目次

略号一覧表 2
2.6.6 毒性試験の概要文 3
2.6.6.1 まとめ 3
2.6.6.2 単回投与毒性試験 4
2.6.6.2.1 TAK-662 のマウス単回静脈内投与毒性試験 4
2.6.6.2.2 TAK-662 のラット単回静脈内投与毒性試験 5
2.6.6.3 反復投与毒性試験 5
2.6.6.4 遺伝毒性試験 6
2.6.6.4.1 TAK-662 のネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験 6
2.6.6.5 がん原性試験 6
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 6
2.6.6.7 局所刺激性試験 7
2.6.6.7.1 TAK-662 のウサギ動脈内、静脈内及び静脈周囲投与局所刺激性試験 7
2.6.6.8 その他の毒性試験 7
2.6.6.8.1 PC（精製ヒトモノクローナル抗体）の蒸気加熱処理前後における抗原性評価 7
2.6.6.9 考察及び結論 8
2.6.6.10 図表 8
2.6.6.11 参考文献一覧 8

表

表 2.6.6.1-1 TAK-662 の非臨床毒性試験 3
表 2.6.6.2-1 TAK-662 の静脈内投与後の死亡例数 4

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
APC	Activated protein C	活性化プロテイン C
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
NMRI	Naval Medical Research Institute	—
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
PC	Protein C	プロテイン C
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動
TAK-662	Protein C Concentrate (Human)	プロテイン C 濃縮製剤（ヒト）

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

TAK-662〔プロテインC（PC）濃縮製剤（ヒト）〕をマウス及びラットに静脈内投与し、単回投与毒性試験を実施した。概略の致死量及び無毒性量（NOAEL）は、マウスではそれぞれ3000 IU/kg及び1500 IU/kg、ラットではそれぞれ2000 IU/kg超及び2000 IU/kgであった。両動物種共に臨床の予定最高投与量（120 IU/kg）とNOAELとの間に十分に大きな安全域が示されている。

TAK-662の遺伝毒性を評価するため、ネズミチフス菌を用いたin vitro復帰突然変異試験を実施した。その結果、TAK-662は変異原性を示さなかった。

ウサギを用いた静脈内、動脈内又は静脈周囲投与局所刺激性試験において、TAK-662の忍容性は良好であることが示された。

ウサギを用いた探索的抗原性試験において、PCの中間バルク粉末に対する蒸気加熱処理により新規抗原の生成は認められず、蒸気加熱処理前の精製PC中に存在する抗原の減少もなかった。

TAK-662に含まれるPCは内因性ヒトタンパク質であり、その薬理作用は種特異的な活性化プロテインC（APC）の抗凝固／抗血栓作用として十分に特徴付けられている。また、TAK-662の動物への投与による抗体産生のリスク及びTAK-662は補充療法として臨床使用されることを考慮すると、動物試験実施の意義は低いと考えられる。したがって、反復投与毒性試験、がん原性試験及び生殖発生毒性試験は実施しなかった。

重要な毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施した。開発初期には、一連の探索的毒性試験（GLP非適用）を実施した。非臨床毒性試験の一覧を表2.6.6.1-1に示す。

表2.6.6.1-1　TAK-662の非臨床毒性試験

試験の種類	動物種／系統	投与方法	投与量 (IU/kg)(a)	GLP	試験番号
単回投与毒性試験	マウス／NMRI	静脈内	1500、3000又は6000	適用	PR129905
	マウス／NMRI	静脈内	1500、3000、5000又は6000	非適用	PR229405
	ラット／Sprague Dawley	静脈内	2000	適用	PR139905
	ラット／Sprague Dawley	静脈内	1000又は2000	非適用	PR259404
遺伝毒性試験	ネズミチフス菌／TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535	in vitro	0、1.2、3.7、11、33又は100 µL/plate	適用	IM17
局所刺激性試験	ウサギ／NZW	静脈内 動脈内 静脈周囲	500 IU／匹 500 IU／匹 100 IU／匹	適用	PR279906
	ウサギ／NZW	静脈内 動脈内 静脈周囲	250又は500 IU／匹 250又は500 IU／匹 50又は100 IU／匹	非適用	PR359405
その他の毒性試験：抗原性試験	ウサギ／系統不明	皮下	0.5 mg／匹	非適用	PR419405

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準、NMRI：Naval Medical Research Institute、NOAEL：無毒性量、NZW：ニュージーランド白色種

(a) 特に記載しない限り、単位はIU/kgで示す。単回投与毒性試験におけるNOAELを下線で示す。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 TAK-662 のマウス単回静脈内投与毒性試験

（試験番号 PR129905、添付資料番号 4.2.3.1-1、評価資料）
（試験番号 PR229405、添付資料番号 4.2.3.1-2、参考資料）

GLP 適用の PR129905 試験において、2 ロットの TAK-662 を評価した。雌雄 Naval Medical Research Institute（NMRI）マウスに、注射用水で約 100 IU/mL の濃度に溶解した TAK-662 を静脈内投与した。TAK-662 は 1500、3000 又は 6000 IU/kg をそれぞれ 15、30 又は 60 mL/kg の液量で投与した。また、アルブミン対照溶液（TAK-662 に含まれる PC に代えて PC と同量の人血清アルブミン並びに TAK-662 と同量の塩化ナトリウム及びクエン酸ナトリウム水和物を含有する）を TAK-662 と同液量で投与した。さらに、陰性対照として生理食塩液を 60 mL/kg の液量で投与した。各群 10 匹（雌雄各 5 匹）から成る 10 群を用いた。

急性毒性に関連した一般状態所見について動物を 14 日間観察し、死亡例数を記録した。0、7 及び 14 日目に体重を測定した。14 日目に全ての生存マウスを安楽殺し、剖検を実施した。

生理食塩液を投与した動物に所見は認められなかった。TAK-662 1500 IU/kg 又はアルブミン対照溶液 15 mL/kg を投与した動物では、投与に関連した一般状態所見は認められず、死亡もみられなかった。

3000 IU/kg 以上の TAK-662 又は 30 mL/kg 以上のアルブミン対照溶液を投与した動物では、痙攣、呼吸困難、活動性低下及び／又は死亡が認められた。死亡はいずれも投与後 5 分以内に認められた。各群における死亡例数を表 2.6.6.2-1 に示す。

表 2.6.6.2-1　TAK-662 の静脈内投与後の死亡例数

被験物質	投与量（投与液量）		
	1500 IU/kg（15 mL/kg）	3000 IU/kg（30 mL/kg）	6000 IU/kg（60 mL/kg）
TAK-662（ロット番号：[redacted]）	0/10	1/10（雄 0/5、雌 1/5）	9/10（雄 5/5、雌 4/5）
TAK-662（ロット番号：[redacted]）	0/10	0/10	4/10（雄 2/5、雌 2/5）
アルブミン対照溶液	0/10	0/10	7/10（雄 3/5、雌 4/5）
生理食塩液	NA	NA	0/10

出典：PR129905 試験報告書　Table 1
NA：該当なし

観察された毒性所見は、TAK-662 及びアルブミン対照溶液に含まれる高濃度のクエン酸の毒性に関連していた。本試験で用いた投与液にはクエン酸ナトリウム水和物が 4.41 mg/mL 含まれていたため、TAK-662 6000 IU/kg 又はアルブミン対照溶液 60 mL/kg 投与時のクエン酸ナトリウム水和物の投与量は 265 mg/kg であり、静脈内投与時のマウス 50%致死量である 0.66 mmol/kg（194 mg/kg）を上回っていた[1]。

本試験において TAK-662 に関連した体重変化及び肉眼的病理所見は認められなかった。

本試験結果から、マウスにおける TAK-662 の概略の致死量は 3000 IU/kg であり、NOAEL は 1500 IU/kg であった。NOAEL は臨床の予定最高投与量である 120 IU/kg の 12.5 倍である。

開発初期に実施した GLP 非適用の PR229405 試験において、上記の GLP 適用試験と同様の試験デザインで、3 ロットの TAK-662 を 1500、3000、5000 又は 6000 IU/kg の用量で静脈内投与し、同一の項目を評価した。3000 IU/kg 以上の群で痙攣、呼吸困難、活動性低下及び死亡が認められた。これらの所見は製剤緩衝液（塩化ナトリウム 8.7 mg/mL 及びクエン酸ナトリウム水和物 4.4 mg/mL 溶液）を投与した対照動物でも認められ、クエン酸の毒性に関連した所見と考えられた。概略の致死量は 3000 IU/kg であり、NOAEL は 1500 IU/kg であった。

2.6.6.2.2 TAK-662 のラット単回静脈内投与毒性試験

（試験番号 PR139905、添付資料番号 4.2.3.1-3、評価資料）
（試験番号 PR259404、添付資料番号 4.2.3.1-4、参考資料）

GLP 適用の PR139905 試験において、2 ロットの TAK-662 を評価した。雌雄 Sprague Dawley ラットに、注射用水で約 100 IU/mL の濃度に溶解した TAK-662（2000 IU/kg）、アルブミン対照溶液（TAK-662 に含まれる PC に代えて PC と同量の人血清アルブミン並びに TAK-662 と同量の塩化ナトリウム及びクエン酸ナトリウム水和物を含有する）又は陰性対照（生理食塩液）を 20 mL/kg の液量で静脈内投与した。各群 10 匹（雌雄各 5 匹）から成る 4 群を用いた。

急性毒性に関連した一般状態所見について動物を 14 日間観察し、死亡例数を記録した。0、7 及び 14 日目に体重を測定した。14 日目に全ての生存ラットを安楽殺し、剖検を実施した。

本試験において、TAK-662 に関連した死亡、一般状態所見、体重変化及び肉眼的病理所見は認められなかった。したがって、ラットにおける TAK-662 の概略の致死量は 2000 IU/kg 超であり、NOAEL は 2000 IU/kg であった。NOAEL は臨床の予定最高投与量である 120 IU/kg の約 16.7 倍である。

開発初期に実施した GLP 非適用の PR259404 試験において、上記の GLP 試験と同様の試験デザインで、3 ロットの TAK-662 を 1000 又は 2000 IU/kg の用量で投与し、同一の項目を評価した。その結果、上記の GLP 適用試験と同様に死亡又は毒性所見は認められなかった。概略の致死量は 2000 IU/kg 超であり、NOAEL は 2000 IU/kg であった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

反復投与毒性試験は実施しなかった。TAK-662 は製剤中の PC が生体内で APC へ変換されることにより効力を示す。APC の抗凝固／抗血栓作用については高い種特異性が示されており[2]、主として補酵素であるプロテイン S 及び標的である第 V 因子の種特異性に起因していると考えられている[3][4]。したがって、薬理作用に関連する毒性試験動物種の使用には限界があり、TAK-662 の安全性評価のために薬理学的に適切な動物種を選択することは極めて困難である。医薬品規制調和国際会議（ICH）S6（R1）ガイドラインに基づくと、慢性疾患に対する適用が検討されているバイオテクノロジー応用医薬品では、適切な動物種における 6 ヵ月間反復投与毒性試験の実施が一般的に適当と考えられている。しかし、動物にヒトタンパク質を反復投与する試験では、異種動物に抗体が産生されるリスク及びヒトでの反応を反映しない抗原抗体反応に基づく不適合反応のリスクがある。また、TAK-662 は内因性ヒトタンパク質を生理的レベルに到達させることを意図した補充療法として使用される。したがっ

て、推奨用法・用量での臨床使用において、反復投与による安全性の懸念は生じないと考えられる。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

ICH S6（R1）ガイドラインの 4.7 遺伝毒性試験の項には、「従来の医薬品について通常実施されてきた遺伝毒性試験の範囲と種類は、バイオ医薬品に対しては適切なものでなく必要とされない。」と記載されている。TAK-662 に含まれる PC は内因性ヒトタンパク質であるため、遺伝毒性は予測されない。したがって、遺伝毒性試験の実施は不要であると考えられる。

しかし、ICH S6 ガイドラインの Step 4 が発出された 1997 年 7 月 16 日より以前は血漿タンパク質に関する経験及び知見が限られていたため、安全性の観点からネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験（in vitro 変異原性試験）のみを実施した。

2.6.6.4.1 TAK-662 のネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験

（試験番号 IM17、添付資料番号 4.2.3.3.1-1、評価資料）

GLP 適用のネズミチフス菌を用いた復帰突然変異試験を実施し、TAK-662 の変異原性を検討した。

TAK-662 は注射用水で 100 IU/mL の濃度に溶解し、1.2～100 µL/plate を適用した。ネズミチフス菌株 TA97a、TA98、TA100、TA102 及び TA1535 を用いて、外因性代謝活性化系の存在下又は非存在下で陰性及び陽性対照群を含むプレート法による試験を実施した。本試験では独立した実験を 2 回実施した。

陽性対照群ではいずれも突然変異頻度が有意に増加し、試験系の適切性が示された。TAK-662 は、いずれの適用用量でも、陰性対照と比較して突然変異頻度の統計学的に有意な増加を示さなかった。代謝活性化の有無による変化はみられなかった。

以上の結果から、TAK-662 は本試験において 100 µL/plate（10 IU/plate）の用量まで変異原性を示さなかった。

2.6.6.5 がん原性試験

がん原性試験は実施しなかった。TAK-662 に含まれる PC は内因性ヒトタンパク質であり、抗凝固／抗血栓作用に基づく薬理作用が十分に特徴付けられていることから、がん原性は予測されない。異種動物にヒトタンパク質を反復投与する試験の実施は、抗体産生のリスクのため困難であり、抗原抗体反応に基づく不適合反応はヒトでの反応を反映しないと考えられる。「医薬品のがん原性試験に関するガイドラインの改正について（平成 20 年 11 月 27 日付薬食審査発第 1127001 号）」に基づき、TAK-662 は内因性ヒトタンパク質を生理的レベルに到達させることを意図した補充療法として使用されることを考慮すると、がん原性試験は必要とされない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

生殖発生毒性試験は実施しなかった。TAK-662 に含まれる PC は内因性ヒトタンパク質であり、血液中での抗凝固作用及び間接的な線溶促進作用を有することが知られている。また、

TAK-662は内因性ヒトタンパク質を生理的レベルに到達させることを意図した補充療法として用いられることから、過剰な薬理作用が発現することによる生殖発生への影響は予測されない。2.6.6.3 項に示す通り、薬理作用に関連する毒性試験動物種の使用には限界があり、TAK-662の安全性評価のために薬理学的に適切な動物種を選択することは極めて困難である。さらに、異種動物にヒトタンパク質を反復投与する試験の実施は、抗体産生のリスクのため困難であり、抗原抗体反応に基づく不適合反応はヒトでの反応を反映しないと考えられる。したがって、動物試験を実施する意義はないと考えられる。

2.6.6.7 局所刺激性試験

2.6.6.7.1 TAK-662 のウサギ動脈内、静脈内及び静脈周囲投与局所刺激性試験

（試験番号 PR279906、添付資料番号 4.2.3.6-1、評価資料）
（試験番号 PR359405、添付資料番号 4.2.3.6-2、参考資料）

GLP 適用の PR279906 試験において、注射用水で約 100 IU/mL の濃度に溶解した TAK-662 を雌雄ニュージーランド白色種ウサギの片耳に静脈内、動脈内又は静脈周囲投与した。2 ロットの TAK-662 をそれぞれ 500 IU／匹（静脈内及び動脈内投与、5 mL／匹）又は 100 IU／匹（静脈周囲投与、1 mL／匹）の用量で投与した。対照群には、同液量のアルブミン対照溶液（TAK-662 に含まれる PC に代えて PC と同量の人血清アルブミン並びに TAK-662 と同量の塩化ナトリウム及びクエン酸ナトリウム水和物を含有する）を投与した。陰性対照として、同液量の生理食塩液を各動物の対側耳に同様に投与した。各群 4 匹（雌雄各 2 匹）から成る 9 群を用いた。

投与後 6 時間は注意深く行動及び投与部位を観察した。引き続き投与 72 時間後まで 1 日 1 回観察し、観察期間終了後に投与部位を顕微鏡的に検査した。

観察期間中、いずれの動物にも行動異常は認められず、投与部位に TAK-662 に関連した所見は認められなかった。TAK-662 及びアルブミン対照溶液のいずれの投与でも投与部位に病理組織学的所見は認められなかった。以上より、TAK-662 のウサギにおける静脈内、動脈内又は静脈周囲投与時の忍容性は良好であった。

開発初期に実施した GLP 非適用の PR359405 試験において、上記の GLP 適用試験と同様の試験デザインで、3 ロットの TAK-662 を同液量で同用量まで投与し、同一の項目を評価した。その結果、同様に良好な忍容性が示された。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 PC（精製ヒトモノクローナル抗体）の蒸気加熱処理前後における抗原性評価

（試験番号 PR419405、添付資料番号 4.2.3.7.1-1、参考資料）

GLP 非適用の抗原性試験において、精製 PC の蒸気加熱処理による新規抗原の生成の有無を評価し、製造工程におけるウイルス不活化のための蒸気加熱処理が PC の分子完全性に及ぼす影響を検討した。

各群 2 匹のウサギ（系統及び性別不明）に、3 ロットの PC 中間バルク粉末（蒸気加熱処理又は非処理）を皮下投与した。初回免疫では、0.5 mg の PC を含む 0.1 mL の投与液を 0.1 mL の完全フロイントアジュバントとともに投与した。同量の PC 及び不完全アジュバントを用いて、初回免疫から 3 週間及び 4 週間後に 2 回追加免疫した。初回免疫から 5 週間後に採血

した。蒸気加熱処理 PC による免疫後に得られた抗血清を、そのまま又は非処理 PC による吸着処理後に、新規抗原の生成の有無の検討に使用した。同様に、非蒸気加熱処理 PC で免疫した後に得られた抗血清を、そのまま又は蒸気加熱処理 PC による吸着処理後に、抗原の減少の検討に使用した。ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）を用いて蒸気加熱処理又は非蒸気加熱処理 PC を電気泳動分離した。分離したタンパク質をニトロセルロース膜に転写（ウエスタンブロット）し、蒸気加熱処理又は非蒸気加熱処理した PC に対するウサギ抗血清（吸着処理あり又はなし）とインキュベートして膜上に免疫複合体を形成した上で染色し、視覚的に評価した。

検討した結果、TAK-662 の製造工程における精製 PC の蒸気加熱処理により新規抗原の生成は認められず、蒸気加熱処理前の精製 PC 中に存在する抗原の減少もみられなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

TAK-662 の単回投与毒性試験における概略の致死量及び NOAEL は、マウスではそれぞれ 3000 IU/kg 及び 1500 IU/kg、ラットではそれぞれ 2000 IU/kg 超及び 2000 IU/kg であった。マウスで認められた毒性所見は投与液に含まれるクエン酸の毒性に関連していた。両動物種共に臨床の予定最高投与量（120 IU/kg）と NOAEL との間に十分に大きな安全域が示されている。

TAK-662 の反復投与毒性試験は実施していないが、TAK-662 は内因性ヒトタンパク質を生理的レベルに到達させることを意図した補充療法として使用されることから、推奨用法・用量での臨床使用において反復投与による安全性の懸念は生じないと考えられる。

In vitro 復帰突然変異試験において、TAK-662 の変異原性は示されなかった。TAK-662 に含まれる PC は内因性ヒトタンパク質であり、抗凝固／抗血栓作用に基づく薬理作用が十分に特徴付けられていることから、遺伝毒性及びがん原性は予測されない。

TAK-662 の生殖発生毒性試験は実施していないが、TAK-662 に含まれる PC は内因性ヒトタンパク質であり、血液中での抗凝固作用及び間接的な線溶促進作用を有することが知られていること及び TAK-662 は補充療法として用いられることから、過剰な薬理作用が発現することによる生殖発生に対する影響は予測されない。

ウサギを用いた局所刺激性試験において、予定臨床使用濃度である 100 IU/mL の静脈内、動脈内又は静脈周囲投与の忍容性は良好であることが示された。さらに、ウサギを用いた抗原性に関する探索的試験において、精製 PC の蒸気加熱処理により新規抗原の生成又は蒸気加熱処理前の精製 PC 中に存在する抗原の減少のいずれの変化も認められなかった。

非臨床安全性評価に関する以上の情報は、TAK-662 の臨床使用における安全性を十分支持していると考えられる。

2.6.6.10 図表

本文中に記載した。

2.6.6.11 参考文献一覧

[1] Gruber CM, Jr., Halbeisen WA. A study on the comparative toxic effects of citric acid and its sodium salts. J Pharmacol Exp Ther. 1948;94(1):65-7.

[2] Macias WL, Yan SB, Williams MD, Um SL, Sandusky GE, Ballard DW, et al. New insights into the protein C pathway: potential implications for the biological activities of drotrecogin alfa (activated). Crit Care. 2005;9 Suppl 4:S38-45.

[3] Katsuura Y, Mochizuki T, Tamura M, Hoshide S, Kiyoki M, Nakagaki T, et al. Species specificity of anticoagulant activity of activated human protein C. Involvement of factor V as well as protein S. Thromb Res. 1996;82(2):147-57.

[4] Yasuda F, Hayashi T, Tanitame K, Nishioka J, Suzuki K. Molecular cloning and functional characterization of rat plasma protein S. J Biochem. 1995;117(2):374-83.

目次

2.6.7 毒性試験概要表 2
2.6.7.1 毒性試験：一覧表 2
2.6.7.2 トキシコキネティクス試験：トキシコキネティクス試験の一覧表 3
2.6.7.3 トキシコキネティクス試験：トキシコキネティクス試験成績の一覧表 4
2.6.7.4 毒性試験：使用ロットの一覧 5
2.6.7.5 単回投与毒性試験 6
2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験 7
2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験 8
2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験 9
2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験 11
2.6.7.10 がん原性試験 12
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験 13
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 14
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験 15
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 16
2.6.7.15 幼若動物を用いた試験 17
2.6.7.16 局所刺激性試験 18
2.6.7.17 その他の毒性試験 19

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

Test Article: TAK-662								
Type of Study	Species/Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Dose (IU/kg)[a]	GLP	Testing Facility	Study Number	Location in CTD
Single-dose Toxicity	Mouse/NMRI	Intravenous	Single	0, 1500, 3000, 6000	Yes	[redacted][b][c]	PR129905	4.2.3.1-1
	Mouse/NMRI	Intravenous	Single	0, 1500, 3000, 5000, 6000	No	[redacted][d]	PR229405	4.2.3.1-2
	Rat/Sprague Dawley	Intravenous	Single	0, 2000	Yes	[redacted][b][c]	PR139905	4.2.3.1-3
	Rat/Sprague Dawley	Intravenous	Single	0, 1000, 2000	No	[redacted][d]	PR259404	4.2.3.1-4
Genotoxicity	*S typhimurium*/ TA97a, TA98, TA100, TA102, and TA1535	In vitro	48 hour incubation	0, 1.2, 3.7, 11, 33, 100 µL/plate	Yes	[redacted][e]	IM17	4.2.3.3.1-1
Local Tolerance	Rabbit/NZW	Intravenous Intra-arterial Paravenous	Single	500 IU/animal 500 IU/animal 100 IU/animal	Yes	[redacted][c]	PR279906	4.2.3.6-1
	Rabbit/NZW	Intravenous Intra-arterial Paravenous	Single	250, 500 IU/animal 250, 500 IU/animal 50, 100 IU/animal	No	[redacted][d]	PR359405	4.2.3.6-2
Other Toxicity Studies: Antigenicity	Rabbit/strain not documented	Subcutaneous	Once each in weeks 1, 3, 4	0.5 mg/animal	No	[redacted][d]	PR419405	4.2.3.7.1-1

GLP=Good Laboratory Practice; NMRI=Naval Medical Research Institute; NZW=New Zealand White

a Units as noted, unless otherwise specified. For single-dose toxicity, the highest No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) is underlined.

b [redacted], Austria

c [redacted], Austria

d [redacted], Austria. [redacted] was acquired by [redacted] in 19[redacted].

e [redacted], Austria

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験：トキシコキネティクス試験の一覧表

試験は実施しなかった。

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験：トキシコキネティクス試験成績の一覧表

試験は実施しなかった。

2.6.7.4 毒性試験：使用ロットの一覧

Test Article: TAK-662				
Batch Number	Protein C activity (potency[a])	Total Protein (mg/mL)[b]	Study Number	Type of Study
[redacted]			-	-
			PR 129905	Single-dose toxicity in mice
			PR139905	Single-dose toxicity in rats
			PR279906	Local tolerance
			PR 129905	Single-dose toxicity in mice
			PR139905	Single-dose toxicity in rats
			IM17	Genotoxicity
			PR279906	Local tolerance

a IU/vial

b After reconstitution

2.6.7.5 単回投与毒性試験

Test Articles: TAK-662							
Species/ Strain	Method of Administration (Vehicle/Formulation)	Dose (IU/kg)	Number and Gender Per Group	No Observed Adverse Effect Level (IU/kg)	Approximate Lethal Dose (IU/kg)	Noteworthy Findings	Study Number/ Location in CTD
Mouse /NMRI	Intravenous (Water for injection)	0[a], 1500, 3000, 6000[b]	5M/5F per test article lot[e]	1500	3000	3000 IU/kg: Mortality in 0/10M and 1/10F, and findings of cramps and depression were observed. 6000 IU/kg: Mortality in 7/10M and 6/10F, and findings of cramps, depression, and dyspnea were observed. Cramps, dyspnea and deaths were also observed in the controls received albumin placebo formulation at and above 30 mL/kg in volume.	PR129905/ 4.2.3.1-1
Mouse /NMRI	Intravenous (Water for injection)	0[c], 1500, 3000, 5000, 6000[d]	5M/5F per test article lot[f]	1500	3000	3000 IU/kg: Mortality in 3/15M and 1/15F, and findings of dyspnea, behavioral depression and cramps were observed. 5000 IU/kg: 5/5M and 5/5F were died immediately after injection. 6000 IU/kg: Mortality in 1/10M and 4/10F, and findings of dyspnea, behavioral depression and cramps were observed. Cramps, behavioral depression and dyspnea were also observed in the controls received formulation buffer at and above 30 mL/kg in volume. Deaths were observed by formulation buffer at and above 60 mL/kg. Pathological findings of hemoperitoneum, hemorrhages of lungs and thymus, mottled surface of liver or kidney and dilatation of renal pelvis, seemed to be dependent on the dose of TAK-662 and the formulation buffer.	PR229405/ 4.2.3.1-2
Rat / Sprague Dawley	Intravenous (Water for injection)	0[a], 2000	5M/5F per test article lot[e]	2000	>2000	No deaths occurred and no signs of toxicity were observed in any animal.	PR139905/ 4.2.3.1-3
Rat / Sprague Dawley	Intravenous (Water for injection)	0[c], 1000, 2000	5M/5F per test article lot[f]	2000	>2000	No deaths occurred and no toxicity symptoms were observed in any animal.	PR259404/ 4.2.3.1-4

F=female; M=male; NMRI=Naval Medical Research Institute

a Saline or albumin placebo formulation equivalent to TAK-662 in amounts of human albumin instead of PC in TAK-662, sodium chloride and trisodium citrate dihydrate

b The test article was dissolved in water to yield a concentration of approximately 100 IU/mL, and administered in volumes of 15-60 mL/kg.

c Saline or formulation buffer equivalent to TAK-662 in amounts of sodium chloride and trisodium citrate dihydrate

d The test article was dissolved in water to yield a concentration of approximately 50 or 100 IU/mL, and administered in volumes of 15-100 mL/kg.

e Animals were administered one of two lots of TAK-662.

f Animals were administered one of three lots of TAK-662.

2.6.7.6 反復投与毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施しなかった。

2.6.7.7 反復投与毒性試験：重要な試験

試験は実施しなかった。

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験

Test Article: TAK-662												
Report Title: Salmonella typhimurium reverse mutation assay with “CEPROTIN (Protein C Human)”							Study Number: IM17					
Location in CTD: 4.2.3.3.1-1												
Test for Induction of: Reverse mutation of bacterial cells			Number of Independent Assays: 2				GLP Compliance: Yes					
Species/Strains: TA97a, TA98, TA100, TA102, and TA1535			Number of Replicate Cultures: 3				Date of Treatment: [redacted] 19[redacted]					
Metabolizing System: Aroclor 1254-induced rat liver S9			Number of Cells Analyzed/Culture: -				Treatment: Plate incorporation assay for 48h					
Vehicle for Test Article: Water for injection			Vehicle for Positive Controls: Sterile water; DMSO									
Cytotoxic Effects: none			Genotoxic Effects: none									
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level or Concentration (µL/plate[a])	Assay #1: Mean Revertants/Plate					Assay #2: Mean Revertants/Plate				
			TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
Without Activation	Deionized water	100	143.7	12.3	110.0	227.3	10.5	149.5	11.5	103.5	170.5	10.0
	TAK-662	100	142.0	14.7	116.0	240.0	8.0	151.0	13.3	109.3	196.0	8.3
		33	142.3	12.7	106.7	213.3	7.7	143.7	9.7	113.7	169.0	11.3
		11	141.3	11.3	114.7	234.0	8.3	137.3	10.3	115.0	180.0	10.0
		3.7	145.7	10.7	105.3	224.0	7.3	135.0	8.0	120.0	186.0	9.3
		1.2	135.0	12.0	109.0	239.3	7.7	132.3	10.3	110.3	184.0	10.3
	4NOPD	20 µg/plate	1520.0	NA	NA	NA	NA	1360.0	NA	NA	NA	NA
		5 µg/plate	NA	608.3	NA	NA	NA	NA	670.0	NA	NA	NA
	Sodium azide	5 µg/plate	NA	NA	1746.7	NA	NA	NA	NA	1500.0	NA	NA
		1 µg/plate	NA	NA	NA	NA	536.0	NA	NA	NA	NA	389.0
	tBHPO	50 µg/plate	NA	NA	NA	640.7	NA	NA	NA	NA	526.7	NA

2.6.7.8 In Vitro 遺伝毒性試験（続き）

Test Article: TAK-662											
Report Title: Salmonella typhimurium reverse mutation assay with “CEPROTIN (Protein C Human)”										Study Number: IM17	
Location in CTD: 4.2.3.3.1-1											
Metabolic Activation	Test Article	Dose Level or Concentration (µL/plate[a])	Assay #1: Mean Revertants/Plate					Assay #2: Mean Revertants/Plate				
			TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535	TA97a	TA98	TA100	TA102	TA1535
With Activation	Deionized water	100	151.2	19.0	115.0	296.3	10.2	154.5	21.3	122.3	236.5	10.7
	TAK-662	100	148.0	18.7	121.3	282.7	7.0	158.3	18.3	117.3	216.0	9.3
		33	146.7	19.7	117.7	287.3	11.3	166.0	15.3	113.3	219.0	10.7
		11	162.7	22.0	114.0	316.0	9.7	141.3	16.3	111.0	253.0	6.7
		3.7	142.0	19.0	109.3	283.0	10.3	141.0	15.0	115.3	232.0	9.0
		1.2	142.0	21.3	104.3	298.0	8.7	148.7	19.7	121.3	227.0	9.3
	2AA	3 µg/plate	1393.3	NA	2800.0	NA	97.0	1166.7	NA	2220.0	NA	97.3
		1 µg/plate	NA	258.3	NA	NA	NA	NA	330.0	NA	NA	NA
	DHA	50 µg/plate	NA	NA	NA	980.0	NA	NA	NA	NA	826.7	NA

2AA=2-amino-anthracene; 4NOPD=4-nitro-o-phenylene-diamine; DHA=1,8-dihydroxy-anthraquinone; DMSO=dimethyl sulfoxide; GLP=Good Laboratory Practice; NA=not applicable; tBHPO=t-butyl-hydroperoxide

No significant difference in variances was found between the control and test substance groups (scheffe test, vs control group).

The positive control substances increased the mutation frequency statistically significantly (t-test, vs control group, p = 0.05 was used as the significance level).

a TAK-662 was reconstituted in water for injections to give a solution of 100 IU/mL.

2.6.7.9 In Vivo 遺伝毒性試験

試験は実施しなかった。

2.6.7.10 がん原性試験

試験は実施しなかった。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：重要な試験以外の試験

試験は実施しなかった。

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

試験は実施しなかった。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験

試験は実施しなかった。

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

試験は実施しなかった。

2.6.7.15 幼若動物を用いた試験

試験は実施しなかった。

2.6.7.16 局所刺激性試験

Test Article: TAK-662					
Species/ Strain	Method of Administration[a]	Doses (IU/animal) (Volume)	Number and Gender Per Group	Noteworthy Findings	Study Number/ Location in CTD
Rabbit/ NZW	Intravenous Intra-arterial Paravenous	500 (5 mL) 500 (5 mL) 100 (1 mL)	2M/2F	No endothelial damage or perivascular inflammation was found.	PR279906/ 4.2.3.6-1
Rabbit/ NZW	Intravenous Intra-arterial Paravenous	250, 500 (5 mL) 250, 500 (5 mL) 50, 100 (1 mL)	2M/2F	TAK-662 was well tolerated after intravenous, intra-arterial and paravenous administration.	PR359405/ 4.2.3.6-2

F=female; M=male; NZW=New Zealand White

a The test article was dissolved in water for injection.

2.6.7.17 その他の毒性試験

Test Article: Protein C (Human)						
Species/ Strain	Method of Administration	Duration of Dosing	Doses (mg protein/animal)	Number and Gender Per Group	Noteworthy Findings	Study Number/ Location in CTD
Antigenicity						
Rabbit/ strain not documented	Subcutaneous	Two booster injections after 3 and 4 weeks from first immunization	0.5 (vapor heated or non-vapor heated Protein C)	2 (sex not documented)	No formation of neoantigens; no disappearance of antigens originally present in purified protein C after vapor heating.	PR419405/ 4.2.3.7.1-1