 ± 1080										
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Saline)**		**0 (Citrate buffer)**		**0 (Citrate buffer + ADVATE buffer)**		**1400**		**1400 + 1080**	
Number Evaluated	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6	M: 6	F: 6
Organ Weights absolute (g)										
Liver	7.940±0.253	5.064±0.108	7.691±0.187	5.051±0.154	6.916±0.224	4.950±0.083	7.817±0.272	5.072±0.107	7.345±0.271[b]	5.135±0.054
Histopathology										
Liver										
Mononuclear cell aggregates	6	5	6	5	6	3	6	5	5	2
Subacute portal inflammation	4	1	1	2	3	1	3	2	4	2
Necrosis, hepatocellular	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
Heart										
Mononuclear cell infiltrate	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
Subacute inflammation	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Degeneration, myocardium	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Salivary gland										

Species/ Strain: Rat (HSD/SD)			**Report Title: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats**							
			Duration of Dosing: 14 daily doses				Study No. 33981			
Chronic inflammation	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

表 2.6.7-7-2. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant von Willebrand Factor (rVWF): 14-Day Intravenous Toxicity Study in Rats (continued)

n.d. not done

- No noteworthy findings

[a] Results are shown as mean ± SE or number of animals.

[b] Significantly different ($p<0.05$) than Group 1 (Saline) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[c] Significantly different ($p<0.01$) than Group 1(Saline) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[d] Significantly different ($p<0.001$) than Group 1 (Saline) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[e] Significantly different ($p<0.0001$) than Group 1 (Saline) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[f] Significantly different ($p<0.05$) than Group 2 (Citrate buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[g] Significantly different ($p<0.01$) than Group 2 (Citrate buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[h] Significantly different ($p<0.001$) than Group 2 (Citrate buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[i] Significantly different ($p<0.0001$) than Group 2 (Citrate buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[j] Significantly different ($p<0.05$) than Group 3 (Citrate buffer + ADVATE buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[k] Significantly different ($p<0.01$) than Group 3 (Citrate buffer + ADVATE buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[l] Significantly different ($p<0.001$) than Group 3 (Citrate buffer + ADVATE buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

[m] Significantly different ($p<0.0001$) than Group 3 (Citrate buffer + ADVATE buffer) (pairwise comparisons were performed at $\alpha=0.05$ using SAS procedures)

表 2.6.7-7-3. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant Von Willebrand Factor (rVWF) Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Cynomolgus Monkeys for 14 Days Followed by a 18 Day Recovery Period

Test Articles: rVWF, ADVATE

Species/ Strain: Cynomolgus Monkeys	**Report Title: Human Recombinant Von Willebrand Factor (rVWF) Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Cynomolgus Monkeys for 14 Days Followed by a 18 Day Recovery Period**					
	Duration of Dosing: 14 daily doses			Study No. EWA0015		
Initial Age: 100-167 weeks	Duration of Postdose: 18 days			Location in CTD: 4.2.3.2-3		
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous			GLP Compliance: yes		
	Vehicle/Formulation: Sterile water for injection (WFI)			Special Features: none		
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): 100 ± 77						
Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg	**0 (Citrate buffer)**	**50+0**	**100+0**	**100+42 (Haemate P)**	**100+77**	**0+77**
Number of Animals	6	4	6	6	6	6
VWF Toxicokinetics after single dose (for total VWF, baseline adjusted values in brackets) (day 1)[a]:						
AUC_{0-t} (U•h/mL)	14.3 (0.12)	18.6 (1.8)	23.1 (4.02)	36.7 (9.34)	22.1 (3.64)	19.5 (0.03)
C_{max} (U/mL)	1.79 (0.11)	2.90 (1.07)	4.01 (1.96)	5.03 (2.75)	3.89 (1.89)	2.37 (0.11)
VWF Toxicokinetics after multiple dose (for total VWF, baseline adjusted values in brackets) (day 14)[a]:						
AUC_{0-t} (U•h/mL)	13.3 (0.42)	14.2 (1.21)	16.0 (0.69)	19.8 (1.03)	15.6 (0.66)	16.3 (0.04)
C_{max} (U/mL)	1.64 (0.16)	1.72 (0.36)	2.00 (0.38)	3.40 (1.12)	1.98 (0.44)	1.91 (0.07)
FVIII Toxicokinetics after single dose (day 1):						
Number of Animals	6	4	6	6	6	6
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	15.0	b	10.10	21.00	14.00	23.5
C_{max} (IU/mL)	2.15	1.97	2.15	3.38	4.02	4.10
FVIII Toxicokinetics after multiple dose (day 14):						
AUC_{0-t} (IU•h/mL)	13.9	b	12.3	11.00	10.50	7.41
C_{max} (IU/mL)	1.75	1.92	1.81	2.10	1.84	1.55
Body weight, Observations, Ophthalmoscopy, Electrocardiography(ECG), Blood chemistry, Urinalysis, Macropathology and Histopathology						
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-
Body weight and clinical signs	-	-	-	-	-	-
Ophthalmoscopy and ECG	-	-	-	-	-	-
Blood chemistry and urinalysis	-	-	-	-	-	-
Macropathology	-	-	-	-	-	-
Histopathology	-	-	-	-	-	-

表 2.6.7-7-3. Repeat-Dose Toxicity: Pivotal Studies: Human Recombinant Von Willebrand Factor (rVWF) Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Cynomolgus Monkeys for 14 Days Followed by a 18 Day Recovery Period (continued)

Test Articles: rVWF, ADVATE

Species/ Strain: Cynomolgus Monkeys	**Report Title: Human Recombinant Von Willebrand Factor (rVWF) Toxicity Study by Intravenous (Bolus) Administration to Cynomolgus Monkeys for 14 Days Followed by a 18 Day Recovery Period**	
	Duration of Dosing: 14 daily doses	Study No. EWA0015
Initial Age: 100-167 weeks	Duration of Postdose: 18 days	Location in CTD: 4.2.3.2-3
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous	GLP Compliance: yes
	Vehicle/Formulation: WFI	Special Features: none
No observed adverse effect level (IU/kg VWF:RCo ± FVIII IU/kg): 100 ± 77		

Daily Dose IU/kg VWF:RCo ± IU FVIII /kg		**0 (Citrate buffer)**		**50+0**		**100+0**		**100+42 (Haemate P)**		**100+77**		**0+77**	
Primary Hematology (APPT) [1)]													
Number of Animals		M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M:3	F:3	M: 3	F: 3
APTT (sec)	Pre-dose 1	30.5 ± 1.01	33.2 ± 1.89	42.7 ± 1.2 [c]	32.9 ± 2.33 [c]	31.7 ± 3.20	34.9 ± 0.72	34.0 ± 4.33	37.3 ± 3.95	36.6 ± 3.75	39.4 ± 3.76	37.3 ± 5.6	34.4 ± 5.35
	Pre-dose 2	32.2 ± 1.11	NA	44.4 ± 4.03 [c]	NA	34.6 ± 3.96	NA	36.5 ± 5.45	NA	38.1 ± 2.38	NA	40.0 ± 7.78	NA
	Day 2	32.0 ± 1.97	30.6 ± 2.89	41.9 ± 3.46 [c]	33.7 ± 2.97 [c]	35.7 ± 4.4	32.3 ± 1.46	35.5 ± 3.22	33.6 ± 3.34	36.9 ± 1.71	36.2 ± 5.10	43.0 ± 11.85*	32.6 ± 5.58
	Day 7	31.5 ± 2.41	25.5 ± 2.58	41.2 ± 0.85 [c]	27.3 ± 1.27 [c]	33.9 ± 4.07	27.8 ± 2.50	32.5 ± 3.85	28.9 ± 3.57	33.5 ± 1.35	27.8 ± 3.69	37.4 ± 7.82	27.3 ± 4.24
	Day 14	31.6 ± 2.62	28.9 ± 3.1	41.8 ± 2.47 [c]	32.1 ± 0.14 [c]	32.5 ± 3.92	30.9 ± 0.85	44.3 ± 23.26 [c]	39.1 ± 12.97	46.2 ± 9.56	41.8 ± 3.76*	37.7 ± 0.38	31.3 ± 5.46

[1)] Results are shown as mean ± SD; NA, Not applicable; -, No noteworthy findings

[a] total VWF values (endogenous +rVWF). Values adjusted for endogenous baseline are presented in brackets

[b] No AUC FVIII presented due to missing values

[c] n=2

* Significantly different ($p<0.05$) from the control group using t-test

表 2.6.7-7-4. A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period

Test Article: rVWF

Species/ Strain: Cynomolgus Monkeys	**Report Title: A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period**					
	Duration of Dosing: 28 daily doses		Study No. 506794 +179975			
Initial Age: 1 year and 9 months – 2 years and 2 months	Duration of Postdose: 14 days		Location in CTD: 4.2.3.2-4			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous slow bolus or intravenous infusion		GLP Compliance: yes			
	Vehicle/Formulation: Sterile water for injection (WFI)		Special Features: none			
No observed adverse effect level: 300 IU VWF:RCo/kg/day						
Daily Dose IU VWF:RCo/kg	**100**		**300**		**800**	
Toxicokinetics after single dose (Day 1) (for total VWF, baseline adjusted values in brackets)[b]:						
Number of Animals	M: 3	F: 3	M: 3	F: 3	M: 5	F: 5
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	44900 (12500)	46300 (11300)	77200 (46000)	80800 (33400)	214000 (181000)	200000 (143000)
C_0 (mU/mL)	3610 (2260)	3410 (1960)	7060 (5760)	7250 (4810)	18400 (17000 [a])	15500 (13800 [a])
Toxicokinetics after multiple dose (Day 16) (for total VWF, baseline adjusted values in brackets)[b]:						
Number of Animals	M: 2	F: 1	M: 1	F: 3	M: 0	F: 0
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	38400 (8840)	40400 (8910)	51200 (10700)	53600 (20800)	-	-
C_0 (mU/mL)	3570 (2350)	2300 (1530)	6510 (4930)	6850 (5500)	-	-
Toxicokinetics after multiple dose (Day 28) (for total VWF, baseline adjusted values in brackets)[b]:						
Number of Animals	M: 2	F: 0	M: 0	F: 3	M: 0	F: 0
AUC_{0-t} (mU•h/mL)	34600 (1430)	-	-	48700 (13900)	-	-
C_0 (mU/mL)	2820 (1420)	-	-	5900 (4570)	-	-

[a] C_{max} (mU/mL) shown for 800 IU VWF:RCo/kg instead of C_0 (mU/mL)

[b] total VWF values (endogenous +rVWF). Values adjusted for endogenous baseline are presented in brackets

表 2.6.7-7-4. A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period (continued)

Test Article: rVWF

Species/ Strain: Cynomolgus Monkeys	**Report Title: A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period**							
	Duration of Dosing: 28 daily doses				Study No. 506794 +179975			
Initial Age: 1 year and 9 months – 2 years and 2 months	Duration of Postdose: 14 days				Location in CTD: 4.2.3.2-4			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]	Method of Administration: intravenous slow bolus or intravenous infusion				GLP Compliance: yes			
	Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level: 300 IU VWF:RCo/kg/day								
Daily Dose IU VWF:RCo/kg	**0**		**100**		**300**		**800**	
Number of Animals	M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F:3	M: 5	F: 5
Body weights, Clinical observations								
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-	- [a]	- [a]
Body Weight	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	Anaphylactic signs*	
Ophthalmic Examination	-	-	-	-	-	-	-	-
Electrocardiology	-	-	-	-	-	-	-	-
Blood Pressure	-	-	-	-	-	-	-	-
Respiration Rate	-	-	-	-	-	-	-	-

* Anaphylactic signs such as labored breathing, subdued behavior, decreased muscle tone, shallow respiration, oral mucosa turning dark red, salivation, closed eyes and red muzzle.

- No noteworthy findings or no test article-related effects

[a] Three males and 3 females receiving 800 IU/kg/day were terminated on Day 16 of the treatment period, following complete cessation of treatment for this group during Day 13 due to anaphylactic responses.

表 2.6.7-7-4. A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period (continued)

Test Article: rVWF

Species/ Strain: Cynomolgus Monkeys		**Report Title: A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period**							
		Duration of Dosing: 28 daily doses				Study No. 506794 +179975			
Initial Age: 1 year and 9 months – 2 years and 2 months		Duration of Postdose: 14 days				Location in CTD: 4.2.3.2-4			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		Method of Administration: intravenous slow bolus or intravenous infusion				GLP Compliance: yes			
		Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level: 300 IU VWF:RCo/kg/day									
Daily Dose IU VWF:RCo/kg		**0**		**100**		**300**		**800**	
Number of Animals		M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F:3	M: 5	F: 5
Haematology and Coagulation[a]									
Platelet counts (10^9/L)	Week 1	381.4±48.7	375.6±68.3	369.0±49.7	388.0±139.3	397.7±79.5	486.5±242.5[z] (n=2)	383.2±112.8	354.3±65.4 (n=4)
	Day 15	NE	NE	NE	NE	NE	NE	208.8±45.8	178.5±34.8 (n=4)
	Week 4	359.8±70.3	295.6±82.2	360.7±28.9	388.3±42.3	219.7±85.5[b]	369.7±95.7	NE	NE
Reticulocyte counts (10^9/L)	Week 1	37.68±5.75	43.54±13.05	33.60±12.70	41.90±9.99	43.93±15.27	37.50±0.85[z] (n=2)	30.10±3.48	23.48±9.30 (n=4)
	Day 15	NE	NE	NE	NE	NE	NE	105.96±11.80	85.30±35.14 (n=4)
	Week 4	63.08±23.10	68.60±23.42	58.67±27.60	67.93±13.75	140.97±89.78	82.93±45.13	NE	NE
APTT (sec)	Week 1	20.48±2.09	20.73±4.01 (n=4)	19.70±3.98	19.60±1.04	19.90±3.36	18.00±0.75	18.84±0.96	19.25±0.56 (n=4)
	Day 15	NE	NE	NE	NE	NE	NE	22.86±4.96	21.40±3.30
	Week 4	18.90±0.82	18.52±0.59	18.10±0.44	19.13±1.70	22.77±6.26	20.27±0.97	NE	NE
Blood chemistry, Urinalysis[a]									
CRP (mg/L)	Day 15	NE	NE	NE	NE	NE	NE	5.3±1.8	3.2±1.0
	Week 4	1.6±0.8	1.9±1.8	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Blood gas		-	-	-	-	-	-	-	-
Urinalysis		-	-	-	-	-	-	-	-

- No noteworthy findings or no test article-related effects; NE, Not evaluated

[a] Results are shown as mean ± SD.

[b] Significantly different from control group value :p≤0.05 (Dunnett)

[z] Group excluded from statistical analysis (N<3)

表 2.6.7-7-4. A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period

(continued) Test Article: rVWF

Species/ Strain: Cynomolgus Monkeys		**Report Title: A 4 Week Toxicity Study of rVWF in the Cynomolgus Monkey following Intravenous Administration with a 2 Week Recovery Period**							
		Duration of Dosing: 28 daily doses				Study No. 506794 +179975			
Initial Age: 1 year and 9 months – 2 years and 2 months		Duration of Postdose: 14 days				Location in CTD: 4.2.3.2-4			
Date of First Dose: [redacted] 20[redacted]		Method of Administration: intravenous slow bolus or intravenous infusion				GLP Compliance: yes			
		Vehicle/Formulation: WFI				Special Features: none			
No observed adverse effect level: 300 IU VWF:RCo/kg/day									
Daily Dose IU VWF:RCo/kg		**0**		**100**		**300**		**800**	
Number of Animals		M: 5	F: 5	M: 3	F: 3	M: 3	F:3	M: 5	F: 5
Complement, Cytokine analysis, FVIII activity[a]									
Complement plasma proteins of BB and SC5b-9									
BB (mg/L)	Day 15	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.240±0.114	1.100±0.245
	Week 4	0.540±0.152	0.660±0.134	NE	NE	NE	NE	NE	NE
SC5b-9 (ng/mL)	Day 15	NE	NE	NE	NE	NE	NE	357.8±31.8	261.0±34.5
	Week 4	175.0±40.5	153.2±16.5	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Cytokine analysis		-	-	NE	NE	NE	NE	-	-
Baseline FVIII activity (IU/mL)	Day 1	1.36±0.15		1.36±0.37		1.32±0.17		1.37±0.21	
	Day 16	1.23±0.18		1.05±0.24		1.04±0.18		NA	
	Day 28	1.26±0.18		0.95±0.21		0.71±0.34		NA	
Organ weight, Gross pathology, Histopathology[a]									
Organ weight		-	-	-	-	-	-	-	-
Gross pathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Histopathology		-	-	-	-	-	-	-	-
Anti-VWF antibody (developed in all animals receiving rVWF)									
Neutralizing antibodies	Week 2	NA		3/6		2/6		10/10	
	Day 15	NA		NA		NA		8/10	
	Week 4	NA		4/6		3/6		NA	

	Recovery Week 2	NA	NA	NA	4/4

-, No noteworthy findings or no test article-related effects; NE, Not evaluated; NA, Not applicable; [a] Results are shown as mean ± SD.

2.6.7.8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

表 2.6.7-8-1. Genotoxicity: *In Vitro*

Test Article: rVWF

Report Title: ”rVWF”: Salmonella Typhimurium Reverse Mutation Test			
Test for Induction of: Reverse mutation of bacterial cells		No. of Independent Assays: 2	Study No. BAX22
Strains: TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535		No. of Replicate Cultures: 3	Location in CTD: 4.2.3.3.1-1
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9		No. of Cells Analyzed/Culture: -	
Vehicle:	For Test Article: rVWF buffer	For Positive Control: sterile water (sodium azide, t-butyl-hydroperoxide); DMSO (other controls)	GLP Compliance: yes
Treatment: direct plate incorporation method			Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: none			
Genotoxic Effects: none			

Metabolic Activation	**Test Article**	**Conc./ plate**	**Assay # 1: mean revertants / plate**					**Assay # 2: mean revertants / plate**				
			TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
Without Activation	rVWF	100 µL	119.3	7.3	70.7	196.3	9.7	143.0	9.7	68.0	205.7	7.0
		33 µL	119.7	9.7	66.7	191.0	10.0	144.0	9.0	70.7	240.3	9. 3
		11 µL	107.7	8.3	67.3	196.7	9.3	124.3	13.0	76.3	219.0	11.0
		3.7 µL	113.0	12.3	83.3	193.3	10.7	142.0	10.0	79.7	228.0	9.3
		1.2 µL	130.3	11.7	91.7	173.3	8.0	143.3	17.0	83.0	224.7	9.7
	Deionised water	100 µL	96.7	14.0	83.3	145.0	9.3	96.3	13.7	68.3	201.3	7.3
	rVWF buffer	100 µL	100.0	9.2	83.0	188.0	12.0	111.3	11.7	72.5	213.3	9.5
	4-Nitro-o-phenylene-diamine	10 µg	315.3	-	-	-	-	357.0	-	-	-	-
	2-Nitrofluorene	2 µg	-	190.0	-	-	-	-	136.0	-	-	-
	Sodium-azide	2 µg	-	-	522.0	-	-	-	-	521.3	-	-
	t-Butyl-hydroperoxide	50 µg	-	-	-	496.0	-	-	-	-	396.7	-
	Sodium-azide	1 µg	-	-	-	-	362.7	-	-	-	-	326.3

表 2.6.7-8-1. Genotoxicity: *In Vitro* (continued)

Test Article: rVWF

Report Title: ”rVWF”: Salmonella Typhimurium Reverse Mutation Test			
Test for Induction of: Reverse mutation of bacterial cells		No. of Independent Assays: 2	Study No. BAX22
Strains: TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535		No. of Replicate Cultures: 3	Location in CTD: 4.2.3.3.1-1
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9		No. of Cells Analyzed/Culture: -	
Vehicle:	For Test Article: rVWF buffer	For Positive Control: sterile water (sodium azide, t-butyl-hydroperoxide); DMSO (other controls)	GLP Compliance: yes
Treatment: direct plate incorporation method			Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Cytotoxic Effects: none			
Genotoxic Effects: none			

Metabolic Activation	**Test Article**	**Conc./ plate**	**Assay # 1: mean revertants / plate**					**Assay # 2: mean revertants / plate**				
			TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
With Activation	rVWF	100 µL	141.3	12.3	82.3	239.7	9.7	140.7	11.3	83.0	225.7	5.0
		33 µL	133.3	11.0	90.3	237.3	9.3	142.7	13.7	88.3	231.0	8.7
		11 µL	128.3	12.7	101.7	247.7	10.7	138.0	13.3	71.0	261.0	9.0
		3.7 µL	133.3	13.0	84.7	244.3	9.0	135.7	15.3	92.3	261.0	9.0
		1.2 µL	138.7	15.3	88.7	231.3	9.0	143.3	13.0	74.0	234.3	10.7
	Deionised water	100 µL	122.0	13.7	90.0	167.7	9.7	113.7	13.3	84.0	260.0	9.3
	rVWF buffer	100µL	125.5	12.8	89.2	208.8	9.3	131.2	12.0	78.0	252.7	10.2
	7,12-Dimethylbenz[a] anthracene	10 µg	462.3	-	-	-	-	447.3	-	-	-	-
	2-Aminoanthracene	1 µg	-	873.0	-	-	-	-	501.0	-	-	-
	2-Aminoanthracene	2 µg	-	-	1679.7	-	163.7	-	-	1600.3	-	177.3
	1,8-Dihydroxy-anthraquinone	50 µg	-	-	-	847.0	-	-	-	-	913.7	-

表 2.6.7-8-2. Genotoxicity: *In Vitro*

Test Article: rVWF

Report Title: Human Recombiant Von Willebrand Factor (rVWF) *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test In Human Lymphocytes							
In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test In Human Lymphocytes				No. of Independent Assays: 2		Study No. BAX0013	
Species/Strains: human				Location in CTD: 4.2.3.3.1-2			
Cells Evaluated: human lymphocytes				stimulated to divide by addition of phytohaemagglutinin		GLP Compliance: yes	
Vehicle:	Fot Test Article: sterile water	For Positve controls: sterile purified water				Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]	
Treatment: direct plate incorporation method both in the presence and absence of S9 mix derived from rat livers							
Toxic/Cytotoxic Effects: none							
Genotoxic Effects: none							
Exposure (hours)	**Test article**	**S9 mix**	**Dose (IU VWF:RCo/mL)**	**Cells with aberrations excluding gaps (mean %)**	**Cells with aberrations including gaps (mean %)**	**Relative Mitotic Index (%)**	**Polyploidy frequency**
3	Sterile water	-	0	1.5	4.5	100	3
3	Saline	-	0	0.5	4	110	1
3	rVWF	-	3.15	1.5	4.5	140	0
3	rVWF	-	6.3	1.5	4	98	1
3	rVWF	-	12.6	0	3	112	1
3	Mitomycin C	-	0.2 µg/mL	22[a]	27[a]	-	1
3	Sterile water	+2% v/v	0	0	1.5	100	1
3	Saline	+2% v/v	0	1	2.5	77	1
3	rVWF	+2% v/v	3.15	1	2	67	3
3	rVWF	+2% v/v	6.3	2	3	77	1
3	rVWF	+2% v/v	12.6	0	1	77	1
3	Cyclophosphamide	+2% v/v	5 µg/mL	23[a]	25.5[a]	-	1

-: Not applicable

[a] p<0.001, One-tailed Fisher's exact test

表 2.6.7-8-2. Genotoxicity: *In Vitro* (continued)

Test Article: rVWF

Report Title: Human Recombiant Von Willebrand Factor (rVWF) *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test In Human Lymphocytes				
In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test In Human Lymphocytes			No. of Independent Assays: 2	Study No. BAX0013
Species/Strains: human			Location in CTD: 4.2.3.3.1-2	
Cells Evaluated: human lymphocytes			stimulated to divide by addition of phytohaemagglutinin	GLP Compliance: yes
Vehicle:	For Test article: sterile water	For Positve controls: sterile purified water		Date of Treatment: [redacted] 20[redacted]
Treatment: direct plate incorporation method both in the presence and absence of S9 mix derived from rat livers				
Toxic/Cytotoxic Effects: none				
Genotoxic Effects: none				

Exposure (hours)	**Test article**	**S9 mix**	**Dose (IU VWF:RCo/mL)**	**Cells with aberrations excluding gaps (mean %)**	**Cells with aberrations including gaps (mean %)**	**Relative Mitotic Index (%)**	**Polyploidy frequency**
21	Sterile water	-	0	2	3.5	100	0
21	Saline	-	0	1.5	3	122	0
21	rVWF	-	3.15	1.5	4.5	109	0
21	rVWF	-	6.3	1.5	2	113	0
21	rVWF	-	12.6	1	2	111	0
21	Mitomycin C	-	0.1 µg/mL	28[a]	33[a]	-	0
3	Sterile water	+5% v/v	0	0	1.5	100	1
3	Saline	+5% v/v	0	1	3.5	85	2
3	rVWF	+5% v/v	3.15	0	3.5	99	2
3	rVWF	+5% v/v	6.3	0.5	2.5	94	0
3	rVWF	+5% v/v	12.6	0	1	94	0
3	Cyclophosphamide	+5% v/v	5 µg/mL	18.5[a]	24[a]	-	2

- Not applicable

[a] $p<0.001$, One-tailed Fisher's exact test

2.6.7.9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

表 2.6.7-9-1. Genotoxicity: *In Vivo*

Test Article: rVWF

Test for Induction of: micronuclei	**Report Title: "rVWF": Micronucleus Test with Mice**		
	Treatment Schedule: single dose		Study No. BAX24
Species/Strains: Mouse / Crl:NMRI BR	Sampling Time: 24, 48 hours after administration		Location in CTD: 4.2.3.3.2-1
Cells Evaluated: bone marrow cells	Method of Administration: intravenous		
No. of Cells Analyzed/Animal: 2000	Vehicle/Formulation: formulation buffer (citrate buffer)		GLP Compliance: yes
Special Features: none			Date of Dosing: [redacted] 20[redacted]
Toxic/Cytotoxic Effects: none			
Genotoxic Effects: none			
Evidence of Exposure: -			

Test Article	**Dose (IU VWF:RCo/kg)**	**No. of Animals**	**Relevant increases of numbers of micronuclei**
rVWF	158	5M	none 24 hours after admin.
rVWF	315	5M	none 24 hours after admin.
rVWF	631	5M + 5M	none 24 and 48 hours after admin.
Citrate buffer (neg. control)	5 mL/kg	5M + 5M	none 24 and 48 hours after admin.
Cyclophosphamide (pos. control)	40 mg/kg	5M	micronuclei in polychromatic erythrocytes 24 hours after admin.

2.6.7.10 がん原性試験

表 2.6.7-10-1. Carcinogenicity

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Not applicable

2.6.7.11 生殖発生毒性試験: 重要な試験以外の試験

表 2.6.7-11-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Nonpivotal Studies

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Not applicable

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

表 2.6.7-12-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Fertility and Early Embryonic Development to Implantation (Pivotal)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Not applicable

2.6.7.13 生殖発生毒性試験: 胚・胎児発生に関する試験

表 2.6.7-13-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Embryofetal Development (Pivotal)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Not applicable

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

表 2.6.7-14-1. Reproductive and Developmental Toxicity: Effects on Pre- and Postnatal Development, including Maternal Function (Pivotal)

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Not applicable

2.6.7.15 新生児を用いた試験

表 2.6.7-15-1. Studies in Juvenile Animals

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Not applicable

2.6.7.16 局所刺激性試験

表 2.6.7-16-1. Local Tolerance

Test Articles: rVWF, rVWF + ADVATE

Species/Strain /Treatment	Method of Administration	Doses	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Rabbit (NZW)					
rVWF	intravenous intraarterial paravenous	10 mL 10 mL 0.5 mL	6M/6F	No findings	PV2000701
rVWF + rFVIII	intravenous intraarterial paravenous	10 mL 10 mL 0.5 mL	6M/6F	No findings	

2.6.7.17 その他の毒性試験

表 2.6.7-17-1. Other Toxicity Studies: Immunogenicity in mice

Test Articles: rVWF, ADVATE, rVWF + ADVATE

Species/Strain / Treatment	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (/animal/week)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
Mouse (Balb/c)						
rVWF	intravenous	4 doses given at weekly intervals	10 µg, 50 µg	5M/5F	none	FS-IM00907
rVWF + rFVIII			50 µg + 0.464 µg	5M/5F	none	
rFVIII			0.464 µg	5M/5F	none	
Mouse (E17 hemophilic Balb/c)						
rFVIII	intravenous	8 doses given at weekly intervals	200 ng	9M	none	IMM_R&D_017_11
rFVIII+highly purified pdVWF			200 ng + 2 µg	9M	none	
rFVIII+Wilfactin (pdVWF)			200 ng + 2 µg	9M	none	
rFVIII + rVWF			200 ng + 2 µg	9M	none	
Mouse (E17 hemophilic C57BL/6J)						
rFVIII	intravenous	8 doses given at weekly intervals	200 ng	9M	none	IMM_R&D_017_11
rFVIII+highly purified pdVWF			200 ng + 2 µg	9M	none	
rFVIII+Wilfactin (pdVWF)			200 ng + 2 µg	9M	none	
rFVIII + rVWF			200 ng + 2 µg	9M	none	
Mouse (E17 hemophilic human F8 transgenic)						
rVWF	intravenous	8 doses given at weekly intervals	10 µg	5M/5F	none	IMM_R&D_017_11
rVWF			50 µg	5M/5F	none	
rFVIII			464 ng	5M/5F	none	
rFVIII+rVWF			464 ng + 50 µg	5M/5F	none	

表 2.6.7-17-2. Other Toxicity Studies: Repeat-dose feasibility in rabbits

Test Article: rVWF

Species/Strain /Treatment	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (/animal/day)	Gender and No. Per Group	Study Number
Rabbit (NZW)					
rVWF	intravenous	14 daily doses	80, 400, 800 IU VWF:RCo/kg	6F	528575
Noteworthy Findings: Intravenous daily injection of 800 IU VWF:RCo/kg for 14 days was associated with a prolonged clotting time that was visible in-life, with difficulty in stemming blood flow, lower red blood cell mass, higher white blood cell numbers and reticulocytes, higher spleen weights, and increased hematopoiesis in the spleen and liver. Similar differences in hematology, a prolonged clotting time and increased hematopoiesis in the liver were noted for 80 and 400 IU VWF:RCo/kg of rVWF. These findings are considered to be the result of formation of antibodies against VWF, which was confirmed by TK and antibody analysis. All three doses (80, 400, and 800 IU VWF:RCo/kg) induced development of binding anti-VWF antibodies and neutralizing inhibitory antibodies. After 14 days of repeated dosing, exposure values for animals that received rVWF decreased from those recorded on Day 1. On Day 1, the antigen VWF (VWF:Ag) was detected 0.25 to 18 h after dosing in the plasma from all animals that received rVWF. On Day 14, VWF:Ag was not detected, except in 3 of 6 animals that received 800 IU VWF:RCo/kg.					

表 2.6.7-17-3. Other Toxicity Studies: *In vitro* mechanistic study

Test Article: rVWF

Species/Strain /Treatment	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (/animal)	Gender and No. Per Group	Noteworthy Findings	Study Number
ADAMTS13 ko mouse; C57BL/6J mouse; VWd mouse; rat; guinea pig; rabbit; dog; cynomolgus monkey	*In vitro* (incubation of plasma)	na	1 U VWF:Ag/mL	na	Plasma samples from rabbit and monkey and to a lesser extent from pig and dog were able to cleave human rVWF, whereas no cleavage could be shown with plasma from rat, guinea pig, and mouse.	RD_VB_110702

na: Not applicable