サノフィ株式会社

efanesoctocog alfa

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.6 毒性試験の概要文

Total number of pages: 39

目　　次

2.6.6 毒性試験の概要文 1

目　　次 2

表　目　次 4

略号と用語の定義 5

1　　まとめ 7

2　　単回投与毒性試験 9

3　　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む） 10

3.1　げっ歯類 10

3.1.1　ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 14 日間回復性試験 10

3.2　非げっ歯類 14

3.2.1　サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 21 日間回復性試験 14

4　　遺伝毒性試験 25

5　　がん原性試験 26

6　　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む） 28

7　　局所刺激性試験 30

8　　その他の毒性試験 31

8.1　ヒト全血を用いた *in vitro* 血液適合性試験 31

8.2　免疫原性 31

8.3　薬物乱用傾向の評価 32

8.4 不純物 33

8.5 抽出物及び溶出物 33

9 考察及び結論 34

9.1 反復投与毒性試験 34

9.2 遺伝毒性及びがん原性リスク 35

9.3 生殖発生毒性 35

9.4 血液適合性 36

9.5 包括的な要約 36

10 図表 37

参 考 文 献 38

表　目　次

表 1 - 本薬について実施した毒性試験 7
表 2 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験で本薬に対する ADA が陽性であった個体 11
表 3 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験における Day 1 の発色活性に基づくトキシコキネティクス12
表 4 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験における Day 1 の血漿中濃度に基づくトキシコキネティクス 12
表 5 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験：被験物質に関連する主な所見 13
表 6 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験で本薬に対する ADA が陽性であった個体 15
表 7 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験で D'D3 及び XTEN サブユニットに対する ADA が陽性であった個体 16
表 8 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の Day 1 における発色活性に基づくトキシコキネティクス 17
表 9 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の Day 1 における血漿中濃度に基づくトキシコキネティクス18
表 10 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験：被験物質に関連する主な所見 19
表 11 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の Day 13、33 及び 50 における末梢血 aPTT 値 20
表 12 - 4 週間反復投与毒性試験の雄サルにおける個体ごとの aPTT 値及び ADA 21
表 13 - 4 週間反復投与毒性試験の雌サルにおける個体ごとの aPTT 値及び ADA 22

略号と用語の定義

ADA:	抗薬物抗体（Anti-drug antibodies）
aPTT:	活性化部分トロンボプラスチン時間（Activated partial thromboplastin time）
AST:	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（Aspartate aminotransferase）
AUC:	血漿中濃度又は活性－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration or activity versus time curve）
AUC/Dose:	用量で補正した血漿中濃度又は発色活性－時間曲線下面積（Dose normalized area under the plasma concentration or activity versus time versus time curve）
AUC_{0-t}:	投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma concentration curve from time 0 to time t）
BDD	B ドメイン除去（B-domain deleted）
CK:	クレアチンキナーゼ（Creatine kinase）
C_{max}:	最高血漿中濃度又は活性（Maximum plasma concentration or activity）
CNS:	中枢神経系（Central nervous system）
DNA:	デオキシリボ核酸（Deoxyribonucleic acid）
イロクテイト／Elocta:	サノフィのエフラロクトコグ アルファ（BDD 血液凝固第 VIII 因子及び Fc からなる遺伝子組換え融合タンパク質）（Efmoroctocog alfa from Sanofi/Sobi, which is a fusion protein that comprises a recombinant B-domain deleted factor VIII and an Fc）
EMA:	欧州医薬品庁（European Medicines Agency）
F:	雌（Female）
Fc:	IgG1 の結晶化可能領域フラグメント（Fragment crystallizable region of IgG1）
FcRn:	胎児型 Fc 受容体（Neonatal Fc receptor）
FDA:	米国食品医薬品局（U.S. Food and Drug Administration）
FIX:	血液凝固第 IX 因子（Factor IX）
FVIII:	血液凝固第 VIII 因子（Factor VIII）
GLP:	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good laboratory practice）
h 又は hr:	時間（Hour）

ICH:	医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、旧称 International Conference on Harmonisation）
IgG1:	免疫グロブリン G1（Immunoglobulin G1）
IU:	国際単位（International unit）
IV:	静脈内（Intravenous）
M:	雄（Male）
MW:	分子量（Molecular weight）
n:	値の数（Number of values）
NA:	該当せず（Not applicable）
NaCl:	塩化ナトリウム（Sodium chloride）
Neg:	陰性（Negative）
NOAEL:	無毒性量（No observed adverse effect level）
PMDA:	医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency）
Pos:	陽性（Positive）
PT:	プロトロンビン時間（Prothrombin time）
rFVIIIFc:	BDD 血液凝固第 VIII 因子及び Fc からなる遺伝子組換え融合タンパク質（Recombinant fusion protein comprising a BDD factor VIII and an Fc）
SD:	標準偏差（Standard deviation）
Sec:	秒（Seconds）
$t_{1/2}$:	最終相の消失半減期（Terminal half-life）
TK:	トキシコキネティクス（Toxicokinetic(s)）
VWF:	von Willebrand 因子（von Willebrand factor）
x:	変化の倍率（Fold changes）
XTEN ポリペプチド:	6 つの天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）からなるモチーフの反復配列で構成される非構造化親水性ポリペプチド。XTEN は Amunix Pharmaceuticals Inc.の登録商標である。（Unstructured hydrophilic polypeptide, composed of repeating motifs of 6 natural amino acids (Gly, Ala, Pro, Glu, Ser, Thr or G,A,P,E,S,T). XTEN is registered trademark of Amunix Pharmaceuticals Inc.）

1　まとめ

Efanesoctocog alfa（国際一般名［INN］、開発コード：BIVV001）は、B ドメインを除去した単鎖ヒト血液凝固第 VIII 因子（FVIII）、ヒト免疫グロブリン G1（IgG1）の結晶化可能領域フラグメント（Fc）ドメイン、ヒト VWF のうち FVIII と結合する D′D3 ドメイン、及び 2 つの XTEN ポリペプチドからなる遺伝子組換え融合タンパク質（rFVIIIFc-VWF-XTEN）である。分子の Fc、VWF-D′D3、及び XTEN ポリペプチド部分はそれぞれ血漿中 FVIII 分子の半減期を延長させるよう設計されている。本文書を通して、efanesoctocog alfa を本薬と記載する。トロンビンにより本薬が活性化されると、rFVIII と Fc の融合タンパク質が分離される。

本薬の毒性試験プログラムは、用量漸増単回投与第 I/IIa 相試験から製造販売承認までの臨床試験プログラムを支持するよう設計された。毒性試験プログラムは、Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルの 2 動物種で実施した医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用 4 週間反復投与毒性試験並びに血液適合性の *in vitro* 評価で構成された（表 1）。その他の凝固因子製剤の開発と同様に、また抗薬物抗体が産生されたため、長期毒性試験は実施していない。

表 1 - 本薬について実施した毒性試験

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP（適用／非適用）
反復投与毒性試験			
4 週間	IV	ラット	適用
4 週間	IV	サル	適用
その他の毒性試験			
In vitro 血液適合性	NA	NA	適用

略号：GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、IV = 静脈内、NA = 該当せず

市販されているその他の FVIII 製剤と同様に、幼若動物の毒性試験を含む、独立した生殖発生毒性試験は実施していない。ただし、反復投与毒性試験に生殖器官の評価を含めた。妊娠に伴い凝固因子の顕著な増加を含め止血系に変化が生じ、妊娠中は血液凝固亢進状態にある。止血系が正常な妊娠動物に FVIII を補充投与すると、妊娠中の血液凝固亢進状態が激化して毒性評価に影響を及ぼすと考えられる。

医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 (R1) ガイドライン(1) に合致して、本薬の遺伝毒性は評価していない。本薬がデオキシリボ核酸（DNA）と相互作用を起こすと予想される機序は知られていないため、遺伝毒性のリスクはないと考えられる。本薬のがん原性試験は実施していない。がん原性リス

ク評価の科学的根拠の重要度（weight-of-evidence）アプローチから、本薬のがん原性リスクは無視できる程度と考えられる。

毒性試験の投与経路は、臨床試験及び市販用の投与で予定されている静脈内（IV）投与を選択した。ラット及びサルにおける GLP 適用反復投与毒性試験には雌雄の動物を用いた。予定されている患者集団は主に男性であるが、FVIII 欠乏症の女性に本薬を使用する可能性があり、それを支持するため、毒性プログラムでは雌も使用した。GLP 適用反復投与毒性試験の最高用量である 750 IU/kg/回は、第 III 相臨床試験の用量（50 IU/kg）の 15 倍である。

ラット及びサルを用いた 4 週間反復投与毒性試験では、10 mmol/L ヒスチジン、250 mmol/L アルギニン塩酸塩、5%精製白糖、5 mmol/L $CaCl_2$、0.05%ポリソルベート 80 からなる溶媒（pH 7）で調製した本薬を使用した。これらの毒性試験で使用した本薬原薬のバッチは、臨床試験用及び市販用として予定されている製剤を代表するものである。毒性試験で使用した本薬バッチを用いた凝固一段法（活性化部分トロンボプラスチン時間［aPTT］）活性アッセイによると、比活性は 2458 IU/mg であった。

ラット及びサルは毒性評価において標準的な動物種であり、凝固カスケード中の活性は動物種間でよく保存されている(2)ことから本薬の毒性評価に適した種である。さらに、本薬の Fc 部分（市販製品であるイロクテイト／Elocta と同一）はラット及びサル並びにヒトの新生児型 Fc 受容体（FcRn）に結合する(3)(4)。本薬は FVIII 補充療法薬であり、FVIII 欠乏症の動物モデル（血友病 A マウス(5)）で凝固活性を示したことから、市販されているその他の FVIII 製剤と同様、ラット及びサルは毒性試験で薬理学的に反応する動物種であると考えられた。イロクテイト／Elocta 及びその他の rFVIII 分子から得られた知見に基づくと、より長期間投与すると中和抗体又は過敏性反応が発現し、解釈が困難となる。したがって、4 週間を超える毒性期間は意義がないと考え実施しなかった。保健当局は更なる非臨床毒性試験が必要ないとの点に同意している（米国食品医薬品局［FDA］は 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日の[redacted]相談(6)、欧州医薬品庁［EMA］は 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日の科学的助言における見解(7)、及び医薬品医療機器総合機構［PMDA］は 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日の[redacted]相談(8) において同意）。現時点で、動物における組換えヒト FVIII タンパク質に対する抗体応答は、ヒトにおける抗体応答を予測するものではない(9)。

非臨床反復投与毒性試験では、本薬をラットに 75、250、及び 750 IU/kg/回の用量で 3 日ごとに、並びにサルに 25、75、250、及び 750 IU/kg/回の用量で 4 日ごとに、それぞれ IV 投与して評価した。全体として、4 週間反復投与毒性試験では本薬の薬理活性／意図する機序に直接起因する毒性所見は認められなかった。両非臨床動物種ともに、反復 IV 投与後、投与部位における本薬の忍容性は良好であった。4 週間 IV 投与したときの無毒性量（NOAEL）は、ラット及びサルともに評価した最高用量である 750 IU/kg/回とした。さらに、ヒト全血を用いる *in vitro* 血液適合性試験において、本薬の溶血性及び血漿凝集性は認められなかった。

2　単回投与毒性試験

本薬の単回投与毒性試験は実施しなかった。ラット及びサルを用いた GLP 適用反復投与毒性試験において 750 IU/kg までの用量を投与したところ、投与期間の Day 1 に毒性変化及び一般状態の変化は認められなかった。

3　反復投与毒性試験（トキシコキネティクス評価を含む）

3.1　げっ歯類

3.1.1　ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 14 日間回復性試験

[P073-16-02] 試験（Module 4.2.3.2-1）

Sprague-Dawley ラットを用いて 4 週間反復投与毒性試験を実施した（Module 2.6.7 毒性試験概要表、P073-16-02 試験 [表 2.6.7.7 A]を参照）。この試験で、0（溶媒対照）、75、250、又は 750 IU/kg/回の本薬を 3 日ごとに 4 週間、計 10 回 IV（低速ボーラス）投与した。主試験には 10 匹／性／群、回復試験用サブグループには対照群及び 750 IU/kg/回群の各 5 匹／性、並びにトキシコキネティクス（TK）試験用サブグループには 3 匹／性（対照群）及び 9 匹／性（本薬の各投与群）を用いた。ラットは投与開始時に 7 週齢であった。

評価した毒性パラメータは、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液学的検査、血清生化学的検査、血液凝固検査、尿検査、抗薬物抗体（ADA）、TK、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査であった。毒性評価に使用しないサテライト群の血漿を用いて TK を評価した。TK 評価用の血漿試料は、Day 1 及び 28 の投与前、投与 0.25、2、8、24、48、及び 72 時間後、並びに Day 13 の投与前に採取した。本薬に対する ADA の有無によるスクリーニングを、TK 用動物では Day 1、13、及び 28 に、主試験用動物では Day 29 に、回復試験用動物では Day 43 に実施した。10 回投与後、10 匹／性／群を Day 29 に安楽殺し、対照群及び 750 IU/kg/回群は残りの各 5 匹／性について 14 日間の回復期間を設け Day 43 に安楽殺した。

スクリーニングアッセイ、確認アッセイ、及びインタクトな本薬分子に対する抗体価の評価により本薬に対する ADA の産生を評価した。対照ラットにおいて、ADA 陽性を示す検体はなかった。本薬の 75、250、及び 750 IU/kg/回投与群において、陽性動物の発現率は雌雄で同程度であった。ADA の発現率及び陽性反応の発現時点は、明らかに投与量に関連して増加し、抗体価も投与量に関連して増加した。抗体価は雌雄で同程度であったが、例外として 75 IU/kg/回群では概して雌よりも雄の方が高値であった。750 IU/kg/回群の回復期間後（Day 43）には、全ての検体で ADA 陽性が確認され、抗体価が高かった。本薬に対する抗体陽性を示したラットについて表 2 に要約する。

表 2 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験で本薬に対する ADA が陽性であった個体

投与量 (IU/kg/回)	スクリーニングアッセイ	確認アッセイ		抗体価測定
	Day 13 に陽性とスクリーニングされた個体[a]の数（割合）*	Day 28 又は 29 に陽性と確認された個体[a]の数（割合）*	Day 43 に陽性と確認された個体の数（割合）*	報告された抗体価の範囲
溶媒	0/36	0/36	0/10	-
75	19/38 (50.0%)	16/38 (42.1%)	NA	20 - 10240
250	26/38 (68.4%)	25/38 (65.8%)	NA	20 - 20480
750	43/48 (89.6%)	43/48 (89.6%)	10/10 (100%)	40 - 40960

略号：ADA = 抗薬物抗体、IU = 国際単位、NA = 投与群に割り当てられた回復試験用動物がなかったため該当せず
* ADA 陽性が確認された雌雄ラット数/当該時点で評価したラットの数
- : ADA 陽性試料がなかったため報告せず
a 主試験用及びトキシコキネティクス用動物から採取した試料が含まれる。

本薬を IV ボーラス投与されたラットで、タンパク質濃度及び FVIII の発色活性の両者の評価から本薬の血漿中曝露が確認された。反復投与後、ADA 陽性が確認された TK 用動物で血漿中濃度及び発色活性がより低かった。このため、ADA 陽性が確認されたラットは統計解析から除外した。このように、特に 250 及び 750 IU/kg/回の用量で Day 28 の TK 評価に支障をきたし ADA 陰性例の数が不十分であったことから、蓄積性及び用量比例性を評価することができなかった。

Day 1 の曝露量に性差はなかった。最高血漿中濃度又は発色活性値（C_{max}）は概して初回試料採取時点である 0.25 時間後に認められた。雄では、発色活性から測定した C_{max} 及び血漿中発色活性－時間曲線下面積（AUC）はほぼ用量に比例して増加した。濃度に基づく C_{max} 及び AUC の測定値にも同じ傾向が認められた。雌では、発色活性から測定した C_{max} 及び AUC は用量に比例して増加した。しかし、濃度に基づく C_{max} 及び AUC は、高用量群（750 IU/kg/回）で用量比をわずかに下回った。半減期の群平均値は検討した全ての投与群で性差が認められず、発色活性から測定したところ 17.0～22.6 時間（平均値は 19.4 時間）、濃度から測定したところ 18.3～21.2 時間（平均値は 20.0 時間）であった。

本薬の濃度の経時的推移及び発色活性の経時変化は全ての投与量で対応していたことから、投与量が増加すると発色活性も増加することが示された（Module 2.6.7、P073-16-02 試験 [表 2.6.7.7 A]及び Module 2.6.4 薬物動態試験の概要文 [3.2.1 項]参照）。本薬の発色活性及び濃度から測定した TK パラメータをそれぞれ表 3 及び表 4 に要約する。

表 3 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験における Day 1 の発色活性に基づくトキシコキネティクス

性別	投与量 (IU/kg/回)	C_{max} (mIU/mL)	AUC_{0-t} (mIU•hr/mL)	AUC_{0-t}/Dose (mIU•hr/mL)/ (IU/kg/回)	$t_{1/2}$ (hr)
M	75	2170	37500	501	17.0
	250	7780	139000	557	20.0
	750	22100	382000	509	22.6
F	75	1870	32200	429	17.8
	250	5930	95900	384	20.6
	750	16200	365000	487	18.5

略号：AUC_{0-t} = 投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿発色活性ー時間曲線下面積、AUC/Dose = 用量で補正した血漿中発色活性ー時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度又は活性、F = 雌、hr = 時間、IU = 国際単位、M = 雄、$t_{1/2}$ = 最終相の消失半減期

表 4 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験における Day 1 の血漿中濃度に基づくトキシコキネティクス

性別	投与量 (IU/kg/回)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng•hr/mL)	AUC_{0-t}/Dose (ng•hr/mL)/ (IU/kg/回)	$t_{1/2}$ (hr)
M	75	519	9000	120	*
	250	1790	36600	146	20.8
	750	5750	75900	101	21.2
F	75	528	8230	110	18.3
	250	1660	23200	92.6	19.6
	750	2520	50700	67.6	20.0

略号：AUC_{0-t} = 投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿中濃度ー時間曲線下面積、AUC/Dose：用量で補正した血漿中濃度ー時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度又は活性、F = 雌、hr = 時間、IU = 国際単位、M = 雄、$t_{1/2}$ = 最終相の消失半減期

* 結果は報告しなかった。R2（決定係数）が 0.800 未満の場合、又は AUC を無限大時間まで外挿したとき全面積の 20%を超える場合、最終相の決定に依存するパラメータは報告しなかった。

本試験で認められた被験物質に関連する主な所見を表 5 に要約する。本試験で死亡は生じなかった。試験中、一般状態観察、眼科学的検査、体重、摂餌量、血液学的検査、血液凝固系検査、及び尿検査のパラメータにおいて、本薬に関連する変化はなかった。

表 5 - ラットを用いた 4 週間反復投与毒性試験：被験物質に関連する主な所見

パラメータ	被験物質に関連する主な所見	
死亡	なし	
一般状態観察	なし	
眼科学的検査	なし	
臨床病理学的検査	血液学的検査：	なし
	血液凝固系検査：	なし
	血清生化学的検査：	一過性で毒性でなく可逆性のグルコース（M、250 IU/kg/回以上）及びアルブミン／グロブリン比（M、750 IU/kg/回）の軽微な増加、一過性で毒性でなく可逆性のグロブリン及び総タンパク（M、750 IU/kg/回）の軽微な減少
	尿検査：	なし
器官重量	なし	
病理組織学的検査	なし	
NOAEL	750 IU/kg/回	

略号：IU = 国際単位、M = 雄、NOAEL = 無毒性量

本薬を投与された雄のみで、対照群に比べ血清生化学的検査パラメータに軽微な差が認められた。250 IU/kg/回以上の群の雄でグルコース濃度が増加した（1.23 倍～1.26 倍）。750 IU/kg/回群の雄では、グロブリン濃度の減少（0.89 倍）、総タンパク濃度の軽微な減少（0.96 倍）、及びアルブミン／グロブリン比の軽微な増加（1.14 倍）が認められた。投与期間終了時に認められたこれらの差は、散発的で程度が小さく、病理組織学的検査及び器官重量において関連する変化がなかったことから毒性ではないと考えられた。ただし、変化は軽微であったものの、本薬に関連する可能性は除外できなかった。2 週間の回復期間終了時において、血清生化学的パラメータに本薬に関連する変化は認められなかったことから、投与期間にみられた影響は可逆的であることが示された。

器官重量、剖検、及び病理組織学的検査において、被験物質に関連する変化はみられなかった。投与部位で認められた病理組織学的所見は溶媒投与ラットと本薬投与ラットとで同様であったことから、本薬の局所忍容性は良好であることが示された。

結論として、Sprague-Dawley ラットに本薬を 0、75、250、又は 750 IU/kg/回の用量で 4 週間 IV 投与（3 日に 1 回、計 10 回投与）した後 14 日間の回復期間を設けたところ、血清生化学的検査において軽微で毒性でない可逆性の変化が認められたが、剖検、器官重量、及び病理組織学的検査では被験

物質に関連する変化がみられなかった。本試験条件下で、NOAEL は評価した最高用量である 750 IU/kg/回と結論した。

3.2 非げっ歯類

3.2.1 サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験及び 21 日間回復性試験

[P073-16-01] 試験（Module 4.2.3.2-2）

カニクイザルを用いて 4 週間投与毒性試験を実施した（Module 2.6.7、P073-16-01 試験 [表 2.6.7.7 B]を参照）。この試験で、0（溶媒対照）、25、75、250、又は 750 IU/kg/回の本薬を 4 日ごとに 4 週間、計 8 回 IV（低速ボーラス）投与した。主試験用動物は 4 匹／性／群とし、75 及び 750 IU/kg/回群には回復性試験用サブグループとして 2 匹／性を割り当てた。サルは投与開始時に 2～3 歳であった。

評価した毒性パラメータは、一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、局所刺激性評価、血液学的検査、血清生化学的検査、血液凝固検査、尿検査、ADA、TK、器官重量、剖検、及び病理組織学的検査であった。TK 評価用の血漿試料は、Day 1 及び 29 の投与前、投与 0.25、1、3、8、24、48、及び 96 時間後、並びに Day 13 の投与前及び投与 0.25 時間後に採取した。本薬と、その構成成分である D′D3、及び XTEN ポリペプチドに対する ADA の有無についてのスクリーニングを、Day 1、13、33、及び 50 に実施した。8 回投与後、4 匹／性／群を Day 33 に安楽殺し、75 及び 750 IU/kg/回群では残りの各 2 匹／性について 21 日間の回復期間を設け Day 50 に安楽殺した。

スクリーニングアッセイ、確認アッセイ、及びインタクトな本薬分子に対する抗体価の評価により、本薬に対する ADA の産生を評価した。確認アッセイで試料採取日のうち少なくとも 1 日に ADA 陽性が確認されたのは 48 匹中 30 匹であった。対照群の確認アッセイでは、1 匹（Day 13）を除く全動物で本薬に対する抗体が陰性であった。陽性が確認された試料の発現率は、群間で明らかに用量に関連して増加した。しかし、75～750 IU/kg/回群の間では抗体価に明らかな用量反応はなかった。ADA 陽性が確認された試料の発現率及び抗体価に性差はなかった。ADA 陽性動物の発現率を試験日別に表 6 に要約する。

表 6 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験で本薬に対する ADA が陽性であった個体

投与量 (IU/kg/回)	スクリーニングアッセイ	確認アッセイ		抗体価測定
	Day 1、Day 13 又は Day33 のスクリーニングで陽性とされた個体の数（割合）*	Day 1、Day 13 又は Day 33 に陽性と確認された個体の数（割合）*	Day 50 に陽性と確認された個体の数（割合）*	報告された抗体価の範囲
溶媒	1/8 (12.5%)	1/8 (12.5%)	NA	-
25	6/8 (75.0%)	2/8 (25%)	NA	10 - 20
75	10/12 (83.3%)	8/12[a] (66.7%)	3/4 (75%)	10 - 1280
250	8/8 (100%)	8/8[a] (100%)	NA	10 - 2560
750	12/12 (100%)	11/12[b] (91.7%)	2/3[c] (66.7%)	10 - 640

略号：ADA = 抗薬物抗体、IU = 国際単位、NA = 投与群に割り当てられた回復性試験用動物がなかったため該当せず
* ADA 陽性が確認された雌雄動物数／当該時点で評価した雌雄動物の合計数
- : 溶媒を投与された個体では抗体価が認められなかったため報告せず
a Day 1 に陽性であった 1 匹を含む
b 回復性試験用動物 1 匹の Day 29 の TK 用試料は解析から除外
c この回復性試験群で 1 匹が早期死亡

本薬に対する ADA 陽性が確認された試料について、D′D3 又は XTEN ポリペプチドに対する ADA を、各サブユニットの拮抗アッセイで詳細に評価した。D′D3 に対する ADA 陽性は、Day 13、33、又は 50 に 48 匹のうち 75～750 IU/kg/回群の 6 匹で確認された。75 IU/kg/回群の 1 匹は Day 1 及び 29 にも D′D3 に対し陽性反応を示した。連続した時点（Day 29 及び 50）で D′D3 に対する陽性反応を示したのは 750 IU/kg/回群の 1 匹のみであった。抗 XTEN 抗体が陽性であったのは、75～750 IU/kg/回群の 48 匹中 11 匹であり、Day 13 に一時的な反応を示したのみであった。D′D3 及び XTEN に対する ADA 反応は、用量反応がみられず少数かつ一過性であった（表 7）ことから、抗体は主に完全な形の本薬分子に対し産生された。

表 7 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験で D'D3 及び XTEN サブユニットに対する ADA が陽性であった個体

投与量 (IU/kg/回)	抗 D'D3 抗体	抗 XTEN 抗体
	少なくとも 1 時点で陽性が確認された個体の数（割合）	少なくとも 1 時点で陽性が確認された個体の数（割合）
溶媒	0/8[a]	1/8 (12.5%)
25	0/8[a]	0/8
75	2/12[b] (16.7%)	4/12 (33.3%)
250	2/8 (25.0%)	2/8 (25.0%)
750	2/12 (16.7%)	5/12 (41.7%)

略号：ADA = 抗薬物抗体、IU = 国際単位、XTEN ポリペプチド = 6 つの天然アミノ酸（Gly、Ala、Pro、Glu、Ser、Thr、すなわち G、A、P、E、S、T）の反復配列モチーフからなる非構造化親水性ポリペプチド

a スクリーニングで陽性であった 1 試料は、試料容量が少なかったため D'D3 に関する特性決定が実施できなかった。

b Day 1 に陽性が確認された 1 試料も算出に含めた。

反復投与後、ADA 陽性が確認されたサルで血漿中濃度及び発色活性がより低かった。このため、ADA 陽性が確認されたサルは統計解析から除外した。このように、特に高い用量で Day 29 の TK 評価に支障をきたし ADA 陰性動物の数が不十分であったことから、蓄積性及び用量比例性を評価することができなかった。25 IU/kg/回群の雄では ADA が検出不能であり、曝露量は Day 1 と 29 とで同程度であった。

C_{max} 値は概して Day 1 の初回試料採取時点（0.25 時間後）に認められた。C_{max} 及び AUC の群平均値は、発色活性による測定値及び濃度による測定値ともに雌雄で同程度であった。C_{max} 及び AUC の値は、雌雄ともに用量の増加に伴いほぼ用量に比例して増加した。AUC／投与量比は本薬投与群間で同程度であったことから、4 段階の投与量間で曝露量の線形性が確認された。Day 1 の雄で、半減期の群平均値は、発色活性により測定したところ 29.2～33.8 時間（表 8）であり、濃度により測定したところ 29.3～31.5 時間（表 9）であった。雌における半減期の平均値は雄よりもわずかに短かったが、差はばらつきの範囲内であった。

本薬の濃度経時的推移及び発色活性の経時変化は全ての投与量で対応していたことから、投与量が増加すると活性も増加することが示された（Module 2.6.7、P073-16-01 試験 [表 2.6.7.7 B]）。
750 IU/kg/回の用量で、初回投与後の濃度対発色活性の比は C_{max} 及び AUC ともに約 3600 IU/mg であり、本薬の発色比活性（6108 IU/mg）よりもわずかに低い。TK パラメータの詳細は

Module [2.6.4] 薬物動態試験の概要文に記載する。本薬の発色活性及び濃度から測定した TK パラメータの一部をそれぞれ表 8 及び表 9 に要約する。

表 8 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の Day 1 における発色活性に基づくトキシコキネティクス

雄：平均 (± SD)				
投与量 (IU/kg)	**C_{max} (mIU/mL)**	**AUC_{0-t} (mIU•hr/mL)**	**AUC_{0-t}/Dose (mIU•hr/mL/[IU/kg])**	**$t_{1/2}$ (hr)**
25 (n=4)	1050 (±95.2)	29600 (±4280)	1180 (±171)	33.8 (±6.1)
75 (n=6)	3210 (±340)	79900 (±10100)	1070 (±134)	31.0 (±4.6)
250 (n=4)	11100 (±2320)	283000 (±73300)	1130 (±293)	29.2 (±2.6)
750 (n=6)	31200 (±4820)	767000 (±144000)	1020 (±192)	29.2 (±3.2)
雌：平均 (± SD)				
投与量 (IU/kg)	**C_{max} (mIU/mL)**	**AUC_{0-t} (mIU•hr/mL)**	**AUC_{0-t}/Dose (mIU•hr/mL/[IU/kg])**	**$t_{1/2}$ (hr)**
25 (n=4)	1160 (±30)	33400 (±1200)	1340 (±48.0)	27.8 (±0.5)
75 (n=6)	3000 (±374)	77600 (±16300)	1030 (±217)	27.5 (±2.8)
250 (n=4)	12400 (±2030)	306000 (±62200)	1220 (±249)	27.0 (±2.2)
750 (n=6)	32400 (±5960)	799000 (±165000)	1070 (±220)	27.1 (±5.2)

略号：AUC_{0-t} = 投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿中発色活性ー時間曲線下面積、AUC/Dose = 用量で補正した血漿中発色活性ー時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中発色活性、hr = 時間、IU = 国際単位、SD = 標準偏差、$t_{1/2}$ = 最終相の消失半減期

表 9 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の Day 1 における血漿中濃度に基づくトキシコキネティクス

雄：平均 (± SD)				
投与量 (IU/kg)	**C_{max} (ng/mL)**	**AUC_{0-t} (ng•hr/mL)**	**AUC_{0-t}/Dose (ng•hr/mL/[IU/kg])**	**$t_{1/2}$ (hr)**
25 (n=4)	277 (±42.2)	7580 (±1190)	303 (±47.6)	30.1 (±1.3)
75 (n=6)	922 (±76.6)	23400 (±2760)	312 (±36.8)	31.5 (±3.1)
250 (n=4)	2810 (±697)	76000 (±21800)	304 (±87.2)	30.0 (±2.6)
750 (n=6)	8340 (±839)	232000 (±43800)	309 (±58.4)	29.3 (±3.7)
雌：平均 (± SD)				
投与量 (IU/kg)	**C_{max} (ng/mL)**	**AUC_{0-t} (ng•hr/mL)**	**AUC_{0-t}/Dose (ng•hr/mL/[IU/kg])**	**$t_{1/2}$ (hr)**
25 (n=4)	296 (±25.7)	7550 (±1000)	302 (±40.0)	24.5 (±1.5)
75 (n=6)	842 (±60.5)	19500 (±3460)	260 (±46.2)	25.4 (±2.7)
250 (n=4)	3030 (±206)	77400 (±8020)	310 (±32.1)	28.2 (±3.6)
750 (n=6)	8910 (±430)	205000 (±28800)	274 (±38.4)	23.0 (±5.8)

略号：AUC_{0-t} = 投与開始（時間 0）から t 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC/Dose = 用量で補正した血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max} = 最高血漿中濃度、hr = 時間、IU = 国際単位、SD = 標準偏差、$t_{1/2}$ = 最終相の消失半減期

本薬の反復投与に間接的に起因する途中死亡は生じなかった。750 IU/kg/回群の回復試験用動物の雄 1 匹が、Day 29 の TK 用採血後の Day 30 に死亡発見された。Day 29 の採血後に、一般状態観察で右鼠径部の腫脹及び軟化が認められた。剖検において、両側後肢の腫脹及び暗色化がみられた。また、左後肢の骨格筋及び陰嚢に凝固物（凝固した血液）が蓄積していた。本個体では aPTT の延長が Day 13（34.7 秒）及び Day 29（47.8 秒）にみられた。死因は、静脈穿刺及び止血障害に続発する失血であった。本動物では aPTT 延長及び Day 1（投与前、176 %）から Day 29（投与前、0 .66 %）にかけて内因性 FVIII 活性低下が認められ、これらは内因性 FVIII に対する抗体の産生に一致していた。本薬に対し産生された抗体はサルの内因性 FVIII にも結合し、その結果として後天性血友病及び凝固障害に至ると考えられることから、本動物の死亡では本薬が間接的な原因となった。

本試験で認められた被験物質に関連する主な所見を表 10 に要約する。一般状態観察、体重、摂餌量、眼科学的検査、心電図検査、及び器官重量において、被験物質に関連する影響は認められなかった。

表 10 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験：被験物質に関連する主な所見

パラメータ	被験物質に関連する主な所見	
死亡	750 IU/kg/回群の雄 1 匹で Day 30 に ADA 誘発性の後天性血友病（静脈穿刺及び止血障害に続発する失血）。	
一般状態観察	死亡発見された 750 IU/kg/回群の雄	Day 29 の TK 用採血後に右鼠径部の腫脹及び軟化。剖検において、両側後肢の腫脹及び暗色化。
	生存動物	なし
眼科学的検査	なし	
ECG	なし	
臨床検査	血液学的検査：	数匹で軽微な変化：25 IU/kg/回以上の群で好中球数、単球数、及び総白血球数の増加（75 IU/kg/回群の雄では回復せず）、25 IU/kg/回以上の群（雄）又は 75 IU/kg/回以上の群（雌）で赤血球数、ヘモグロビンあるいはヘマトクリットの減少（750 IU/kg/回群の雄では回復せず）
	血液凝固検査：	75 IU/kg/回以上の群で aPTT の上昇（750 IU/kg/回群の雌では回復せず）
	血清生化学的検査：	数匹で軽微な変化：25 IU/kg/回以上の群で CK の上昇、25 IU/kg/回以上の群（雄）又は 250 IU/kg/回以上の群（雌）で AST の上昇（CK の変化は 750 IU/kg/回群の雌では回復せず）
	尿検査：	なし
器官重量	なし	
病理組織学的検査	ADA 陽性であった 75 IU/kg/回群の回復性試験用動物の雄 1 匹で脾臓に血腫、750 IU/kg/回群の回復性試験用動物の雄で投与部位に血管周囲出血。	
NOAEL	750 IU/kg/回	

略号：aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、ADA = 抗薬物抗体、AST = アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、CK = クレアチンキナーゼ、IU = 国際単位、NOAEL = 無毒性量、TK = トキシコキネティクス

本薬に関連する aPTT 延長が認められた（表 11）。この所見は 75 IU/kg/回以上の群の雌雄数匹で認められ、回復期間後に 750 IU/kg/回群の雌 2 匹でも認められた。aPTT 延長の平均値は対照値と比べ Day 13 に最大 28.3%及び Day 33 に最大 67.7%高く、発現率も Day 13 に比べ Day 33 で高かったことから経時的に増加していた。

750 IU/kg/回の回復性試験群の雌はともに aPTT の平均値が高く、ベースライン時の平均値に比べ最大 1.52 倍であった。これは、内因性 FVIII と交差反応する本薬への抗体の産生に一致すると考えられた。

表 11 - サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の Day 13、33 及び 50 における末梢血 aPTT 値

パラメータ (Sec)	Day	0 IU/kg/回		25 IU/kg/回		75 IU/kg/回		250 IU/kg/回		750 IU/kg/回	
		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
平均		22.08	21.55	22.15	23.68	23.90	22.90	23.98	22.10	**28.32**	22.55
SD	13	1.08	1.48	2.90	2.06	2.87	3.66	2.93	0.28	5.26	4.55
n		4	2	2	4	6	4	4	2	6	6
倍率*		-	-	-	-	-	-	-	-	1.28	-
平均		21.30	23.25	22.18	24.50	**31.78**	**26.73**	**34.57**	**25.60**	**35.73**[a]	**31.60**
SD	33	0.61	2.04	3.22	3.01	4.64	6.10	9.35	2.50	7.99	3.66
n		4	4	4	4	4	4	3	4	4	4
倍率*		-	-	-	-	1.49	1.15	1.62	1.10	1.68	1.36
平均		NA	NA	NA	NA	24.30	22.75	NA	NA	26.50	**34.55**
SD	50	NA	NA	NA	NA	0.71	4.17	NA	NA	-	5.44
n		NA	NA	NA	NA	2	2	NA	NA	1	2
倍率 [b]		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.52

略号：aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、F = 雌、IU = 国際単位、M = 雄、n = 数、NA = 投与群に割り当てられた回復性試験用動物がなかったため該当せず、SD = 標準偏差、Sec = 秒

* 本薬に関連すると考えられる変化を**太字**で示し、対照群の平均値との差を倍率で示す。

- : 算出せず

a 対照群と比べて統計学的有意差あり：$p \leq 0.05$。

b 本薬に関連すると考えられる変化を**太字**で示し、ベースライン時の平均値との差を倍率で示す。

サルにおいて個体ごとの aPTT 値と ADA の発現とを比較し表 12 及び表 13 に示す。ADA 陽性動物では aPTT が延長していることから概して凝固時間が長く、ADA の産生により後天性血友病に至ることが示された。

表 12 - 4 週間反復投与毒性試験の雄サルにおける個体ごとの aPTT 値及び ADA

投与量 (IU/kg/回)	動物番号	aPTT 試料採取日	aPTT (Sec)	ADA[a]
溶媒	1101	33	22.2	-
	1102	33	21.0	-
	1103	33	21.1	-
	1104	33	20.9	-
25	2001	33	25.5	Neg
	2002	33	24.1	-
	2003	33	18.4	-
	2004	33	20.7	Neg
75	3001	33	38.6	Pos
	3002	33	29.0	Pos
	3103	33	30.8	Pos
	3104	33	28.7	Pos
	3105	50	23.8	Neg[b]
	3006	50	24.8	Pos
250	4001	33	39.3	Pos
	4002	33	23.8	Pos
	4003	33	試料が凝固	Pos
	4104	33	40.6	Pos
750	5001	33	40.3	Pos
	5102	33	24.2	Pos
	5003	33	36.6	Pos
	5004	33	41.8	Pos
	5005	50	26.5	Pos
	5006	29 (0 時間)	47.8	Pos[b]

略号：ADA = 抗薬物抗体、aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、IU = 国際単位、Neg = 陰性、Pos = 陽性、Sec = 秒、TK = トキシコキネティクス

-：検討せず

a Day 1 に最初の ADA 用試料を採取（Day -3 ではない）

b Day 29 の TK 用試料を使用。TK 用試料と ADA 用試料は調製方法が異なるため、結果は群要約表から除外した。

表 13 - 4 週間反復投与毒性試験の雌サルにおける個体ごとの aPTT 値及び ADA

投与量 (IU/kg/回)	動物番号	aPTT 試料採取日	aPTT (Sec)	ADA[a]
溶媒	1601	33	24.9	-
	1502	33	22.9	Neg
	1503	33	24.7	-
	1504	33	20.5	-
25	2501	33	20.8	-
	2502	33	26.9	Pos
	2503	33	27.0	Pos
	2504	33	23.3	-
75	3501	33	27.6	-
	3602	33	34.8	Pos
	3503	33	20.6	-
	3504	33	23.9	Neg
	3505	50	19.8	Pos
	3506	50	25.7	Pos
250	4501	33	29.3	Pos
	4502	33	24.0	Pos
	4503	33	24.2	-
	4504	33	24.9	Pos
750	5501	33	34.2	Pos
	5502	33	30.7	Pos
	5503	33	26.8	Pos
	5504	33	34.7	Pos
	5605	50	30.7	Pos
	5506	50	38.4	Pos[b]

略号：ADA = 抗薬物抗体、aPTT = 活性化部分トロンボプラスチン時間、IU = 国際単位、Neg = 陰性、Pos = 陽性、Sec = 秒、TK = トキシコキネティクス

-：検討せず

a Day 1 に最初の ADA 用試料を採取（Day -3 ではない）

b Day 29 の TK 用試料を使用。TK 用試料と ADA 用試料は調製方法が異なるため、結果は群要約表から除外した。

血液学的検査及び血清生化学的検査において、数匹で軽微な差が認められた。これらの差は散発的で変化の程度が小さく、病理組織学的検査及び器官重量において関連する変化がなかった。ただし、本薬に関連する可能性は除外できなかった。

血液学的検査で本薬投与群に認められた対照群に比べた軽度な変化を示す差は、好中球数の軽微から中等度の増加（雄では 25 IU/kg/回以上の群、最大 2.06 倍、雌では 75 IU/kg/回以上の群、最大 2.75 倍）、及び単球数の軽微な増加（雄では 75 又は 250 IU/kg/回群、最大 1.90 倍）であり、これらは複数の群の数匹で認められた総白血球数の増加（雄で最大 1.41 倍、雌で最大 1.87 倍）に反映された。回復期間後、依然として好中球数及び単球数の増加が 75 IU/kg/回群の雄で認められ（投与前値のそれぞれ 3.67 倍及び 2.37 倍）、これらを反映して、影響を受けた群で総白血球数の軽微な増加（2.23 倍）が認められた。25 IU/kg/回以上の群の雌雄又は 75 IU/kg/回以上の群の雌雄でそれぞれ赤血球数（0.80～0.97 倍）、ヘモグロビン（0.87～0.94 倍）、あるいはヘマトクリット（0.84～0.97 倍）の軽微な減少がみられた。750 IU/kg/回群の雄では回復期間後もこれらの項目が減少したままであった（投与前値の 0.94～0.96 倍）。好中球数及び単球数の増加、並びに赤血球量パラメータの減少の組合せは、軽度な炎症反応を示唆していた。ただし、病理組織学的検査及び器官重量において関連する変化がなかったことから、これらの軽微な変化は毒性ではないと考えられた。

血清生化学的検査で本薬投与群に認められた対照群に比べた軽度な変化を示す差は、25 IU/kg/回以上の群におけるクレアチンキナーゼ（CK）活性の増加（18%～622%）であった。これを反映して、25 IU/kg/回以上の群の雄並びに 250 又は 750 IU/kg/回群の雌でアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）活性が増加した（15%～103%）。CK 活性の増加は回復期間後にも 750 IU/kg/回群の雌（投与前値の 434%）で認められた。CK 及び AST の変化は、病理組織学的検査及び器官重量において関連する変化が認められず個体差があったことから、毒性ではないと考えられた。

剖検において、本薬に関連する所見は、75 IU/kg/回群の回復性試験用の雄 1 匹で計画剖検時にみられた脾臓における直径 5 mm の腫瘤のみであり、この個体は本薬に対する ADA が陽性であった。本所見に関連して病理組織学的検査で血腫が認められた。本薬に関連するその他の剖検所見は認められなかった。主試験期間終了時（Day 33）、剖検において投与部位に所見（暗色巣、物質の蓄積／凝血塊、暗色化；隆起巣、粘稠性／固さの異常、蒼白巣）がみられ、これに関連して病理組織学的検査で出血、線維増殖、又は壊死のいずれかが認められた。これらの発現率あるいは重症度は対照動物と本薬投与動物で同程度であったため、手技に関連すると考えられた。このように、投与部位反応がみられず対照動物と差がなかったことから、本薬の局所忍容性は良好であると考えられた。主試験用動物では、投与期間終了時の病理組織学的検査において、75 IU/kg/回群の 1 匹でみられた脾臓の血腫以外に本薬に関連する所見はなかった。4 週間投与後の回復期間後の病理組織学的所見は、750 IU/kg/回群の雄 1 匹（生存動物）でみられた、手技に関連する軽度な投与部位の血管周囲出血のみであった。

結論として、カニクイザルに本薬を 0、25、75、250、及び 750 IU/kg/回の用量で 4 週間（計 8 回）IV 投与した後 21 日間の回復期間を設けた（75 及び 750 IU/kg/回群）ところ、Day 29 の TK 用採血後に 750 IU/kg/回群の 1 匹が早期死亡した。死因は、静脈穿刺及び止血障害に続発する失血であり、

ADA 産生に起因する aPTT 延長及び FVIII 活性の減少を伴った。投与期間終了時、本薬に関連する所見は aPTT 延長のみであり、この所見は時間及び投与量に依存していた。aPTT の延長は、内因性のサル FVIII と交差反応する本薬への中和抗体の産生に一致していた。

非臨床試験の動物種において、異種だが類似性のある組換えヒト FVIII タンパク質に対して抗体応答が認められたが、これはヒトでの反応を予測するものではなく(9)、本試験で NOAEL を決定する際、ADA が関連する 1 匹の死亡及び用量依存的な aPTT 延長は除外した。血液学的検査及び血清生化学的検査で軽微かつ毒性でない変化が認められたが、被験物質に関連する病理組織学的所見は 75 IU/kg/回群の 1 匹における脾臓の血腫以外にはなかった。本試験条件下で、本薬の忍容性は良好であると考えられた。本薬による直接的な毒性作用が生じなかったことから、NOAEL は 750 IU/kg/回（評価した最高用量）とした。

4　遺伝毒性試験

本薬（約 312 kDa）は血漿タンパク質複合体（分子量［MW］>100 kDa）であり、分子が分解されずに細胞膜及び核膜を通過したり DNA と直接相互作用を起こしたりすることはないと予想されるため、遺伝毒性試験は実施しなかった。ICH ガイドライン S6（R1）(1) に合致して、このクラス／大きさ又は作用機序の分子についての遺伝毒性試験は必要ないと考えられる。

5　がん原性試験

本薬のがん原性試験は実施していない。技術的な側面からは、実験動物にヒトタンパク質を投与すると ADA が産生されるため、げっ歯類への長期投与は不可能であった。科学的な側面からは、ICH ガイドライン S6（R1）(1) に合致して、科学的根拠の重要度アプローチを用いて本薬のがん原性リスクを評価した。

この評価には次の点が含まれた。

- 本薬と DNA との相互作用の可能性に関する評価
- FVIII 補充療法の臨床使用経験
- 標的の文献評価
- 本薬の代謝
- 毒性試験

本薬（約 312 kDa）のような高分子量の組換えタンパク質を患者に投与したときに遺伝子損傷をきたす可能性は無視できる程度である(10)。遺伝毒性においては、化合物が DNA と直接求電子的な相互作用を起こし DNA 付加物を産生する可能性が主に懸念される。本薬のような大型のタンパク質が DNA と直接相互作用を起こし DNA 付加物を産生する機序は知られていない。本薬は血友病 A に対する FVIII 製剤であり、血液凝固第 IX 因子（FIX）プロテアーゼ活性のコファクターとして機能するため、DNA の代謝を変化させる又は細胞増殖の機序若しくは転移の可能性を変化させるなど間接的に突然変異を誘発する可能性も低い。

本薬は患者の循環血中で FVIII 活性を示すため、がんの潜在的リスクを示すような方法では作用しない。FVIII 補充療法は 40 年にわたり利用されており、まずヒト血漿から精製した濃縮 FVIII が、その後細胞培養上清から精製した組換え FVIII が開発された。これらの製剤で、患者におけるがん原性及び変異原性の懸念は生じていない。

FVIII のがん原性に関する公表文献を精査したが、発がん促進又は腫瘍形成への関与を示唆するエビデンスはなく、報告事例もない。

本薬は血液凝固因子（FVIII）の半減期を延長させる新しいクラスの薬剤として開発中の融合タンパク質であり、単鎖 B ドメインを除去したヒト FVIII、ヒト IgG1 の Fc ドメイン、ヒト VWF のうち FVIII と結合する D′D3 ドメイン、及び 2 つの XTEN ポリペプチドからなる。分子の Fc、VWF-D′D3、

及び XTEN ポリペプチド部分は、それぞれ血漿中 FVIII 分子の半減期を延長させるよう設計されている。ヒトを含む数種類の哺乳類で本薬の半減期がほかの FVIII 製剤に比べ長いことが示されているが、これには FcRn に対する本薬の rFVIII-Fc 部分の結合が重要な役割を果たしている。rFVIIIFc（イロクテイト／Elocta）は、FcRn への結合により細胞内異化から保護されることが既に明らかにされている(3)(4)。

本薬の異化は、消失半減期が長い点以外は、ほかの FVIII 製剤又はほかのポリペプチドの異化と同様に進むと予想される。

ラット及びサルを用いた毒性試験の投与期間は 4 週間のみであったが、これらの試験で本薬投与に関連する過形成及び新生物形成の所見はみられなかった。

したがって、上記のデータから、本薬にはがん原性がないことを裏付ける、科学的重要度のある根拠が得られる。試験依頼者は、完了した毒性試験、本薬の配列情報、及びがん原性を示唆する文献データがない点から、包括的ながん原性リスク評価が適切に実施されたと考える。

6　生殖発生毒性試験（用量設定試験及びトキシコキネティクス評価を含む）

市販されているその他の FVIII 製剤と同様に、本薬の生殖発生毒性試験は実施していない。一般に、FVIII 製剤の生殖発生へのリスクは低いと考えられる。ラット及びサルでは 4 週間反復投与毒性試験で本薬に対する抗体が産生され、これは両動物種とも異種（ヒト）タンパク質に対する免疫応答であると予想される。市販されている FVIII 製剤及び FIX 製剤の開発と同じく、抗体産生によりラット及びサルへの曝露期間が制限されたため、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験や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を含め、4 週間を超えて意義のある毒性試験を実施することは不可能である。

本薬が DNA と相互作用を起こしうる機序は知られていないため、本薬の変異原性及び染色体異常誘発性は低いと考えられる。さらに、Fc 融合タンパク質には遺伝毒性のリスクがない。したがって、本薬が受胎能に有害作用を及ぼす可能性も低い。反復投与毒性試験で生殖器官を評価したが、雌雄ともに本薬に関連する毒性所見は認められなかった。

十分に理解されている作用機序に基づくと、FVIII 製剤は胚及び胎児発生に影響を及ぼさないと予想される。野生型動物モデルを用いた発生毒性試験が実施できないと考えられるその他の理由は、凝固因子補充の薬理活性に関連する。妊娠動物では通常凝固パラメータの変動がみられる。妊娠ラットではフィブリノーゲン、血小板数、プロトロンビン時間（PT）(11)、aPTT、及びアンチトロンビン時間(12)(13)が増加／延長する。妊娠ウサギでは妊娠後期にかけてアンチトロンビン及び血小板数が増加し、PT が短縮し、aPTT が延長する(14)。これらの変化は、分娩時に出血の持続、過度の出血、及び過度の凝固を防ぐための生理反応と考えられる。

凝固亢進は習慣流産のリスク因子である(15)(16)ため、本薬投与に起因する凝固亢進により実験動物で吸収又は自然流産が増加する可能性がある。さらに、止血系が正常な妊娠動物に凝固因子を投与すると、凝固因子の産生が亢進し、プロテイン S の活性が低下し、線維素溶解が阻害されるため、妊娠時の血液凝固亢進状態が強められる(17)(18)。したがって、一般に現在市販されている凝固因子製剤の非臨床試験プログラムでは、生殖発生毒性の検討は行われていない。

本薬の生殖発生毒性試験を実施しないとのアプローチについて、FDA、EMA、及び PMDA と協議した。FDA の合意は 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日に実施した[redacted](6)及び[redacted]

[redacted](19)で得られ、EMA の合意は 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日に実施した科学的助言の見解(7)で得られ、PMDA の合意は 20[redacted] 年 [redacted] 月 [redacted] 日に実施した[redacted](8)で得られた。

7　局所刺激性試験

IV 投与後の局所忍容性は、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験で評価した。いずれの試験でも、剖検及び病理組織学的検査で IV 投与部位に本薬に関連する変化は認められなかった。

8　その他の毒性試験

8.1　ヒト全血を用いた *in vitro* 血液適合性試験

[P073-16-04] 試験（Module 4.2.3.7.7-1）

血液適合性試験を実施し、溶血及び血漿の凝集（混濁度）の程度を *in vitro* で評価することにより、ヒト全血に及ぼす本薬の影響を評価した。男女各 3 名の健康被験者から全血試料を採取した。血液試料を一定用量ずつに分割し、これらに陰性対照（0.9% NaCl）、溶血の陽性対照（20%サポニン）、凝集の陽性対照（20% Intralipid）、本薬希釈剤、若しくは本薬（インキュベーション混合物中最終濃度が 0.41、1.2 又は 4.1 µg/mL）のいずれかを添加するか又は添加しなかった。高濃度である 4.1 µg/mL（10 IU/mL）は、サルを用いた単回投与薬物動態試験の最高用量（300 IU/kg）で予想される C_{max} に一致し（Module 2.6.7、P073-16-04 試験 [表 2.6.7.17 A]及び Module [2.6.4]、薬物動態試験の概要文参照）、血友病 A 患者に 50 IU/kg の用量を投与したときの定常状態下曝露量の 7.4 倍（aPTT ベースの凝固一段法に基づく C_{max}；135 IU/dL）である（Module 2.7.2 臨床薬理試験 [2.3.1.2 項]参照）。37°C で 1 時間インキュベーション後の溶血を、全血のヘマトクリット、全血中ヘモグロビン濃度、血漿中ヘモグロビン濃度、血漿の溶血指数、及び目視評価で判定した。凝集は、血漿の混濁度指数及び目視評価で判定した。陽性対照及び陰性対照の結果は、全ての被験者について容認できると考えられた。

赤血球から血漿へのヘモグロビン放出の結果に基づくと、溶血率の群平均値は男女で 0.2%以下であったことから、本薬は 0.41、1.2、及び 4.1 µg/mL の濃度で溶血作用を示さなかった。試料の混濁度指数及び凝集の目視評価に基づくと、本薬は 0.41、1.2、及び 4.1 µg/mL の濃度で凝集作用を示さなかった。結論として、*in vitro* でヒト全血に本薬を添加しても溶血及び血漿の凝集は認められなかった。

8.2　免疫原性

本薬の独立した非臨床免疫原性試験は実施していない。ただし、本薬を 750 IU/kg/回までの用量でラット及びサルにそれぞれ 3 日ごと及び 4 日ごとに 4 週間投与したところ、本薬に対する ADA が用量に関連して増加した。ラットにおいて、4 週間の投与期間終了時の ADA 陽性率は、75、250、及び 750 IU/kg/回群でそれぞれ 42.1%、65.8%、及び 89.6%であった（表 2）。同様に、サルにおいて、4 週間の投与期間終了時の ADA 陽性率は、25、75、250、及び 750 IU/kg/回群でそれぞれ 25%、66.7%、100%、及び 91.7%であった（表 6）。サルにおいて、ADA 産生は aPTT 延長と関連していた。ヒト rFVIII を投与するとヒト rFVIII に対する抗体が産生され、これがラット又はサルの内因性 FVIII と交差反応することは非臨床動物種では予想外ではなく、またこれはヒトにおける反応を予測するもので

はない(9)。ラット及びサルでそれぞれ Day 28 又は Day 29 までに本薬に対する抗体が産生されたことから曝露量が低下した。このため、4 週間を超えて意義のある毒性試験を実施することは不可能であった。

8.3 薬物乱用傾向の評価

本薬の乱用性評価は実施していない。全体として、非臨床薬理試験、毒性試験、及び文献において、本薬の依存性及び乱用傾向を示唆するエビデンスはなかった。

本薬は血友病 A の治療に用いる組換えヒト凝固因子 FVIII 補充分子である。本薬の MW は約 312 kDa であり、著しい量が血液脳関門を通過する可能性は低い。一般に、脂溶性で MW が 400～600 Da 未満であるものを除いて、治療用分子の脳への透過性は低い(20)。さらに、FVIII 及び本薬のその他の構成成分は、乱用性が知られている薬物と構造的な関連性がなく、乱用性が知られている薬物の前駆体でもない。FVIII には乱用性の懸念がある受容体／系への結合特性がないことが知られている。

本薬がオピエート受容体、セロトニン作動性受容体、及びドパミン受容体など乱用性物質に関与する受容体及びトランスポーターに結合することを示唆するエビデンスはない。本薬が属する薬物のクラス及びその作用機序は、FDA ガイダンス（2017 年 1 月）の薬物の乱用性評価(21)において乱用性の懸念があるとされていない。FVIII タンパク質及び市販されている凝固因子製剤に関連する乱用傾向及び依存性の報告はない。本薬の非臨床反復投与毒性試験で、750 IU/kg/回までの用量をラット及びサルにそれぞれ 3 日ごと及び 4 日ごとに 4 週間投与したところ、中枢神経系（CNS）の機能への影響及び解剖病理学的影響は認められなかった。組換えヒトタンパク質に対する ADA が産生されるため、4 週間を超える投与は実施できなかった。一般状態観察において本薬に関連する行動面の異常所見はなく、CNS に関連すると考えられる所見及び CNS 組織の解剖病理学的所見も認められなかった。NOAEL は両動物種ともに検討した最高用量である 750 IU/kg/回とした。

要約すると、本薬に依存性及び乱用性のシグナルはみられず、化学構造、薬理、作用機序、及び毒性データ（安全性薬理評価項目を含む）によると既知の乱用薬物との類似性も認められなかった。さらに、本薬はサイズが大きいため血液脳関門を通過する可能性が低い。したがって、乱用傾向がみられないことを示すデータがあることから、乱用の結果としての公衆衛生へのリスクはないと予想される。現時点のデータに基づき本薬には乱用傾向がないと考えられるため、更なる非臨床試験（自己投与試験、薬物弁別試験など）の必要性及び妥当性はないと考える。20[redacted]年[redacted]月[redacted]日の[redacted]において、FDA は申請者の見解に同意した(22)。

8.4　不純物

毒性試験に使用した本薬製剤の品質は、臨床試験用あるいは市販用バッチの品質と同等であった。本薬製剤中に存在する又は存在する可能性のある不純物を、目的物質由来不純物、製造工程由来不純物、及び汚染物の 3 つのカテゴリーに分けて記載する。存在する可能性のある不純物の評価は、Module 3.2.S.3.2「Impurities」の項及び Module 3.2.P.5.5「Characterization of Impurities」の項に記載及び考察する。

8.5　抽出物及び溶出物

本薬の市販の際に使用される予定の容器施栓系の構成物（全ての供給業者の針付きガラスシリンジ外筒、ピストン、及び針保護体）について抽出物及び溶出物の試験を実施した。容器施栓系の構成物に関する補足情報は、Module 3.2.P.2.4 及び Module 3.2.P.7「Container Closure System」の項に示す。

容器施栓系の構成物に関連する安全上の懸念は認められなかった。

9　考察及び結論

本薬は、単鎖 B ドメインを除去したヒト FVIII、ヒト IgG1 の Fc ドメイン、ヒト VWF のうち FVIII と結合する D′D3 ドメイン、及び 2 つの XTEN ポリペプチドからなる新規融合タンパク質である。分子の Fc、VWF-D′D3、及び XTEN ポリペプチド部分は、いずれも血漿中 FVIII 分子の $t_{1/2}$ を延長させるように設計されている。本薬は血友病 A に対する凝固因子製剤として開発され、$t_{1/2}$ を延長することにより患者への投与頻度を減少させることを意図している。フィブリン凝塊の生成に必要な凝固カスケードは動物種間でよく保存されているため、反復投与毒性試験の実施に際しラット及びサルは薬理学的に適切な動物種である。さらに、本薬の rFVIII-Fc 融合タンパク質部分はこれらの動物種の FcRn にも結合する。毒性試験の投与経路は、臨床試験で使用され市販後も使用予定である IV 投与を使用した。

9.1　反復投与毒性試験

本薬について実施した毒性試験を 3 項に要約した。全体として、ラット及びサルにおける 4 週間反復投与毒性試験では、本薬の薬理活性／意図する機序に直接起因する毒性所見は認められなかった。これらの試験では血清生化学的検査及び血液学的検査において可逆性の軽微な変化が認められたが、程度が小さい、病理組織学的検査及び器官重量において関連する変化がない、値のばらつきが大きい、あるいは当該動物種における試験施設の背景範囲内にあることから毒性ではないと考えられた。ラットでは凝固パラメータへの影響はなかったが、サルでは本薬に対する中和抗体が産生され、これが内因性 FVIII と交差反応したことに一致して、aPTT 値の延長が認められた。この点は、サルを用いた 4 週間反復投与毒性試験で 1 匹が採血後の過度の出血により Day 30 に死亡したことの間接的な原因となった。ラット及びサルに本薬を 4 週間投与しても、被験物質に関連する病理組織学的所見はみられなかった。いずれの非臨床動物種も、4 週間 IV 投与したときの NOAEL は 750 IU/kg/回（評価した最高用量）とした。両動物種ともに、Day 1 に被験物質の全身曝露が確認され、本薬の濃度及び活性に基づく $t_{1/2}$ は、いずれもイロクテイト／Elocta の約 2 倍であった(9)。

アロメトリックスケーリングではなくヒト等価用量の体重（アイソメトリック）スケーリング手法に基づくと、750 IU/kg/回の IV 投与は第 III 相臨床用量（50 IU/kg の IV 投与）の 15 倍に相当する。アイソメトリックスケーリングは生物製剤に関する FDA 規制ガイダンスに沿うものであり、肝臓及び腎臓で代謝及び排泄されない高分子量（>100 kDa）タンパク質の種間曝露比の推定に用いられる。

本薬を 750 IU/kg/回までの用量でラット及びサルにそれぞれ 3 日ごと及び 4 日ごとに 4 週間投与したところ、本薬に対する ADA が用量依存的に増加した。ラットにおいて、4 週間の投与期間終了時の ADA 陽性率は、75、250、及び 750 IU/kg/回群でそれぞれ 42.1%、65.8%、及び 89.6%であった。同

様に、サルにおいて、4 週間の投与期間終了時の本薬に対する ADA 陽性率は、25、75、250、及び 750 IU/kg/回群でそれぞれ 25%、66.7%、100%、及び 91.7%であった。

サルにおいて、ADA 産生は aPTT 延長と関連していた。これらの成績から、抗体の産生は薬物に対する免疫応答であり、ラット及びサルに特異的であると予想される。ラット及びサルでそれぞれ Day 28 又は Day 29 までに本薬に対する抗体が産生されたことから曝露量が低下した。このため、4 週間を超えて意義のある毒性試験を実施することは不可能であった。

IV 投与後の局所刺激性を、ラット及びサルを用いた反復投与毒性試験で評価した。いずれの試験でも、剖検及び病理組織学的検査で IV 投与部位に本薬に関連する変化は認められなかった。

9.2 遺伝毒性及びがん原性リスク

本薬の MW は 100 kDa 超であり、分子が分解されずに細胞膜及び核膜を通過して DNA と直接相互作用を起こす可能性は低い(10)ため、既知の遺伝毒性リスクはない。さらに、本薬の構造及び作用機序に基づくと、本薬が DNA と相互作用して傷害をきたす可能性はなく、細胞周期の調節及び転移に関連する経路と相互作用する可能性は低い。本薬は患者の循環血中で FVIII 活性を示すため、がんの潜在的リスクを示すような方法では作用しない。さらに、外因性 FVIII の投与と腫瘍形成とは関連しない。FVIII 補充療法は 40 年にわたって利用されており、まずヒト血漿から精製した濃縮 FVIII が、その後細胞培養上清から精製した組換え FVIII が開発された。これらの製剤で患者におけるがん原性及び変異原性の懸念は生じておらず、公表文献を精査しても症例報告は確認されていない。ラット及びサルを用いた 4 週間反復投与毒性試験の病理組織学的検査で新生物形成及び過形成の所見は認められていない。したがって、科学的根拠の重要度アプローチに基づき、本薬のがん原性リスクは無視できる程度だと考えられる。

9.3 生殖発生毒性

本薬の生殖発生毒性試験は実施していない。ただし、ラット及びサルを用いた最長 4 週間の反復投与毒性試験の病理組織学的検査において、本薬に関連する雌雄生殖組織への影響は認められなかった。本薬のような凝固因子製剤の投与は妊娠時の正常な血液凝固亢進状態を強めると考えられ、この結果、実験動物で吸収又は流産の増加に至る可能性がある。生殖発生毒性試験を実施しないこのアプローチは保健当局（FDA、EMA、及び PMDA）の同意が得られており、またこのアプローチはその他の凝固因子化合物の開発で用いられたものと同じである。

9.4　血液適合性

ヒト全血に及ぼす本薬の影響を評価する GLP 適用血液適合性試験の結果において、ヒト全血を 4.1 µg/mL までの濃度の本薬で *in vitro* 処理しても溶血及び血漿の凝集は認められなかった。この濃度は、50 IU/kg を投与された血友病 A 患者の定常状態下曝露量（C_{max}：135 IU/dL）の 7.4 倍である（Module 2.7.2 [2.3.1.2 項]参照）。

9.5　包括的な要約

総合すると、GLP 適用毒性試験及び *in vitro* 血液適合性試験のデータは、FVIII 製剤である本薬で予測される安全性プロファイル及び長い半減期に一致する。申請者は、本薬の安全性は適切に評価され、非臨床安全性プロファイルは本薬の製造販売承認を支持するものと考える。

10　図表

図表は本文中に含めた。

参 考 文 献

1. ICH S6 (R1) ガイドライン「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」 (2012)
2. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. Vet J. 2004 Nov;168(3):238–51.
3. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. Nat Rev Immunol. 2007 Sep;7(9):715–25.
4. Dumont JA, Liu T, Low SC, Zhang X, Kamphaus G, Sakorafas P, et al. Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. Blood. 2012 Mar 29;119(13):3024–30.
5. Seth Chhabra E, Liu T, Kulman J, Patarroyo-White S, Yang B, Lu Q, et al. BIVV001, a new class of factor VIII replacement for hemophilia A that is independent of von Willebrand factor in primates and mice. Blood. 2020 Apr 23;135(17):1484–96.
6. [redacted] FDA meeting summary: IND[redacted]/[redacted]. 20[redacted] [redacted] [redacted].
7. BIVV001 Scientific advice. Procedure EMA/CHMP/SAWP/[redacted]/20[redacted]. European Medicines Agency (EMA). 20[redacted] [redacted]:1-75.
8. [redacted]PMDA meeting summary: Application [redacted] [redacted] 20[redacted]. Number [redacted]. 20[redacted] [redacted] [redacted].
9. Dumont JA, Loveday KS, Light DR, Pierce GF, Jiang H. Evaluation of the toxicology and pharmacokinetics of recombinant factor VIII Fc fusion protein in animals. Thromb Res. 2015 Dec;136(6):1266–72.
10. Gocke E, Albertini S, Brendler-Schwaab S, Müller L, Suter W, Würgler FE. Genotoxicity testing of biotechnology-derived products. Report of a GUM task force. Gesellschaft für Umweltmutationsforschung. Mutat Res. 1999 Mar;436(2):137–56.
11. Papworth TA and Clubb SK. Clinical pathology in the female rat during the pre- and postnatal period. Comparative Haematol Interational. 1995;5:13-24.
12. Urasoko Y, He XJ, Ebata T, Kinoshita Y, Kobayashi J, Mochizuki M, et al. Changes in blood parameter and coagulation-related gene expression in pregnant rats. J Am Assoc Lab An Sci. 2009;48:272-278.
13. Ohishi T, Kitazawa T, Suzuki S, Nakamura D, Nishihara Y, Mochizuki M. Effects of pregnancy and lactation on warfarin-induced changes in blood coagulation-related parameters in rats. J Toxicol Sci. 2010;35:189-196.
14. Mizoguchi Y, Matsuoka T, Mizuguchi H, Endoh T, Kamata R, Fukuda K, et al. Changes in blood parameters in New Zealand White rabbits during pregnancy. Lab Animals. 2010;44:33-39.
15. Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2007 May;109(5):1146–55.
16. Bennett SA, Bagot CN, Arya R. Pregnancy loss and thrombophilia: the elusive link. Br J Haematol. 2012;157:529-542.

17. Thornton P, Douglas J. Coagulation in pregnancy. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2010 Jun;24(3):339–52.
18. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. Protein Cell. 2018;9(1):15-32.
19. IND [redacted] FDA [redacted]. Email communication from [redacted] (US FDA) to [redacted] (Sanofi). 20[redacted].
20. Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. Pharm Res. 2007 Sep;24(9):1759-71.
21. Assessment of abuse potential of drugs (Guidance for Industry). Center for drug evaluation and Research. U.S. Food and Drug Administration (FDA); January 2017. Available from: https://www.fda.gov/media/116739/download
22. [redacted]FDA meeting summary: IND[redacted]. 20[redacted].

サノフィ株式会社

efanesoctocog alfa

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.7 毒性試験概要表

Total number of pages: 40

目　　次

2.6.7 毒性試験概要表 1

目　　次 2

表　目　次 4

1　　毒性試験一覧表 5

2　　トキシコキネティクス試験の一覧表 7

3　　トキシコキネティクス試験成績の一覧 9

4　　毒性試験使用ロット 15

5　　単回投与毒性試験 16

6　　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験 17

7　　反復投与毒性試験 18

8　　*In Vitro*遺伝毒性試験 31

9　　*In Vivo*遺伝毒性試験 32

10　　がん原性試験 33

11　　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験 34

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 35

13　　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験 36

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 37

15　　幼若動物を用いた試験 38

16 局所刺激性試験 39

17 その他の毒性試験 40

表 目 次

表2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - Study program 5
表2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies 7
表2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetic data 9
表 2.6.7.3.1 - Day 1 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by concentration) 9
表2.6.7.3.2 - Day 28/29 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by concentration) 10
表2.6.7.3.3 - Day 1 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by chromogenic activity) 11
表2.6.7.3.4 - Day 28 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by chromogenic activity) 12
表2.6.7.3.5 - Animal:human exposure margins for BIVV001 - Day 1 13
表2.6.7.3.6 - Animal:human exposure margins for BIVV001 - Day 28/29 14
表2.6.7.4 - Toxicology drug substance 15
表2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicology - 4-week IV rat study with a 2-week recovery 18
表2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery 22
表2.6.7.17 A - Other toxicology studies - Hemocompatibility 40

1 毒性試験一覧表

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - Study program

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Species (strain)	Method of administration	Duration of dosing	Doses (IU/kg/dose)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location
Single-dose toxicology							
Not applicable							
Repeat-dose toxicology							
Sprague-Dawley rat	IV	4 weeks	0, 75, 250, 750 every 3 days	Yes	[redacted] Canada	[P073-16-02]	Module 4.2.3.2-1
Cynomolgus monkey	IV	4 weeks	0, 25, 75, 250, 750 every 4 days	Yes	[redacted], Canada	[P073-16-01]	Module 4.2.3.2-2
Genotoxicity							
Not applicable							
Carcinogenicity							
Not applicable							
Fertility and early embryonic development							
Not applicable							
Embryo-fetal development							
Not applicable							

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IU: international unit; IV: intravenous

表 2.6.7.1 - Toxicology tabulated summary – overview - Study program (Continued)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Species (strain)	Method of administration	Duration of dosing	Doses (IU/kg/dose)	GLP compliance	Testing facility	Study number	Location
Pre- and postnatal development							
Not applicable							
Juvenile toxicology							
Not applicable							
Local tolerance							
Not applicable							
Other toxicology studies							
Human whole blood and plasma	In vitro	NA	0, 0.41, 1.2, 4.1 µg/mL	Yes	[redacted], Canada	[P073-16-04]	Module 4.2.3.7.7-1

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IU: international unit; NA: not applicable

2　トキシコキネティクス試験の一覧表

表 2.6.7.2 - Overview of toxicokinetics studies

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (IU//kg/dose)	GLP compliance	Study number	Location
Single-dose toxicology						
Not applicable						
Repeat-dose toxicology						
4-week study	Sprague-Dawley rat	IV	0, 75, 250, 750 every 3 days	Yes	[P073-16-02]	Module 4.2.3.2-1
4-week study	Cynomolgus monkey	IV	0, 25, 75, 250, 750 every 4 days	Yes	[P073-16-01]	Module 4.2.3.2-2
Genotoxicity						
Not applicable						
Carcinogenicity						
Not applicable						
Fertility and early embryonic development						
Not applicable						
Embryo-fetal development						
Not applicable						
Pre- and postnatal development						
Not applicable						

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IU: international unit; IV: intravenous

表 2.6.7.2 – Overview of toxicokinetics studies (Continued)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Type of study	Test system	Method of administration	Doses (IU//kg/dose)	GLP compliance	Study number	Location
Juvenile toxicity						
Not applicable						
Local tolerance						
Not applicable						
Other toxicity studies						
Not applicable						

Abbreviations: GLP: good laboratory practice; IU: international unit

3　トキシコキネティクス試験成績の一覧

表 2.6.7.3 - Toxicokinetics – Overview of toxicokinetic data

表 2.6.7.3.1 - Day 1 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by concentration)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Dose (IU/kg/dose)	Day 1[a]			
	Rat		Monkey	
	M	F	M	F
C_{max} (ng/mL)				
25	NT	NT	277	296
75	519	528	922	842
250	1790	1660	2810	3030
750	5750	2520	8340	8910
AUC_{0-t} (ng•hr/mL)				
25	NT	NT	7580	7550
75	9000	8230	23 400	19 500
250	36 600	23 200	76 000	77 400
750	75 900	50 700	232 000	205 000

Abbreviations: AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; GLP: good laboratory practice; IU: international unit; M: male; NT: not tested

a All data from repeat-dose GLP studies. Source of data: Rat: 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-02]; Monkey: 25, 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-01].

表 2.6.7.3.2 - Day 28/29 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by concentration)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Dose (IU/kg/dose)	Day 28[a]/29[b,c]			
	Rat		Monkey	
	M	F	M	F
C_{max} (ng/mL)				
25	NT	NT	316	296
75	750	657	1930	859
250	1820	1270	ND	2300
750	6850	3660	ND	ND
AUC_{0-t} (ng•hr/mL)				
25	NT	NT	7370	7890
75	14 200	12 800	33 100	26 000
250	35 200	23 700	ND	39 100
750	NR	NR	ND	ND

Abbreviations: AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; GLP: good laboratory practice; hr: hour; IU: international unit; M: male;
NA: not applicable; ND: not detected; NR: no results; NT: not tested

a Rat

b Monkey

c All data from repeat-dose GLP studies. Source of data: Rat: 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-02]; Monkey: 25, 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-01].

表 2.6.7.3.3 - Day 1 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by chromogenic activity)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Dose (IU/kg/dose)	Day 1[a]			
	Rat		Monkey	
	M	F	M	F
C_{max} (mIU/mL)				
25	NT	NT	1050	1160
75	2170	1870	3210	3000
250	7780	5930	11 100	12 400
750	22 100	16 200	31 200	32 400
AUC_{0-t} (mIU•hr/mL)				
25	NT	NT	29 600	33 400
75	37 500	32 200	79 900	77 600
250	139 000	95 900	283 000	306 000
750	382 000	365 000	767 000	799 000

Abbreviations: AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; GLP: good laboratory practice; hr: hour; IU: international unit; M: male; NT: not tested

a All data from repeat-dose GLP studies. Source of data: Rat: 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-02]; Monkey: 25, 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-01].

表 2.6.7.3.4 - Day 28 toxicokinetic data for BIVV001 (measured by chromogenic activity)

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Dose (IU/kg/dose)	Day 28[a]/29[b,c]			
	Rat		Monkey	
	M	F	M	F
C_{max} (mIU/mL)				
25	ND	ND	1160	1140
75	3030	2560	3960	2390
250	9220	4110	ND	7050
750	29 800	28 400	ND	ND
AUC_{0-t} (mIU•hr/mL)				
25	ND	ND	32 000	33 200
75	60 400	49 300	112 000	84 600
250	135 000	112 000	ND	134 000
750	NR	NR	ND	ND

Abbreviations: AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; GLP: good laboratory practice; hr: hour; IU: international unit; M: male; ND: not detected; NR: no results

a Rat

b Monkey

c All data from repeat-dose GLP studies. Source of data: Rat: 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-02]; Monkey: 25, 75, 250, 750 IU/kg/dose doses from [P073-16-01].

表 2.6.7.3.5 - Animal:human exposure margins for BIVV001 - Day 1

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Study type	Species	Sex	NOAEL (IU/kg/dose)	Animal:human exposure margin (Based on HED)[a]	Chromogenic activity AUC_{0-t} (mIU.hr/mL)	Animal:human exposure margin (Based on chromogenic activity AUC)[b]
4-week repeat-dose	Rat	M	750	RHD: 15x	382 000	RHD: 0.7x
		F	750		365 000	RHD: 0.6x
4-week repeat-dose	Monkey	M	750		767 000	RHD: 1.3x
		F	750		799 000	RHD: 1.4x

Abbreviations: AUC: area under the concentration curve; AUC_{0-inf}: area under the plasma concentration curve extrapolated to infinity; AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; $AUC_{0-\tau}$; Area under the plasma concentration-time curve during a dose interval (τ); F: female; HED: human equivalent dose; hr: hour; IU: international unit; M: male; NOAEL: no-observed-adverse-effect level; RHD: recommended human dose

Note: x = fold changes.

a Maximum recommended human dose is 65 IU/kg once weekly; RHD is 50 IU/kg once weekly. Comparisons based on conversion to HED based on isometric scaling of doses (see text in 2.6.6 Nonclinical Toxicology Written Summary [Section 9.1] for discussion of scaling approach).

b Human $AUC_{0-\tau}$ at the RHD of 50 IU/kg once weekly (2-stage chromogenic assay; Day 1 AUC_{0-inf}: 5700 IU.hr/dL [570 000 mIU.hr/mL] (2.7.2 Clinical Pharmacology Summary, Section 2.3).

表 2.6.7.3.6 - Animal:human exposure margins for BIVV001 - Day 28/29

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Study type	Species	Sex	NOAEL (IU/kg/dose)	Animal:human exposure margin (Based on HED)[a]	Chromogenic activity AUC_{0-t} (mIU•hr/mL)	Animal:human exposure margin (Based on chromogenic activity AUC)[b]
4-week repeat-dose	Rat	M	750	RHD: 15x	NR	NC
		F	750		NR	NC
4-week repeat-dose	Monkey	M	750		ND	NC
		F	750		ND	NC

Abbreviations: ADA: anti-drug antibodies; AUC: area under the concentration curve; AUC_{0-inf}: area under the plasma concentration curve extrapolated to infinity; AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; $AUC_{0-\tau}$; area under the plasma concentration-time curve during a dose interval (τ); F: female; HED: human equivalent dose; hr: hour; IU: international unit; M: male; NC: not calculated; ND: not detected due to ADA; NOAEL: no-observed-adverse-effect level; NR: no results due to ADA; RHD: recommended human dose

Note: x = fold changes.

a Maximum recommended human dose is 65 IU/kg once weekly; RHD is 50 IU/kg once weekly. Comparisons based on conversion to human equivalent doses based on isometric scaling of doses (see text in 2.6.6 [Section 9.1] for discussion of scaling approach).

b Human $AUC_{0-\tau}$ at the RHD of 50 IU/kg once weekly (2-stage chromogenic assay; Day 22 AUC_{0-inf}: 6330 IU.hr/dL [633 000 mIU.hr/mL]) (2.7.2 Clinical Pharmacology Summary, Section 2.3).

4　毒性試験使用ロット

表 2.6.7.4 - Toxicology drug substance

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Lot/Batch No.	Total protein (ppm)[a]	Endotoxin (EU/mL)	Bioburden (CFU/10 mL)	Purity (%)[b]	Activity		Study No.	Type of study	Location
					aPTT assay (IU/mL/IU/mg)	Chromogenic assay (IU/mL/IU/mg)			
[redacted][c]	[redacted]	<[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[P073-16-02]	4-week IV rat	Module 4.2.3.2-1
							[P073-16-01]	4-week IV monkey	Module 4.2.3.2-2
							[P073-16-04]	In vitro hemocompatibility	Module 4.2.3.7.7-1

Abbreviations: aPTT: activated partial thromboplastin time; CFU: colony forming units; EU: endotoxin units; IU: international unit; IV: intravenous

a Host cell protein

b Total aggregate (%) by size exclusion chromatography (target ≤10%)

c Values are from test summary for Lot/Batch [redacted] issued [redacted] 20[redacted]

5　単回投与毒性試験

該当なし。

6　反復投与毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当なし。

7 反復投与毒性試験

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicology - 4-week IV rat study with a 2-week recovery

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Sprague-Dawley rat with a 14-day recovery period					
Species/strain:	Rat / Sprague-Dawley	**Duration of dosing:**	4 weeks	**Test article:**	BIVV001
Initial age:	7 weeks	**Duration of post-dose:**	2 weeks	**Study No.:**	[P073-16-02]
Date of first dose:	[redacted]-20[redacted]	**Method of administration:**	IV infusion once every 3 days (total of 10 doses)	**Location:**	Module 4.2.3.2-1
Vehicle/formulation:	10 mM Histidine, 250 mM Arginine HCl, 5% sucrose, 5 mM $CaCl_2$, 0.05% PS80, pH 7			**GLP compliance:**	Yes
Special features:	Ten rats/sex/dose were euthanized following 4 weeks of dosing (once every 3 days) and 5 additional rats/sex from the control and 750 IU/kg/dose groups were euthanized after a 2-week non-dosing (recovery) period. Study evaluated CNS safety pharmacology endpoints.				
No-observed-adverse-effect level:	750 IU/kg/dose				

Abbreviations: CNS: central nervous system; GLP: good laboratory practice; IV: intravenous; mM: millimolar; PS: polysorbate

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicology - 4-week IV rat study with a 2-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Sprague-Dawley rat with a 14-day recovery period									
Dose (IU/kg/dose)		**0 (vehicle control)**		**75**		**250**		**750**	
Number of rats on study		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
	Main study: **Recovery:** **Toxicokinetic:**	**10** **5** **3**	**10** **5** **3**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **5** **9**	**10** **5** **9**
Toxicokinetics:									
AUC_{0-t} (ng•h/mL)	**Day 1** **Day 28**	ND ND	ND ND	9000 14 200	8230 12 800	36 600 35 200	23 200 23 700	75 900 NR	50 700 NR
C_{max} (ng/mL)	**Day 1** **Day 28**	ND ND	ND ND	519 750	528 657	1790 1820	1660 1270	5750 6850	2520 3660
$t_{1/2}$ (hr)	**Day 1** **Day 28**	NC NC	NC NC	# 19.7	18.3 18.8	20.8 #	19.6 #	21.2 NC	20 NC
ADA (+ rats / group)[b] **ADA (+/total sampled)[c]**		0/18 0/18	0/18 0/18	11/19 9/19	8/19 7/19	13/19 12/19	13/19 13/19	21/24 21/24	22/24 22/24
Additional information: n = 3 (control) or 9 (treated)/sex/group/timepoint for toxicokinetic analyses of BIVV001; lower limit of quantitation was 2.00 ng/mL.									

Abbreviations: ADA: anti-drug (anti-BIVV001) antibody; AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; IU: international unit; M: male; NC: not calculated; ND: not detected; NR: no results (<3 consecutive quantifiable concentrations); $t_{1/2}$: terminal elimination half-life

+: number of samples positive
#: results not reported

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

b Number of rats with at least 1 screening positive sample/Total number of rats in group

c Number of rats with at least 1 confirmed positive sample/Total number of rats in group

表 2.6.7.7 A - Repeat-dose toxicology - 4-week IV rat study with a 2-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Sprague-Dawley rat with a 14-day recovery period									
Dose (IU/kg/dose)		**0 (vehicle control)**		**75**		**250**		**750**	
Number of rats on study		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
	Main study: **Recovery:** **Toxicokinetic:**	**10** **5** **3**	**10** **5** **3**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **5** **9**	**10** **5** **9**
Toxicokinetics based on chromogenic activity:									
AUC_{0-t} (mIU•h/mL)	Day 1 Day 28	ND ND	ND ND	37 500 60 400	32 200 49 300	139 000 135 000	95 900 112 000	382 000 NR	365 000 NR
C_{max} (mIU/mL)	Day 1 Day 28	ND ND	ND ND	2170 3030	1870 2560	7780 9220	5930 4110	22 100 29 800	16 200 28 400
$t_{1/2}$ (hr)	Day 1 Day 28	NC NC	NC NC	17.0 17.5	17.8 18.2	20.0 #	20.6 #	22.6 NC	18.5 NC
ADA (+ rats/group)[b] **ADA (+/total sampled)[c]**		0/18 0/18	0/18 0/18	11/19 9/19	8/19 7/19	13/19 12/19	13/19 13/19	21/24 21/24	22/24 22/24
Additional information:		n = 3 (control) or 9 (treated)/sex/group/timepoint for toxicokinetic analyses of BIVV001; lower limit of quantitation was 4.00 mIU/mL.							

Abbreviations: ADA: anti-drug (anti-BIVV001) antibody; AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; IU: international unit; M: male; NC: not calculated; ND: not detected; NR: no results (<3 consecutive quantifiable concentrations); $t_{1/2}$: terminal elimination half-life

+: number of samples positive

#: results not reported

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

b Number of rats with at least 1 screening positive sample/Total number of rats in group

c Number of rats with at least 1 confirmed positive sample/Total number of rats in group

表 2.6.7.7.A - Repeat-dose toxicology - 4-week IV rat study with a 2-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073*a* by intravenous injection in the Sprague-Dawley rat with a 14-day recovery period								
Dose (IU/kg/dose)	**0 (vehicle control)**		**75**		**250**		**750**	
Number of animals on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main study: **Recovery:** **Toxicokinetic:**	**10** **5** **3**	**10** **5** **3**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **0** **9**	**10** **5** **9**	**10** **5** **9**
Hematology								
Platelet count (PLT) (10^3/µL)								
Day 29	1221.3	1116.1	1167.8	1076.3	1137.9	1104.3	**1059.9***	1138.6
Serum chemistry								
Glucose (GLUC) (mg/dL)								
Day 29	200.5	209.4	235.4	197.3	**246.9**	203.2	**251.7**	204.1
Total protein (TPROT) (g/dL)								
Day 29	5.58	5.80	5.48	5.83	5.43	5.74	**5.37**	5.93
Globulin (GLOB) (g/dL)								
Day 29	1.73	1.60	1.69	1.58	1.62	1.57	**1.54**	1.64
Albumin/Globulin (A/G) ratio								
Day 29	2.23	2.62	2.26	2.71	2.37	2.73	**2.54**	2.65
Additional information:	There were no test article-related findings noted for the following parameters: mortality, clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmic examinations, coagulation, urinalysis, macroscopic observations, organ weights, or microscopic findings. Changes in the listed hematology and serum chemistry parameters were minimal and considered non-adverse.							
Conclusion:	The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for this study was 750 IU/kg/dose.							

Abbreviations: A/G: albumin/globulin; F: female; GLOB: globulin; GLUC: glucose; IU: international unit; M: male; PLT: platelet; TPROT: total protein

Changes considered to be BIIB073-related are **bolded**

* Statistically significant vs control; p≤0.01 (Dunnett)

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the cynomolgus monkey with a 21-day recovery period					
Species/strain:	Monkey / Cynomolgus (Chinese origin)	**Duration of dosing:**	4 weeks	**Test article:**	BIVV001
Initial age:	2 to 3 years	**Duration of post-dose:**	3 weeks	**Study No.:**	[P073-16-01]
Date of first dose:	[redacted]-20[redacted]	**Method of administration:**	IV infusion once every 4 days (total of 8 doses)	**Location:**	Module 4.2.3.2-2
Vehicle/formulation:	10 mM Histidine, 250 mM Arginine HCl, 5% sucrose, 5 mM $CaCl_2$, 0.05% PS80, pH 7			**GLP compliance:**	Yes
Special features:	Four monkeys/sex/dose were euthanized following 4 weeks of dosing (once every 4 days) and 2 additional monkeys/sex from the 75 and 750 IU/kg/dose groups were euthanized after a 3-week non-dosing (recovery) period. Study included evaluation of electrocardiograms and cage-side observations for signs of respiratory distress and abnormal CNS effects.				
No observed adverse effect level:	750 IU/kg/dose				

Abbreviations: CNS: central nervous system; GLP: good laboratory practice; IU: internal unit; IV: intravenous; mM: millimolar; PS: polysorbate

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the cynomolgus monkey with a 21-day recovery period											
Dose (IU/kg/dose)		**0 (vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
	Main study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Toxicokinetics:											
AUC_{0-t} (ng•h/mL)	**Day 1** **Day 29**	ND ND	ND ND	7580 7370	7550 7890	23 400 33 100	19 500 26 000	76 000 #	77 400 39 100	232 000 #	205 000 #
C_{max} (ng/mL)	**Day 1** **Day 29**	ND ND	ND ND	277 316	296 296	922 1930	842 859	2810 #	3030 2300	8340 #	8910 #
$t_{1/2}$ (hr)	**Day 1** **Day 29**	NC NC	NC NC	30.1 24.3	24.5 24.3	31.5 32.0	25.4 21.8	30.0 #	28.2 29.3	29.3 #	23.0 #
ADA (+ monkeys/group)[b] **ADA (+/total sampled)[c]**		0/4 0/4	1/4 1/4	3/4 0/4	3/4 2/4	6/6 5/6	4/6[d] 3/6[d]	4/4 4/4	4/4 4/4[d]	6/6 6/6	6/6 5/6[e]
Additional information:		Toxicokinetic analyses of BIVV001: lower limit of quantitation was 2.00 ng/mL									

Abbreviations: ADA: anti-drug (anti-BIVV001) antibody; AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration or activity; F: female; IU: internal unit; M: male; NC: not calculated; ND: not detected; $t_{1/2}$: terminal elimination half-life
+: number of samples positive;

#: Results not reported

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

b Number of monkeys with at least 1 screening positive sample/Total number of monkeys in group

c Number of monkeys with at least 1 confirmed positive sample/Total number of monkeys in group

d One Day 1 sample confirmed positive and included in the calculation

e One TK sample was positive on Day 29, but not on Day 50; the matrix for TK samples is different than the matrix used for ADA method validation, so this sample was excluded from the summary table.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period											
Dose (IU/kg/dose)		**0 (vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study		**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
	Main study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Toxicokinetics based on chromogenic activity:											
AUC_{0-t} (mIU•h/mL)	**Day 1** **Day 29**	ND ND	ND ND	29 600 32 000	33 400 33 200	79 900 112 000	77 600 84 600	283 000 #	306 000 134 000	767 000 #	799 000 #
C_{max} (mIU/mL)	**Day 1** **Day 29**	ND ND	ND ND	1050 1160	1160 1140	3210 3960	3000 2390	11 100 #	12 400 7050	31 200 #	32 400 #
$t_{1/2}$ (hr)	**Day 1** **Day 29**	NC NC	NC NC	33.8 24.7	27.8 26.0	31.0 39.8	27.5 21.3	29.2 #	27.0 18.1	29.2 #	27.1 #
ADA (+ monkeys/group)[b] **ADA (+/total sampled)[c]**		0/4 0/4	1/4 1/4	3/4 0/4	3/4 2/4	6/6 5/6	4/6[d] 3/6[d]	4/4 4/4	4/4 4/4[d]	6/6 6/6	6/6 5/6[e]
Additional information:	Toxicokinetic analyses of BIVV001: lower limit of quantitation was 4.00 mIU/mL										

Abbreviations: ADA: anti-drug (anti-BIVV001) antibody; AUC_{0-t}: area under the plasma concentration curve from time 0 to time t; C_{max}: maximum plasma concentration; F: female; hr: hour; IU: international unit; M: male; NC: not calculated; ND: not detected; $t_{1/2}$: terminal elimination half-life

+: number of samples positive; #: results not reported

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

b Number of monkeys with at least 1 screening positive sample/Total number of monkeys in group

c Number of monkeys with at least 1 confirmed positive sample/Total number of monkeys in group

d One Day 1 sample confirmed positive and included in the calculation

e One TK sample was positive on Day 29, but not on Day 50; the matrix for TK samples is different than the matrix used for ADA method validation, so this sample was excluded from the summary table.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073*a* by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period										
Dose (IU/kg/dose)	**0 (vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Noteworthy findings:	Recovery male at 750 IU/kg/dose found dead Day 30 following TK sampling on Day 29. Death due to blood loss secondary to venipuncture and impaired hemostasis due to neutralizing antibodies against FVIII.									
Hematology										
White blood cells (WBC) (10^3/µL)										
Day 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 33	11.730	10.418	13.878	12.838	**15.790**	10.790	**16.593**	**19.503**	10.968	**16.560**
Day 50	NR	NR	NR	NR	**22.265**	12.600	NR	NR	14.050	9.155
Neutrophils (NEUT) (10^3/µL)										
Day 13	6.660	5.640	5.670	5.438	6.645	8.326	6.068	5.103	5.228	**9.665**
Day 33	5.775	5.610	**9.598**	8.633	**11.908**	6.708	**11.780**	**15.403**	6.505	**12.300**
Day 50	NR	NR	NR	NR	**14.295**	8.025	NR	NR	4.870	4.070
Monocytes (MONO) (10^3/µL)										
Day 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Day 33	0.290	0.258	0.293	0.285	**0.415**	0.293	**0.550**	0.308	0.245	0.343
Day 50	NR	NR	NR	NR	**0.830**	0.385	NR	NR	0.390	0.230

Abbreviations: F: female; FVIII: coagulation factor VIII; M: male; IU: international unit; MONO: monocytes; NEUT: neutrophils; NR: no results; TK: toxicokinetic; WBC: white blood cells

-: values similar to control and not included in table

Changes considered to be BIIB073-related are **bolded**.

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa.

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period										
Dose (IU/kg/dose)	**0 (vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main Study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Hematology (continued)										
Red blood cells (RBC) (10^6/µL)										
Day 13	6.160	4.983	5.975	5.480	**5.465**[b]	5.346	**5.560**	5.280	**5.422**[b]	5.303
Day 33	5.633	5.038	**5.318**	5.248	**4.483**[c]	4.875	**5.105**	**4.728**	**4.808**[a]	**4.890**
Day 50	NR	NR	NR	NR	5.650	5.100	NR	NR	**5.530**	4.920
Hemoglobin (HGB) (g/dL)										
Day 13	13.60	12.23	12.80	12.35	**13.02**	12.76	**12.65**	12.20	**12.70**	12.77
Day 33	12.50	11.75	**11.60**	11.98	**10.90**[c]	11.50	**11.60**	**11.10**	**11.48**	11.78
Day 50	NR	NR	NR	NR	13.30	12.50	NR	NR	**13.00**	12.30
Hematocrit (HCT) (%)										
Day 13	45.83	41.43	43.60	41.43	43.00	40.78	**40.95**	40.03	**42.57**	42.07
Day 33	40.20	38.70	37.98	38.25	**33.70**[b]	**36.45**	**36.38**	**35.58**	**35.85**	37.73
Day 50	NR	NR	NR	NR	43.00	38.45	NR	NR	**41.70**	39.30

Abbreviations: F: female; HCT: hematocrit; HGB: hemoglobin; IU: international unit; M: male; NR: no results; RBC: red blood cells

-: values similar to control and not included in table.

Changes considered to be BIIB073-related are **bolded.**

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

b Statistically significant vs control; p≤0.05 (Dunnett)

c Statistically significant vs control; p≤0.01 (Dunnett)

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period										
Dose (IU/kg/dose)	**0 (vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main Study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Coagulation										
Activated partial thromboplastin time (aPTT) (sec)										
Day 13	22.08	21.55	22.15	23.68	23.90	22.90	23.98	22.10	**28.32**	22.55
Day 33	21.30	23.25	22.18	24.50	**31.78**	**26.73**	**34.57**	**25.60**	**35.73**[b]	**31.60**
Day 50	NR	NR	NR	NR	24.30	22.75	NR	NR	26.50	**34.55**
Serum chemistry										
Aspartate aminotransferase (AST) (U/L)										
Day 33	46.3	58.5	**56.8**	61.8	**94.0**	57.5	**73.8**	**67.5**	45.8	**102.3**
Day 50	NR	NR	NR	NR	-	-	NR	NR	-	
Creatine kinase (CK) (U/L)										
Day 33	392.5	431.3	**871.8**	**725.0**	**2835.8**	**615.3**	**2583.8**	**1597.3**	**464.3**	**2215.0**
Day 50	NR	NR	NR	NR	619.5	251.0	NR	NR	490.0	**1082.5**

Abbreviations: aPTT: activated partial prothrombin time; AST: aspartate aminotransferase; CK: creatine kinase; F: female; IU: international unit; M: male; NR: no results

-: values similar to control and not included in table.

Changes considered to be BIIB073-related are **bolded.**

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa.

b Statistically significant vs control; p≤0.05 (Dunnett)

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period										
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main study:	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**
Recovery:	**0**	**0**	**0**	**0**	**2**	**2**	**0**	**0**	**2**	**2**
Gross pathology										
Injection site - Day 33 (Procedure-related)										
Focus, dark	4	4	4	4	3	4	4	3	4	3
Focus, pale	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1
Focus, raised	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Material accumulation, clot	2	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Discoloration, dark	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Abnormal consistency, firm	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0
Injection site - Day 50 (Procedure-related)										
Focus, dark	NR	NR	NR	NR	0	0	NR	NR	1	0
Spleen - Day 50										
Mass	NR	NR	NR	NR	1	0	NR	NR	0	0

Abbreviations: F: female; M: male; NR: no results

-: values similar to control and not included in table.

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period										
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Histopathology (LM)										
Injection site - Day 33 (Procedure-related)										
Necrosis, perivascular, left, brachial vein	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Necrosis, vascular/perivascular, right brachial vein	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
Hemorrhage, perivascular, brachial vein, bilateral	0	0	0	1	0	0	0	0	2	2
Hemorrhage, perivascular, left brachial vein	4	4	3	2	3	4	4	3	2	2
Hemorrhage, perivascular, right brachial vein	4	3	4	2	3	2	3	4	2	2
Infiltration, mononuclear cell, perivascular, left brachial vein	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Infiltration, mononuclear cell, perivascular, right brachial vein	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrin, vascular, left brachial vein	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Fibrin, vascular/perivascular, right brachial vein	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Infiltration, neutrophilic, perivascular, brachial vein, bilateral	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0
Infiltration, neutrophilic, vascular/perivascular, left brachial vein	0	1	1	1	0	3	2	0	1	3

Abbreviations: F: female; LM: light microscopy; M: male;

-: values similar to control and not included in table

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

表 2.6.7.7 B - Repeat-dose toxicology - 4-week IV Monkey study with a 3-week recovery (continued)

Report title: A 4-week repeat dose toxicity study of BIIB073[a] by intravenous injection in the Cynomolgus monkey with a 21-day recovery period										
Dose (mg/kg/day)	**0 (Vehicle control)**		**25**		**75**		**250**		**750**	
Number of monkeys on study	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**	**M**	**F**
Main study: **Recovery:**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**	**4** **0**	**4** **0**	**4** **2**	**4** **2**
Histopathology (LM) (Continued)										
Injection site - Day 33 (Procedure-related) (Continued)										
Infiltration, neutrophilic, vascular/perivascular, right brachial vein	1	0	2	0	0	1	1	0	2	0
Fibroplasia, vascular/perivascular, left brachial vein	1	1	1	1	0	2	0	0	0	1
Fibroplasia, vascular/perivascular, right brachial vein	0	2	0	2	1	0	0	2	0	1
Injection site - Day 50 (Procedure-related)										
Hemorrhage, perivascular, right brachial vein	NR	NR	NR	NR	0	0	NR	NR	1	0
Spleen - Day 50										
Hematoma	NR	NR	NR	NR	1	-	NR	NR	-	-
Additional information:	There were no test article-related findings noted for the following parameters: clinical observations, body weight, food consumption, ophthalmic examinations, electrocardiography, urinalysis, organ weights, macroscopic findings (other than one splenic mass [hematoma] and procedure-related noted for main study monkeys). Changes in the listed hematology and serum chemistry parameters were minimal, not correlated with organ weight or microscopic changes, and considered non-adverse.									
Conclusion:	The no-observed-adverse-effect level (NOAEL) for this study was 750 IU/kg/dose.									

Abbreviations: F: female; LM: light microscopy; M: male; NR: no results

-: values similar to control and not included in table

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa

8 *In Vitro* 遺伝毒性試験

該当なし。

9 *In Vivo* 遺伝毒性試験

該当なし。

10　がん原性試験

該当なし。

11　生殖発生毒性試験 - 重要な試験以外の試験

該当なし。

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

該当なし。

13　生殖発生毒性試験－胚･胎児発生に関する試験

該当なし。

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

該当なし。

15　幼若動物を用いた試験

該当なし。

16　局所刺激性試験

該当なし。

17　その他の毒性試験

表 2.6.7.17 A - Other toxicology studies - Hemocompatibility

Test article: BIVV001 (efanesoctocog alfa)

Species/Strain	Method of administration	Duration of dosing	Concentrations (µg/mL)	Gender and No. per group	Noteworthy findings	Study number	Location
Human whole blood and plasma	In vitro	Single	0, 0.41, 1.2, 4.1	3 M, 3 F	BIIB073[a] formulations up to a final whole blood concentration of 4.1 µg/mL (corresponding to 41 µg/mL formulation) did not induce hemolysis of human whole blood and were compatible with human plasma	[P073-16-04]	Module 4.2.3.7.7-1

Abbreviations: F: females; M: males

a BIIB073 = BIVV001 = efanesoctocog alfa