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 血友病 A イヌを用いた単回投与毒性試験 4
2.6.6.2.2 カニクイザルを用いた単回投与試験 4
2.6.6.3 反復投与毒性試験 5
2.6.6.3.1 カニクイザルを用いた 28 日間反復投与毒性試験 5
2.6.6.3.2 カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験 6
2.6.6.4 遺伝毒性試験 8
2.6.6.5 がん原性試験 9
2.6.6.6 生殖発生毒性試験 9
2.6.6.7 局所刺激性試験 9
2.6.6.8 その他の毒性試験 9
2.6.6.8.1 免疫毒性試験 9
2.6.6.9 考察及び結論 13
2.6.6.10 参考文献一覧 14

表

表 2.6.6.1-1 毒性試験プログラム 3
表 2.6.6.3-1 群構成及び用量 6
表 2.6.6.3-2 カニクイザルにおいて 1 日 1 回投与された FVIII 製剤に対する 中和抗体の発現 8
表 2.6.6.8-1 TAK-672 又は Hyate:C 投与後（1 日 2 回 4 日間）の抗 pFVIII 中和抗体の発現 （カニクイザル） 13

図

図 2.6.6.8-1 hFVIII 事前感作マウスに TAK-672（pFVIII） 又は血漿由来の pFVIII を投与したときの抗体の発現 11
図 2.6.6.8-2 事前感作期間の抗 hFVIII 抗体発現と以後の抗 pFVIII 抗体発現の相関 12

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
BU	bethesda unit(s)	ベセスダ単位
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着法
FVIII	coagulation factor VIII	血液凝固第 VIII 因子
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
hFVIII	human coagulation factor VIII	ヒト血液凝固第 VIII 因子
ICH	international council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use	医薬品規制調和国際会議
OSCA	one-stage coagulation assay	凝固一段法
pFVIII	porcine coagulation factor VIII	ブタ血液凝固第 VIII 因子
rhFVIII	recombinant human coagulation factor VIII	遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子
rpFVIII	recombinant porcine coagulation factor VIII	遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子
TAK-672	Product code name for rpFVIII; formerly OBI-1, BAX801, BAX802, and SHP672	rpFVIII の製品コード名（旧称：OBI-1、BAX801、BAX802、SHP672）
U	unit(s)	単位

2.6.6 毒性試験の概要文

2.6.6.1 まとめ

TAK-672〔遺伝子組換えブタ血液凝固第 VIII 因子（rpFVIII）、OBI-1、BAX801、BAX802、SHP672〕の毒性は、血友病 A イヌ及びカニクイザルを用いた単回投与毒性試験並びに雌雄のカニクイザルを用いた反復投与毒性試験（最大 90 日間）を含む毒性プログラムで評価した（表 2.6.6.1-1）。カニクイザルはヒトと類似した凝固系を有しており、生物学的凝固因子の安全性評価において標準的に使用される動物種であることから、主要な毒性試験に用いる非げっ歯類動物種としてカニクイザルを選択した。反復投与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）に則り実施した。TAK-672 の対照薬として血漿由来のブタ血液凝固第 VIII 因子（pFVIII）である Hyate:C を用いた。Hyate:C は米国で販売されていたが 2004 年に製造中止となった。反復投与毒性試験で中和抗体の発現を評価した。薬物動態及びトキシコキネティクスは単回投与及び 90 日間反復投与毒性試験で評価し、局所刺激性は反復投与毒性試験の一部として評価した。免疫原性は遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子（rhFVIII）で事前感作した血友病 A マウス及びカニクイザルを用いて評価した。

表 2.6.6.1-1　毒性試験プログラム

試験の種類及び期間	投与経路	動物種	GLP
単回投与毒性			
	静脈内投与	イヌ（血友病 A）	非適用
	静脈内投与	カニクイザル	適用 [a]
反復投与毒性			
28 日間（用量漸増試験）	静脈内投与	カニクイザル	適用
90 日間	静脈内投与	カニクイザル	適用
局所刺激性（反復投与毒性試験の一部）	静脈内投与	カニクイザル	適用
その他の試験			
免疫原性			
	静脈内投与	マウス（血友病 A）	非適用
	静脈内投与	カニクイザル	適用 [a]

GLP：医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準

a. 本試験は品質保証部門（重要段階の査察又は試験データの監査）が関与しなかったことを除き、概ね GLP に準拠していた。

TAK-672 は遺伝子組換え血液凝固因子タンパク質である。一般的にバイオテクノロジー応用医薬品では、遺伝毒性試験の実施は必須とされていないことから、in vitro 及び in vivo の標準的な遺伝毒性試験は実施しなかった。がん原性試験は、遺伝子組換えタンパク質で通常実施されないことから、TAK-672 でも実施しなかった。また、マウス及びサルにおける血液凝固第 VIII 因子（FVIII）に対する中和抗体の産生により、TAK-672 の曝露を維持したうえでの試験の実施が困難であったため、生殖発生毒性試験は実施していない。

血友病 A イヌに対し、TAK-672 又は Hyate:C を最大 100 単位（U）/kg の用量で単回投与したとき、有害作用はみられなかった。

カニクイザルに対し、TAK-672 の 49.5 及び 77 U/kg を単回静脈内投与したとき、有害作用はみられなかった。

カニクイザルにおける 28 日間の用量漸増試験で、TAK-672 の 100、300、600 及び 1000 U/kg（7 日ごとに漸増）を投与した結果、一般状態、体重及びバイタルサインに有害作用を示唆する変化はみられなかった。TAK-672 を 14 日間投与した後、FVIII に対する中和抗体が確認された。

カニクイザルにおける TAK-672 の 90 日間反復投与毒性試験（TAK-672 の 82.5、247.5 又は 825 U/kg、Hyate:C の 100 U/kg を 1 日 1 回投与）でみられた一般状態、血液学的検査及び凝固パラメータの変化、並びに剖検時の肉眼所見は、内因性 FVIII に交差反応を示す外因性 FVIII に対する中和抗体の発現によるものであった。しかし、TAK-672 又は Hyate:C を投与したすべての動物で中和抗体がみられたにもかかわらず、「後天性血友病」様の臨床症状を発現した例数は少なかった。TAK-672 及び Hyate:C 投与後にみられた糸球体症は、免疫複合体の形成によるものであると考えられた。

2.6.6.2 単回投与毒性試験

2.6.6.2.1 血友病 A イヌを用いた単回投与毒性試験

PCD-101 試験、添付資料番号 4.2.3.1-1（4.2.1.1-2 と同一）（参考）

本試験は、rpFVIII である TAK-672 及びブタ血漿由来 FVIII である Hyate:C を、重度の血友病 A イヌモデルに単回静脈内投与し、止血効果、薬物動態及び忍容性を比較することを目的として実施した。

本試験の詳細は薬理試験の概要文（2.6.2）、薬理試験概要表（2.6.3）、薬物動態試験の概要文（2.6.4）及び薬物動態試験概要表（2.6.5）に示した。

試験手順：

TAK-672 又は Hyate:C を、先天性血友病 A を有する雌雄イヌ計 6 例にクロスオーバー法で単回投与し、忍容性、薬理作用及び薬物動態を比較した。各投与後に一般状態、心拍数、呼吸数、体温及び体重をモニターした。本試験での最大用量は 100 U/kg であり、これはこの動物種での最小有効量（25 U/kg）の 4 倍に相当した。

結果：

TAK-672 又は Hyate:C を最大 100 U/kg まで投与したすべての動物で、いずれのパラメータについても、有害な作用はみられなかった。

結論：

血友病 A イヌに対して TAK-672 を単回投与（3、25 及び 100 U/kg）したとき、有害な作用はみられなかった。

2.6.6.2.2 カニクイザルを用いた単回投与試験

PCM-104 試験、添付資料番号 4.2.3.1-2（参考）

本試験は、rpFVIII である TAK-672 及びブタ血漿由来 FVIII である Hyate:C をカニクイザルに単回静脈内投与し、薬物動態及び忍容性を比較することを目的として実施した。

本試験の詳細は薬物動態試験の概要文（2.6.4）及び薬物動態試験概要表（2.6.5）に示した。さらに、動物の一般状態も観察した。

試験手順：

他の試験で使用歴のあるカニクイザル(雄4例／群)に対して、TAK-672(49.5又は77 U/kg)又はHyate:C（100 U/kg）を単回静脈内投与した。

被験物質の投与後、一般状態、摂餌量及び体重を1日2回Day 2まで評価した。

結果：

TAK-672投与に関連する一般状態又は摂餌量の変化はみられなかった。Hyate:C投与群の1例で投与直後に掻痒（アレルギー反応と考えられる）がみられ、その後、短時間で衰弱した。アナフィラキシー反応に対する治療が施されたが、投与から約4時間後に心及び呼吸停止で死亡した。剖検を実施したが、剖検所見と投与及び死亡との関連性は不明であった。

結論：

カニクイザルにTAK-672（49.5及び77 U/kg）を単回静脈内投与したとき、有害作用はみられなかった。

2.6.6.3 反復投与毒性試験

2.6.6.3.1 カニクイザルを用いた28日間反復投与毒性試験

PCM-101試験、添付資料番号4.2.3.2-1（参考）

本試験は、カニクイザルにTAK-672を7日間ごとに漸増して1日1回静脈内投与し、忍容性及び免疫原性を評価することを目的として実施した。

試験手順：

2例のカニクイザル（雄1例、雌1例）に対し、TAK-672を7日間ごとに漸増して、28日間にわたり1日1回静脈（伏在静脈又は橈側皮静脈）内投与した。用量は100 U/kgから開始し、300、600及び1000 U/kgまで漸増した。

一般状態（投与部位を含む）を観察し、体重及びバイタルサインを評価した。体重は初回投与前（Day -1）、Day 7、14、21及び28に測定した。バイタルサインは、鎮静剤を投与せずに、一時的に拘束した状態で測定した。バイタルサインとして、体温（直腸）、呼吸数、心拍数及び血圧を測定した。

中和抗体の測定に使用した血液試料はDay 1、8、15、22及び29の投与前に採取した。抗FVIII中和抗体の力価を測定する標準的な検査方法はベセスダ法であるが、血中FVIIIの存在下では、この検査方法で正確に測定することはできないため、抗FVIII中和抗体活性はミキシングテストで測定した。この検査方法では、被験体の血漿：pFVIII製剤（TAK-672）=1:1の混合液を90分間インキュベートし、混合液の残存活性を測定した。中和抗体の存在下ではFVIII残存活性は、ベースラインのFVIII活性（被験体の血漿とpFVIII製剤を混合して別途測定）の平均値と比較して、80%を下回った。FVIII活性を凝固一段法（OSCA）及び発色合成基質法で測定した。これらの測定方法は、ヒト血友病患者の標準血漿と開発中のpFVIII製剤を用いてバリデートした。測定はGLPに準拠して実施した。

本試験で使用した動物は、安楽死させることなく試験終了時に実験動物コロニーに返却された。

結果：

2例のカニクイザルは試験期間を通じて生存した。TAK-672投与に関連する一般状態の変化はみられなかった。雌の右橈側の投与部位がDay 3にわずかに腫脹し、Day 12～13及び15

～16 にわずかに疼痛がみられた。TAK-672 投与に関連する体重の変化は試験期間を通じてみられず、個々の体温、呼吸数、血圧、平均動脈圧及び心拍数に、TAK-672 投与に関連すると考えられる影響はみられなかった。

2 例のカニクイザルで TAK-672（100 及び 300 U/kg）の投与 14 日後（Day 15）に FVIII に対する中和抗体が発現したため、本試験の安全域を評価することが困難であった。

結論：

TAK-672 を 100、300、600 及び 1000 U/kg の用量（7 日ごとに漸増）で、28 日間にわたりカニクイザルに反復静脈内投与した結果、有害作用を示唆する一般状態、体重及びバイタルサインの変化はみられなかった。TAK-672 の投与 14 日後（Day 15）に、FVIII に対する中和抗体が確認された。

2.6.6.3.2 カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験

PCM-102 試験、添付資料番号 4.2.3.2-2（参考）

本試験は、TAK-672（rpFVIII）をカニクイザルに最大 90 日間にわたり 1 日 1 回静脈内投与した際の潜在的な毒性及び免疫原性を、Hyate:C（血漿由来の pFVIII）を投与したカニクイザルと比較して評価することを目的として実施した。

実験室でのトキシコキネティクス測定及び投与液分析が査察対象でなかったことを除き、本試験は GLP に準拠して実施した。

試験手順：

60 例のカニクイザルを 5 群（雌雄各 6 例／群）に割り付けた（表 2.6.6.3-1）。

表 2.6.6.3-1　群構成及び用量

被験物質	動物の例数（雄／雌）	用量（名目用量 U/kg/day）	用量（実用量 U/kg/day）[a]	安楽死させた動物の例数（雄／雌）		
				Day 8	Day 29	Day 91
TAK-672 溶媒	6/6	0	0	2/2	2/2	2/2
TAK-672	6/6	75	82.5	2/2	2/2	2/2
TAK-672	6/6	225	247.5	2/2	2/2	2/2
TAK-672	6/6	750	825	2/2	2/2	2/2
Hyate:C	6/6	100	100	2/2	2/2	2/2

U：単位

a. 実用量はバイアル用量に基づく端数処理のため、名目用量とわずかに異なる。

動物に被験物質を最大で 90 日間静脈内投与し、一般状態（1 日 2 回）、体重（週に 1 回）及び心電図（ベースライン並びに Day 1、7、28 及び 90 の投与前）の変化を評価した。TAK-672 の名目用量は 75、225 及び 750 U/kg であったが、実用量は 82.5、247.5 及び 825 U/kg であった。Hyate:C の用量は 100 U/kg とした。眼科学的検査は投与開始前、Day 7、Week 4 及び Week 12 に実施した。

Day 8、29 及び 91 に、各群の雌雄各 2 例を安楽死させた。

臨床病理学的評価（血液生化学的検査、血液学的検査及び血液凝固パラメータ検査）のために、採血可能な各個体から投与開始前並びに Day 7、28、56 及び 90 の投与前に血液試料を採取した。

トキシコキネティクス解析用の血液試料は、Day 1 及び 7 の投与前、並びに投与 1 及び 6 時間後の 3 時点で、また採血可能な個体からは Day 28 及び 90 にも同 3 時点で採取した。バリデートされた OSCA 及び発色合成基質法により、FVIII 活性を測定した。

中和抗体の解析のために、Day 1 及び 7 の投与前、また生存動物からは、さらに Day 28 及び 90 の投与前にも血液試料を採取した。抗 FVIII 中和抗体をスクリーニングするためにミキシングテスト（2.6.6.3.1）を実施した。

尿検査は剖検時に膀胱穿刺により採取した試料で実施した。

全例について剖検を実施し、標準的な組織を保存した。溶媒投与群、TAK-672 の高用量（825 U/kg）群及び Hyate:C 投与群については、採取したすべての組織について病理組織学的検査を実施した。TAK-672 の低用量（82.5 U/kg）群及び中用量（247.5 U/kg）群については、一部の組織について検査を行った。

結果：

TAK-672 又は Hyate C に関連する体重、心電図、眼科学的所見及び血液生化学的検査に異常はみられなかった。

一般状態観察では、TAK-672 の 82.5 U/kg（Day 81～91 及び 87～91）で 2 例、247.5 U/kg（Day 90～91）及び 825 U/kg（Day 55～91）で各 1 例において、関節内及び軟組織出血がみられた。これらの動物の剖検で確認された出血／血腫は、血液学的所見（血中赤血球量の減少）及び凝固パラメータの変化〔Day 28 以降の活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）のわずかな延長〕と一致しており、深部組織での出血及び足の小関節の 1 つにおける関節内出血を示唆するものであった。霊長目では、TAK-672 のような rpFVIII 製剤の反復投与により、出血リスクを高める抗 FVIII 抗体の産生が誘導されることから、これらの用量非依存的な一般状態の変化は予測された所見であった。

aPTT の短縮は TAK-672 又は Hyate:C を投与した全例で Day 7 に確認され、また TAK-672 投与群では用量依存的であった。しかし、TAK-672 又は Hyate:C を投与したすべての群で、aPTT は Day 28 までに延長した。溶媒投与対照群と TAK-672 投与群との差は、統計学的に有意（$p \leq 0.05$）であった。

Day 1 及び 7 の投与 1 時間後に FVIII 活性が上昇した。TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群の FVIII ベースライン値は、Day 7 の方が Day 1 より高く、FVIII が血中に蓄積していることが示された。

サルの内因性 FVIII に交差反応する抗 pFVIII 中和抗体（上述のとおり、この抗体が「後天性血友病」様の臨床症状を引き起こす場合がある）の発現の影響により、血漿中 FVIII 活性は全例（TAK-672 又は Hyate:C を投与）で Day 28 及び 90 までに明らかに減少した。中和抗体の発現は、Day 28 及び 90 までに全例において認められた。中和抗体の発現例数の概要を表 2.6.6.3-2 に示した。

表 2.6.6.3-2 カニクイザルにおいて 1 日 1 回投与された FVIII 製剤に対する中和抗体の発現

	TAK-672 溶媒		TAK-672 82.5 U/kg		TAK-672 247.5 U/kg		TAK-672 825 U/kg		Hyate:C 100 U/kg	
Day	Chrom	1-stage	Chrom	1-stage	Chrom	1-stage	Chrom	1-stage	Chrom	1-stage
1	0/12	0/12	0/12	1/12	0/12	2/12	0/12	1/12	1/12	3/12
7	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	5/12
28	0/8	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
90	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

中和抗体が発現した例数/検査した例数
Chrom：発色合成基質法、VIII：血液凝固第 VIII 因子、U：単位、1-stage：凝固一段法

脾臓の相対及び絶対重量は、Hyate:C 投与群で Day 8、29 及び 91 に増加した。脾臓の重量増加は、病理組織学的検査でみられた脾臓リンパ過形成の所見と一致しており、Hyate:C に関連する免疫応答に起因していた。

TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群のいずれにおいても、糸球体症がみられた。その発現頻度と程度は時間の経過とともに増す傾向があった。TAK-672 及び Hyate:C の投与群で、抗 FVIII 抗体が同定され、糸球体症が免疫反応（免疫複合体の沈着）により生じたことが裏づけられた。

結論：

TAK-672 の静脈内投与後、Day 7 に用量依存的なわずかな aPTT 短縮がみられた。これは Hyate:C を投与した例においてもみられた。この変化は、FVIII に関連した両被験物質が内因性の凝固経路をわずかに増強したことを反映している可能性が考えられ、これらの被験物質の薬理学的作用と一致している。

TAK-672 の長期投与後に観察された一般状態、血液学的検査及び凝固パラメータの変化（aPTT の延長は深部組織の出血に寄与した可能性がある）及び剖検所見は、内因性 FVIII に交差反応を示す外因性 FVIII に対する中和抗体の形成によるものであった。しかし、「後天性血友病」様の臨床症状を示唆する一般状態及び関連する変化を示す例は少なかった。中和抗体の形成は、TAK-672 及び Hyate:C を投与したすべてのカニクイザルでみられた。

TAK-672 投与と関連する毒性を示唆する肉眼又は組織学的所見はみられなかった。糸球体症は TAK-672 及び Hyate:C 投与後に確認され、免疫複合体の沈着によって引き起こされた可能性が高いと考えられた。

TAK-672 を最大 825 U/kg まで投与した際の忍容性は良好であると結論付けた。

2.6.6.4 遺伝毒性試験

遺伝毒性試験は実施していない。TAK-672 を 82.5、247.5 又は 825 U/kg の用量で 90 日間投与したサルから採取した組織の病理組織学的検査において、増殖性病変は確認されなかった（PCM-102 試験）。rpFVIII はバイオテクノロジー由来のタンパク質であることから、その作用機序及び特性より rpFVIII が直接 DNA 又は他の染色体成分と相互作用することは想定されない。このため、この生物学的製剤は遺伝毒性を有さないと考えられる。

2.6.6.5 がん原性試験

TAK-672 の構造及び生物学的特徴から、この製剤は変異原性及び染色体異常誘発性を示さず、また、それによりがん原性も有さないと考えられる。医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイダンス S6（R1）第 2 部 6 項：がん原性では、がん原性を有する懸念がない場合は、がん原性試験の実施は推奨されていない。したがって、TAK-672 はがん原性を有する懸念がないことから、がん原性試験は実施していない。

2.6.6.6 生殖発生毒性試験

以下の理由から、生殖発生毒性試験は実施していない。

TAK-672 を 82.5、247.5 及び 825 U/kg の用量で 90 日間投与したサルの生殖器官（精巣、精巣上体、前立腺、精嚢及び卵巣）の病理組織学的検査において、TAK-672 投与に関連する変化はみられなかった（PCM-102 試験）。この試験では、抗 pFVIII 中和抗体が Day 28 及び 90 に検出された。

同様に、マウスに 100 U/kg 用量の TAK-672 を静脈内投与した結果、FVIII に対する抗体が発現した（PCMU-102 試験）。このため、長期投与において TAK-672 が十分に曝露された状態でげっ歯類及びヒト以外の霊長類を用いた生殖発生毒性試験を実施することは困難であると判断した。

妊娠は血栓形成促進状態を誘起し、病理学的に顕著な凝固亢進状態は、流産及び胎盤介在性の合併症と関連している[1]。正常な動物に存在する凝固因子に加えて高濃度で凝固因子を投与した場合、この凝固亢進状態が、生殖発生毒性の正確かつ予測性のあるリスク評価に影響を及ぼす可能性がある。このため、臨床上の個々のリスクを評価することを目的として、rpFVIII を投与した動物で生殖発生毒性試験を実施することは、適切ではないと考えられる。

2.6.6.7 局所刺激性試験

TAK-672 の投与経路は静脈内である。局所刺激性は反復投与毒性試験の一部として評価した。カニクイザルに 100、300、600 及び 1000 U/kg/日の TAK-672（7 日ごとに漸増）を、28 日間にわたり反復静脈内投与したとき（PCM-101 試験）及び最大用量 825 U/kg/日の TAK-672 又は 100 U/kg/日の Hyate:C を、最大 90 日間にわたり反復静脈内投与したとき（PCM-102 試験）の局所忍容性は、良好であった。

2.6.6.8 その他の毒性試験

2.6.6.8.1 免疫毒性試験

2.6.6.8.1.1 抗 FVIII 中和抗体の測定方法

抗 FVIII 中和抗体の力価を測定する標準的な方法はベセスダ法である。しかし、血中の FVIII の存在下では、この方法では正確に測定できない。このため、カニクイザルの血漿中の抗 FVIII 中和抗体活性はミキシングテストで測定した。

この検査方法では、被験体の血漿 : pFVIII 製剤=1:1 の混合液を 90 分間インキュベートし、混合液の残存活性を測定した。中和抗体の存在下では FVIII 残存活性は、ベースラインの FVIII 活性（被験体の血漿と pFVIII 製剤を混合して別途測定）の平均値と比較して、80%を下回った。FVIII 活性は OSCA 及び／又は発色合成基質法で測定した。

ミキシングテストは反復投与試験のカニクイザルでの抗 FVIII 中和抗体の産生を評価するために用いた（PCM-101 試験、PCM-102 試験、PCM-105-ADA 試験及び PCM-105 試験）。

測定方法は、ヒト血友病 A 患者の血漿に被験物質である pFVIII 製剤を添加して作製した標準品を用いてバリデートした（PCM-101 試験及び PCM-102 試験）。測定は GLP に準拠して実施した。

2.6.6.8.1.2 血友病 A マウス

（1）rhFVIII で事前感作した血友病 A マウスにおける免疫原性

PCMU-102 試験、添付資料番号 4.2.3.7.2-1（参考）

本試験は、rhFVIII で事前感作した血友病 A マウスにおいて、B ドメイン欠損 rpFVIII である TAK-672（Lot No. [redacted]）の免疫原性を評価し、Hyate:C と比較することを目的として実施した。

試験手順：

FVIII 遺伝子のエクソン 16 を欠損させ、C57BL/6 バックグラウンドに戻し交配して作製した雌雄の血友病 A マウス[2]を使用した。

100 U/kg の rhFVIII を、週 1 回、合計 5 回にわたりマウスに尾静脈から投与した。5 回目の投与から 1 週間後に、酵素結合免疫吸着法（ELISA）で抗ヒト血液凝固第 VIII 因子（hFVIII）抗体を測定するための血液試料を、尾切断により採取した。

rhFVIII の最終投与から 16～21 週間後に、抗 FVIII 抗体検査が陽性であったマウスを無作為化し、1、10 又は 100 U/kg の TAK-672 又は Hyate:C を週に 1 回、4 週間にわたり投与した（n=16～17/群）。抗 hFVIII 抗体、抗 TAK-672 抗体及び血漿由来の pFVIII に対する抗体、又は Hyate:C に特異的な抗体を ELISA で測定するために、TAK-672 又は Hyate:C の最終投与から 2 週間後に、最終剖検時の心臓穿刺により血液を採取した。中和抗体は、マウスに投与した被験物質に応じて、TAK-672 又は Hyate:C を加えたヒト血友病患者 A 血漿を用いた補正ベセスダ法で測定した。

結果：

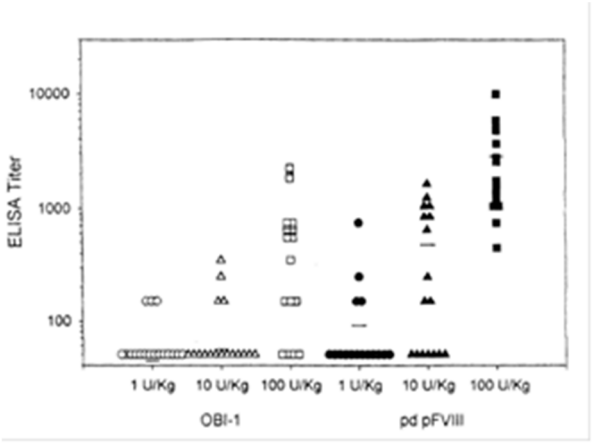
TAK-672 又は血漿由来の pFVIII に対する抗体力価（中和性及び非中和性の両抗体を含む）は、TAK-672 及び Hyate:C 投与群から採取した血漿を用いて、それぞれの投与群で、ELISA で測定した（図 2.6.6.8-1 A）。マン・ホイットニーの U 検定の結果、TAK-672 を投与したマウスで、100 U/kg 投与群において 1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群と比べて統計学的に有意（p=0.001）な抗体力価の増加がみられた。1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群間の差は有意ではなかった（p=0.58）。同様に Hyate:C を投与したマウスで、100 U/kg 投与群において 1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群と比べて有意（1 U/kg 投与群：p<0.0001、10 U/kg 投与群：p=0.0004）な抗体力価の増加がみられた。さらに、1 U/kg 投与群と比べて 10 U/kg 投与群で統計学的に有意な増加がみられた（p=0.01）。

中和抗体を測定し、マン・ホイットニーの U 検定を実施した結果、TAK-672 を投与したマウスで、1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群と比べて 100 U/kg 投与群で有意（それぞれ p=0.0002）な FVIII に対する中和抗体力価の増加が確認された（図 2.6.6.8-1 B）。1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群間の差は有意ではなかった（p=0.94）。同様に、Hyate:C 100 U/kg を投与したマウスで、1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群と比べて有意（1 U/kg 投与群：p<0.001、10 U/kg 投与群：

p=0.0004）な FVIII に対する中和抗体力価の増加がみられたが、1 U/kg 投与群及び 10 U/kg 投与群間の差は有意でなかった（p=0.14）。TAK-672 投与群と Hyate:C 投与群間で、中和抗体の発現にマン・ホイットニーの U 検定による有意な差はみられなかった（1 U/kg 投与群：p=0.87、10 U/kg 投与群：p=0.09、100 U/kg 投与群：p=0.33）（図 2.6.6.8-1 B）。

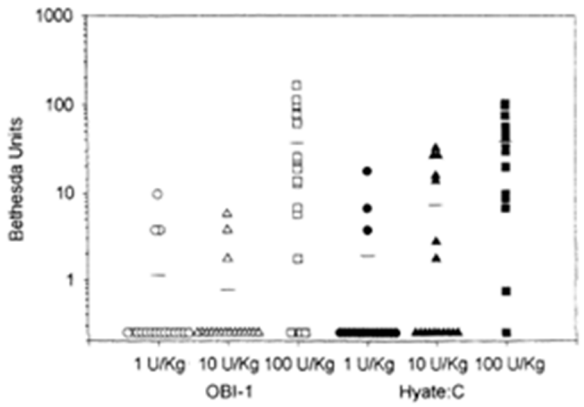
TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群の両群で、抗 pFVIII 抗体の発現が認められたが、中和抗体が発現しなかったマウスが数例いた（図 2.6.6.8-1 C）。ベセスダ力価が陽性のマウスにおいて、TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群の両群で ELISA 及びベセスダ法での測定力価に有意な相関がみられた（TAK-672 投与群：r=0.72、p<0.001、Hyate:C 投与群：r=0.62、p<0.001）。

A：抗体
（非中和抗体及び中和抗体を含む）



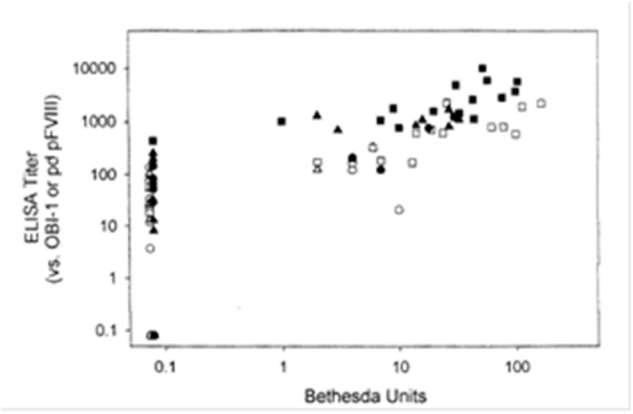
1/80～1/147000 に希釈した血漿を、TAK-672 を投与したマウスは TAK-672 を固相化したウェル、Hyate:C を投与したマウスは Hyate:C を固相化したウェルを用いた ELISA で測定した。各データは個々のマウスの測定力価を示している。白：TAK-672（OBI-1）投与マウス、黒：Hyate:C 投与マウス

B：中和抗体



血漿は、被験物質（TAK-672 又は Hyate:C）を加えたヒト血友病 A 患者の血漿を用いた補正ベセスダ法で測定した。白：TAK-672（OBI-1）投与マウス、黒：Hyate:C 投与マウス、ハッシュ記号：平均値

C：TAK-672 及び Hyate:C を投与したマウスにおける ELISA 及びベセスダ力価の相関

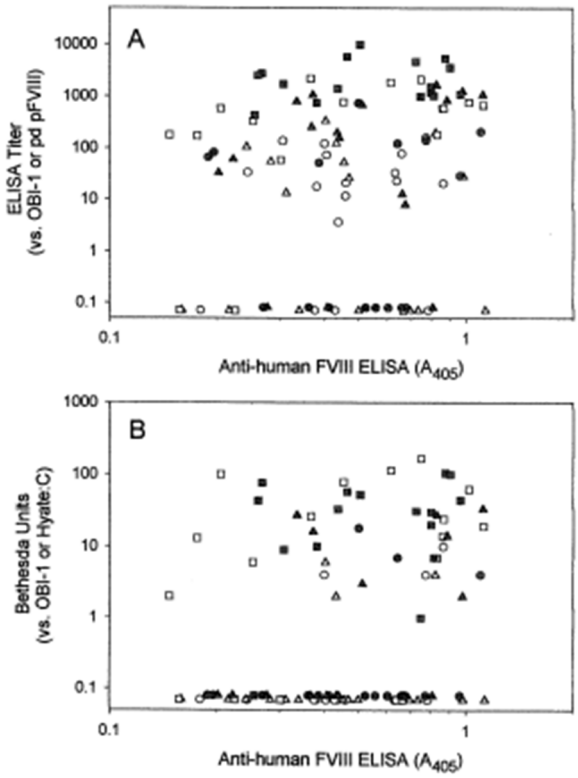


白：TAK-672（OBI-1）投与マウス、黒：Hyate:C 投与マウス、丸：1 U/kg、三角：10 U/kg、四角：100 U/kg

ELISA：酵素結合免疫吸着法、hFVIII：ヒト血液凝固第 VIII 因子、pd pFVIII：血漿由来のブタ血液凝固第 VIII 因子、pFVIII：ブタ血液凝固第 VIII 因子、U：単位

図 2.6.6.8-1　hFVIII 事前感作マウスに TAK-672（pFVIII）又は血漿由来の pFVIII を投与したときの抗体の発現

TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群の両群について ELISA 又はベセスダ法で測定した結果、事前感作期間の抗 hFVIII 抗体の発現と、以降の抗 pFVIII 抗体の発現に、有意な相関はみられなかった（図 2.6.6.8-2）。



ELISA：酵素結合免疫吸着法、FVIII：血液凝固第 VIII 因子、pd pFVIII：血漿由来のブタ血液凝固第 VIII 因子
白：TAK-672（OBI-1）投与マウス、黒：Hyate:C 投与マウス、丸：1 U/kg、三角：10 U/kg、四角：100 U/kg

図 2.6.6.8-2　事前感作期間の抗 hFVIII 抗体発現と以後の抗 pFVIII 抗体発現の相関

結論：

TAK-672 及び Hyate:C を投与したマウスで、pFVIII に対する中和抗体を補正ベセスダ法で測定した。TAK-672 を 1、10 又は 100 U/kg 投与した群及び Hyate:C を 1、10 又は 100 U/kg 投与した群で、中和抗体の発現に有意な差はみられなかった。TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群で、抗 hFVIII 抗体の発現及びその後の抗 pFVIII 抗体の発現を ELISA 又はベセスダ法で測定した結果、両者の発現に相関はみられなかった。この結果から、血友病 A マウスは、hFVIII 及び pFVIII の異なる T 細胞エピトープ及び／又は B 細胞エピトープを認識していることが示唆された。

2.6.6.8.1.3 カニクイザルの免疫原性

（1）カニクイザルを用いた 28 日間反復投与毒性試験

PCM-101 試験、添付資料番号 4.2.3.2-1（参考）

2.6.6.3.1 を参照。

（2）カニクイザルを用いた 90 日間反復投与毒性試験

PCM-102 試験、添付資料番号 4.2.3.2-2（参考）

2.6.6.3.2 を参照。

（3）カニクイザルを用いた TAK-672（B ドメイン欠損 rpFVIII）及び Hyate:C（血漿由来の pFVIII）の静脈内投与時（最大 85 日間）の免疫原性比較試験

PCM-105-ADA 試験、添付資料番号 4.2.3.7.2-2（参考）

PCM-105 試験、添付資料番号 4.2.3.7.2-3（参考）

本試験は、カニクイザルに対する TAK-672 及び Hyate:C の免疫原性を比較することを目的として実施した。薬物動態パラメータも評価した（薬物動態試験の概要文：2.6.4）。

試験手順：

本試験は、他の試験で使用歴のある 16 例のカニクイザル（雄 8 例、雌 8 例）を用いて実施した。各サルに 4 日間にわたり 12 時間ごとに 1 回、計 8 回静脈内投与した。TAK-672 は 40 及び 100 U/kg で投与し、Hyate:C は 100 U/kg で投与した。中和抗体の測定のため Day 1（投与前）、8、15、29、43、57 及び 85 に血液試料を採取した。本試験は、すべてのサルで中和抗体力価が 20 ベセスダ単位（BU）未満となり、かつ前回の時点と比較して同程度であること又は低下していることが示された時点で終了した。

結果：

TAK-672 の 40 U/kg 投与群では抗 pFVIII 中和抗体は認められず、この投与群は Day 43 で試験終了となった（表 2.6.6.8-1）。

1 BU を上回る中和抗体を発現したサルは、TAK-672 投与群（100 U/kg）の 5 例中 2 例、及び Hyate:C 投与群（100 U/kg）の 6 例中 2 例のみであった。20 BU を上回ったサルはいなかった。本試験は Day 57 で終了した。この時点で、抗 pFVIII 抗体力価は Hyate:C 投与群で 8.5 及び 2.2 BU であり、TAK-672 投与群で 8.6 及び 3.1 BU であった。

表 2.6.6.8-1　TAK-672 又は Hyate:C 投与後（1 日 2 回 4 日間）の抗 pFVIII 中和抗体の発現（カニクイザル）

	抗 pFVIII 中和抗体（陽性：BU>1）		
	TAK-672		Hyate:C
用量（U/kg）	40	100	100
抗 pFVIII 抗体	0/5	2/5	2/6

BU：ベセスダ単位、pFVIII：ブタ血液凝固第 VIII 因子、U：単位

結論：

Hyate:C 及び TAK-672 を 100 U/kg で投与したカニクイザルの間で、中和抗体の発現頻度及び期間に差はみられなかった。このモデルで、rpFVIII である TAK-672 が、ブタ血漿由来の FVIII である Hyate:C と比べてより免疫原性が高いことを示唆する結果は認められなかった。

2.6.6.9 考察及び結論

血友病 A イヌ及びカニクイザルに TAK-672 を投与した際の忍容性は良好であった。予期せぬ有害作用はみられなかった。

カニクイザルの反復投与毒性試験における主な所見は、内因性 FVIII と交差反応を示す外因性 pFVIII に対する中和抗体の発現であった。TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群の数例で、この中和抗体により、「後天性血友病」様の臨床症状を示唆する一般状態や血液学的及び凝固パラメータの変化が認められた。糸球体症の徴候は TAK-672 及び Hyate:C 投与後にみられ、免疫複合体の沈着によるものであると考えられた。

中和抗体の発現により、循環血中の FVIII の顕著な減少、aPTT 延長並びに深部組織及び関節内出血の増加が認められた。これにより、3 ヵ月を超える投与による慢性毒性試験の実施は不可能であった。

TAK-672 は遺伝子組換え血液凝固因子タンパク質である。遺伝毒性試験はこれらの製剤には必要とされていない。がん原性試験は、遺伝子組換えタンパク質で通常実施されないことから、TAK-672 でも実施していない。FVIII に対する中和抗体の産生により、TAK-672 の曝露を維持した状態での評価が困難であったため、生殖発生毒性試験は実施していない。局所刺激性は反復投与毒性試験の一部として評価した。

全体として、現在の規制ガイドラインに従って実施された TAK-672 の非臨床安全性データは、臨床試験で報告された安全性プロファイルと一致している。以上より、TAK-672 の毒性リスクは問題とならないレベルか又は低いと考えられる。

2.6.6.10 参考文献一覧

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

[2] Bi L, Lawler AM, Antonarakis SE, High KA, Gearhart JD, Kazazian HH Jr. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. Nat Genet. 1995;10:119-21.

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：一覧表....3
2.6.7.3 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
2.6.7.5.1 単回投与毒性試験：血友病 A イヌ....6
2.6.7.5.2 単回投与毒性試験：カニクイザル 7
2.6.7.6 反復投与毒性試験：用量設定試験 8
2.6.7.7 反復投与毒性試験....9
2.6.7.7.1 反復投与毒性試験：カニクイザル、28 日間....9
2.6.7.7.2 反復投与毒性試験：カニクイザル、90 日間.... 10
2.6.7.8 in vitro 遺伝毒性試験.... 15
2.6.7.9 in vivo 遺伝毒性試験 15
2.6.7.10 がん原性試験.... 15
2.6.7.11 生殖発生毒性試験：予備試験.... 15
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.... 15
2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（主要） 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.... 15
2.6.7.15 新生児を用いた試験.... 15
2.6.7.16 局所刺激性試験 16
2.6.7.17 その他の毒性試験：免疫原性.... 16
2.6.7.17.1 免疫原性：血友病 A マウス、4 週間 16
2.6.7.17.2 免疫原性：カニクイザル、28 日間.... 16
2.6.7.17.3 免疫原性：カニクイザル、90 日間.... 16
2.6.7.17.4 免疫原性：カニクイザル、85 日間.... 17

2.6.7 毒性試験概要表

2.6.7.1 毒性試験：一覧表

被験物質：TAK-672

試験の種類／動物種／系統	投与方法	投与期間	用量（U/kg）	GLP [a]	実施施設	試験番号	添付資料番号
Single-Dose Toxicity							
Dog	Intravenous	Single dose	3, 25, 100	No	[redacted], Canada	PCD-101	4.2.3.1-1 (Same as 4.2.1.1-2)
Cynomolgus monkey	Intravenous	Single dose	49.5, 77	Yes [c]	[redacted], USA	PCM-104	4.2.3.1-2
Repeated-Dose Toxicity							
28-day repeat dose toxicity with dose levels increasing every 7 days/ cynomolgus monkey	Intravenous	28 days	100, 300, 600, 1000	Yes	[redacted] [b], USA	PCM-101	4.2.3.2-1
90-day repeat dose toxicity study/ cynomolgus monkey	Intravenous	90 days	0, 82.5, 247.5, 825	Yes	[redacted] [b], USA	PCM-102	4.2.3.2-2
Genotoxicity	Not conducted						
Carcinogenicity	Not conducted						
Reproduction Toxicity	Not conducted						
Local Tolerance	Has been assessed as part of the repeat dose toxicity studies.						
Other Toxicity Studies							
Immunogenicity in mice	Intravenous	28 days	1, 10, 100	No	[redacted]; USA	PCMU-102	4.2.3.7.2-1
Immunogenicity in cynomolgus monkeys	Intravenous	Twice daily over 4 days	40, 100	Yes [c]	[redacted] [b], USA	PCM-105-ADA PCM-105	4.2.3.7.2-2 4.2.3.7.2-3

GLP: good laboratory practice; QA: quality assurance; U: unit(s); USA: United States of America

a. Indicates study includes a GLP Compliance statement.

b. Division of [redacted]

c. The study generally conformed to GLP except that there was no involvement of the QA unit (critical phase inspections or auditing of the study data).

2.6.7.2 トキシコキネティクス試験：一覧表

被験物質：TAK-672

試験の種類	動物種／系統	投与方法	用量 (U/kg)	GLP [a]	試験番号	添付資料番号
90 day repeat dose toxicity	Cynomolgus monkey	Intravenous	0, 82.5, 247.5, 825	Yes	PCM-102	4.2.3.2-2

GLP: good laboratory practice; U: unit(s)

a. Indicates study includes a GLP Compliance statement.

2.6.7.3 トキシコキネティクス試験：成績の一覧表

2.6.7.7（PCM-102 試験）を参照。

2.6.7.4 毒性試験：使用ロットの一覧

被験物質：TAK-672

ロット番号	純度（%）	Activity: Chromogen（U/mL）	タンパク質（µg/mL）	Aggregation (%)	試験番号／添付資料番号	試験の種類
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]		
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	PCD-101 4.2.3.1-1 (same as 4.2.1.1-2)	Comparative efficacy and pharmacokinetics
					PCM-104 4.2.3.1-2	Pharmacokinetics/single dose tolerability
					PCM-102 4.2.3.2-2	90 day repeat dose toxicity
					PCMU-102 4.2.3.7.2-1	Immunogenicity
					PCM-105-ADA 4.2.3.7.2-2 PCM-105 4.2.3.7.2-3	Immunogenicity
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	PCM-101 4.2.3.2-1	Dose escalation tolerability study

U: unit(s)

2.6.7.5 単回投与毒性試験

2.6.7.5.1 単回投与毒性試験：血友病 A イヌ

被験物質：TAK-672

Report Title: Cross over Comparative Study of the Efficacy and Pharmacokinetics of OBI-1 (B Domain-deleted Recombinant Porcine Coagulation Factor VIII) and Plasma-Derived Porcine Factor VIII (Hyate:C) in a Canine Model of Hemophilia A				Study No. PCD-101		
Species/Strain: dogs with hemophilia A	Single dose			Module 4.2.3.1-1 (Same as 4.2.1.1-2)		
Initial Age: 6 month and greater	Duration of Postdose: 72 hours			GLP Compliance: No		
Date of First Dose: -	Test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection					
Vehicle/Formulation: test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection						
Comparator: Hyate:C						
Special Features: none						
No Observed Adverse Effect Level: 100 U/kg						
	TAK-672 (Lot. No. [redacted] and [redacted])			Hyate:C (Lot. No [redacted])		
Dose (U/kg)	3	25	100	3	25	100
Gender/Number of Animals	M:1 / F:2	M:1 / F:1	M:3 / F:1	M:1 / F:1	M:1 / F:1	M:3 / F:1
Pharmacokinetics	Refer to 2.6.5.3.1					
Noteworthy findings						
Died or Sacrificed Moribund	-	-	-	-	-	-
Clinical observations	No noteworthy findings					
Hematology	No noteworthy findings					

F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; U: unit(s)

2.6.7.5.2 単回投与毒性試験：カニクイザル

被験物質：TAK-672

Report Title: A comparative pharmacokinetic study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) and Hyate:C (porcine plasma -derived factor VIII) administered by intravenous injection to cynomolgus monkeys			Study No. PCM-104
Species/Strain: cynomolgus monkey	Single dose		Module 4.2.3.1-2
Initial Age: 4.3 to 5.9 years	Duration of Postdose: 24 hours		GLP Compliance: Yes [b]
Date of First Dose: -	Test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection		
Vehicle/Formulation: test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection			
Comparator: Hyate:C			
Special Features: none			
No Observed Adverse-Effect Level: above 77 U/kg			
	TAK-672 (Lot. No. [redacted])		Hyate:C (Lot. No [redacted], [redacted], [redacted])
Dose (U/kg)	49.5	77	100
Gender/Number of Animals	M:4	M:4	M:4
Pharmacokinetics	refer to 2.6.5.3.2		
Noteworthy findings			
Died or Sacrificed Moribund	-	-	¼ [a]
Body Weight	-	-	-
Clinical observations	-	-	-
Necropsy [a]	-	-	1 animal
Kidney	-	-	Discoloration, red, bilateral, moderate
Lung	-	-	Focus, red, 0.3 to 1.2 cm, all lobes
Liver	-	-	Mottled, dark red, diffuse, moderate
Cecum	-	-	Discoloration, red, mucosa, moderate
Rectum	-	-	Focus, red, linear, 3 cm in length, mucosa, mild
Duodenum	-	-	Stippling, red, mucosa, mild

F: female; GLP: good laboratory practice; M: male; U: unit(s)

a. One monkey had an allergic reaction to the test article: immediately after dosing, pruritus was observed and shortly thereafter the animal collapsed; the animal was treated for anaphylaxis but died of cardiac and respiratory arrest (approximately 4 hours post-dose).

b. The study generally conformed to GLP except that there was no involvement of the QA unit (critical phase inspections or auditing of the study data).

2.6.7.6 反復投与毒性試験：用量設定試験

実施せず。

2.6.7.7 反復投与毒性試験

2.6.7.7.1 反復投与毒性試験：カニクイザル、28 日間

被験物質：TAK-672

Report Title: A dose-escalation tolerability study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) administered by intravenous injection to cynomolgus monkey						Study No. PCM-101		
Species/Strain: cynomolgus monkey		Duration of Dosing: once daily with dose levels increasing every 7 days for 28 days (4 dose levels)				Module 4.2.3.2-1		
Initial Age: 3.6 and 3.7 years		Duration of Postdose: 1 day				GLP Compliance: yes		
Date of First Dose: [redacted], 20[redacted]		Method of Administration: intravenous						
Vehicle/Formulation: test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection								
Comparator: none								
Special Features: none								
No Observed Adverse Effect Level: Maximum tolerable dose: 1000 U/kg								
	TAK-672 (Lot. No. [redacted])							
Dose (U/kg)	100		300		600		1000	
Number of Animals	M: 1	F: 1	M: 1	F: 1	M: 1	F: 1	M: 1	F: 1
Toxicokinetics: AUC	Not conducted							
Noteworthy Findings	None							
Died or sacrificed moribund	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations	-	-	-	-	-	-	-	-
Injection Site Observation	Administration of the test article was rotated between the left and right cephalic and left and right saphenous veins for the 28 days of dosing; slight bruising of all injection site areas was noted.							
Vital sign measurement	-	-	-	-	-	-	-	-
Immunogenicity								
Anti-porcine fVIII antibodies	One stage clotting assay (n=2 animals)				Chromogenic assay (n=2 animals)			
Day 1	0/2				0/2			
Day 8	0/2				0/2			
Day 15	2/2				2/2			
Day 22	2/2				2/2			
Day 29	2/2				2/2			

AUC: area under the concentration-time curve; F: female; fVIII: factor VIII; GLP: good laboratory practice; M: male; U: unit(s)

- no noteworthy finding

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験：カニクイザル、90 日間

被験物質：TAK-672

Report Title: A comparative 90-day toxicity study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) and Hyate:C (porcine factor VIII) administered by daily intravenous injection to cynomolgus monkeys								Study No. PCM-102			
Species/Strain: cynomolgus monkey				Duration of Dosing: 8, 29, 90 days/daily				Module 4.2.3.2-2			
Initial Age: 2.4 to 5.5 years				Duration of Postdose: -				GLP Compliance: yes			
Date of First Dose: [redacted].20[redacted]; [redacted].20[redacted].20[redacted]; [redacted].20[redacted]				Test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection							
Vehicle / Formulation: test articles (lyophilized powder) were reconstituted with sterile water for injection											
Comparator: Hyate:C											
Toxicokinetics: Blood samples were collected for the determination of fVIII activity prior to dosing and 1 and 6 hours post dose on days 1, 7, 28 and 90. Immunogenicity: Blood samples were drawn on days 1, 7, 28 and 90 pre-dose for quantitative anti-porcine FVIII antibody determination.											
Special Features: none											
No Observed Adverse Effect Level: Maximum tolerable dose: 825 U/kg											
		TAK-672 (Lot. No. [redacted]) [a]								Hyate:C [a]	
Dose (U/kg)		0		82.5		247.5		825		100	
Gender/Number of Animals [b]		M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6
Toxicokinetics (U/dL) [c]	Day 1	268.92		535.25		804.83		1780.58		416.08	
	Day 7	234.67		504.17		1078.25		2219.75		384.75	
	Day 28	293.25		42.88		38.57		15.63		121.38	
	Day 90	316.50		32.25		53.33		27.00		210.25	
Noteworthy Findings		None									
Died or sacrificed moribund		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Body Weight (%)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Food Consumption (%)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clinical Observations:		-		1M (F19442M): days 81 - 91, swollen (blood filled) left femoral area; 1F (F18662F): days 87 - 91, bruised and swollen chest		1 M (F19424M): swollen foot/ankle (day 90, 91), several occurrences of black stool (days 55 - 68)		1 M (F19431M): swollen foot/ankle (days 55 - 91), black stools (days 39 - 41)		-	
Ophthalmoscopy:		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験：カニクイザル、90 日間（続き）

被験物質：TAK-672

Report Title: A comparative 90-day toxicity study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) and Hyate:C (porcine factor VIII) administered by daily intravenous injection to cynomolgus monkeys			Study No. PCM-102							
	TAK-672 (Lot. No. [redacted]) [a]								Hyate:C [a]	
Dose (U/kg)	0		82.5		247.5		825		100	
Gender/Number of Animals [b]	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6	M: 2 - 6	F: 2 - 6
Hematology	-		1F (F18662F): marked anemia (decreased RBC count, Hb, Hct) reticulocytosis, increased MCV and changes in RBC morphology		1M (F19424M): moderate decrease in the indicators of red cell mass, mild increase in reticulocytes on day 56		1 M (F19431M): mild decrease in the indicators of red cell mass on day 90		-	
Coagulation Parameters										
APTT (s) [d]										
Pre-study	25.7±4.4		25.8±1.9		26.1±3.8		25.9±2.2		25.0±2.0	
Day 7 (pre-dose)	25.5±2.6		23.8±1.3		22.0±2.2		21.1±1.7		23.6±1.8	
Day 28 (pre-dose)	24.1±2.2		42.8±12.6*		39.4±8.6*		48.7±6.4*		31.6±5.5	
Day 56 (pre-dose)	24.8±1.7		41.4±5.1*		39.8±6.6*		51.0±6.5*		30.5±3.0	
Day 90 (pre-dose)	25.5±1.5		42.4±11.3*		51.4±18.8*		52.4±10.6*		29.7±2.9	
Prothrombin (s) [d]										
Pre-study	11.9±0.8		11.5±0.5		11.4±0.5		11.4±0.4		11.3±0.3	
Day 7 (pre-dose)	12.0±0.7		11.3±0.4*		11.3±0.6*		11.3±0.4*		11.4±0.3*	
Day 28 (pre-dose)	11.9±0.9		11.8±0.8		12.0±1.1		11.7±0.4		11.9±0.7	
Day 56 (pre-dose)	11.9±0.9		11.1±0.1		11.7±0.3		11.5±0.4		11.6±0.4	
Day 90 (pre-dose)	11.9±0.7		11.2±0.5		14.7±6.6		11.6±0.5		11.9±0.9	
Serum Chemistry:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験：カニクイザル、90 日間（続き）

被験物質：TAK-672

Report Title: A comparative 90-day toxicity study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) and Hyate:C (porcine factor VIII) administered by daily intravenous injection to cynomolgus monkeys									Study No. PCM-102	
	TAK-672 (Lot. No. [redacted]) [a]								Hyate:C [a]	
Dose (U/kg)	0		82.5		247.5		825		100	
Gender/Number of Animals [b]	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Urinalysis:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Organ Weights [d]										
Spleen, absolute weight (g)										
Day 8	2.881±0.380		4.295±1.338		2.914±0.720		3.648±0.190		4.778±0.557*	
Day 29	4.076±1.961		5.154±0.943		3.136±0.593		3.365±1.353		6.119±1.274	
Day 91	2.889±1.076		5.527±1.515		3.169±0.956		4.320±0.782		6.986±3.422*	
Spleen/body weight ratio										
Day 8	1.072±0.149		1.585±0.458*		1.141±0.193		1.362±0.174		1.836±0.142*	
Day 29	1.364±0.370		1.916±0.180		1.159±0.125		1.172±0.218		2.372±0.641*	
Day 91	1.062±0.385		1.952±0.656		1.102±0.351		1.546±0.348		2.469±0.836*	
Adrenal glands, absolute weight (g)										
Day 8	0.483±0.071		0.643±0.217		0.574±0.108		0.566±0.115		0.526±0.039	
Gross Pathology [e]										
Day 91	-		1M (F19442M): soft flocculent mass on the left inner thigh 1F (F18662F): hematoma, left chest		1 M (F19424M): black tarry ingesta		1 M (F19431M): red fluid in right ankle, chronic hematoma left thigh 1M (F19427M): red discoloration and thickening of the subcutaneous tissue over the left inner thigh		-	

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験：カニクイザル、90 日間（続き）

被験物質：TAK-672

Report Title: A comparative 90-day toxicity study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) and Hyate:C (porcine factor VIII) administered by daily intravenous injection to cynomolgus monkeys		Study No. PCM-102									
		TAK-672 (Lot. No. [redacted]) [a]								Hyate:C [a]	
Dose (U/kg)		0		82.5		247.5		825		100	
Gender/Number of Animals [b]		M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2	M: 2	F: 2
Histopathology											
Kidney											
Glomerulopathy											
Day 8	Minimal	0/4		0/4		0/4		0/4		2/4	
Day 29	Minimal	1/4		3/4		3/4		3/4		3/4	
	Mild	0/4		0/4		1/4		0/4		0/4	
Day 91	Minimal	0/4		2/4		4/4		1/4		1/4	
	Mild	0/4		2/4		0/4		3/4		3/4	
Spleen											
Hyperplasia, lymphoid											
Day 8	Minimal	1/4		2/4		1/4		1/4		3/4	
Day 29	Minimal	0/4		1/4		0/4		2/4		1/4	
	Mild	0/4		0/4		1/4		0/4		2/4	
Day 91	Minimal	2/4		1/4		2/4		0/4		1/4	
	Mild	0/4		0/4		0/4		1/4		3/4	

2.6.7.7.2 反復投与毒性試験：カニクイザル、90 日間（続き）

被験物質：TAK-672

Report Title: A comparative 90-day toxicity study of OBI-1 (recombinant porcine factor VIII) and Hyate:C (porcine factor VIII) administered by daily intravenous injection to cynomolgus monkeys									Study No. PCM-102	
	TAK-672 (Lot. No. [redacted]) [a]								Hyate:C [a]	
Dose (U/kg)	0		82.5		247.5		825		100	
Immunogenicity										
Anti-porcine fVIII antibodies	Chrom. Assay	one stage assay	Chrom. Assay	one stage assay	Chrom. Assay	one stage assay	Chrom. Assay	one stage assay	Chrom. Assay	one stage assay
Day 1	0/12	0/12	0/12	1/12	0/12	2/12	0/12	1/12	1/12	3/12
Day 7	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	5/12
Day 28	0/8	0/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8
Day 90	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

ANOVA: analysis of variance; APTT: activated partial thromboplastin time; Chrom: chromogenic; F: female; fVIII: factor VIII; GLP: good laboratory practice; Hb: hemoglobin; Hct: hematocrit; M: male; MCV: mean corpuscular volume; RBC: red blood cell; SD: standard deviation; U: unit(s)

- no noteworthy finding

a. Blood samples for evaluation of serum chemistry, hematology and coagulation parameters were collected from available animals prior to the initiation of dosing and prior to dosing on Days 7, 28, 56 and 90.

b. Number of animals sacrificed was 2M/2F each at day 8, day 29 and day 91.

c. Mean concentrations in males and females at 1-hour postdose are shown (chromogenic assay).

d. Data represent mean ± SD.

e. Observed in those animals with clinical signs and changes in hematology and /or coagulation parameters consistent with spontaneous hemorrhage resulting from the formation of factor VIII inhibitory antibodies in TAK-672 and Hyate:C-treated animals.

* $p \leq 0.05$ significantly different from the vehicle control group (ANOVA, Dunnett's test).

2.6.7.8 in vitro 遺伝毒性試験

実施せず。

2.6.7.9 in vivo 遺伝毒性試験

実施せず。

2.6.7.10 がん原性試験

実施せず。

2.6.7.11 生殖発生毒性試験：予備試験

実施せず。

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

実施せず。

2.6.7.13 生殖発生毒性試験：胚・胎児発生に関する試験（主要）

実施せず。

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

実施せず。

2.6.7.15 新生児を用いた試験

実施せず。

2.6.7.16 局所刺激性試験

遺伝子組換えブタ凝固第 VIII 因子を静脈内に投与する。局所刺激性は反復投与毒性試験の一部として評価した。2.6.7.7（PCM-101 試験及び PCM-102 試験）を参照。

2.6.7.17 その他の毒性試験：免疫原性

2.6.7.17.1 免疫原性：血友病 A マウス、4 週間

被験物質：TAK-672

試験の種類／期間	投与方法	動物種	用量 (U/kg)	GLP 適用	試験番号／ 添付文書番号
Comparative immunogenicity for 28 days	Intravenous (once a week, four doses)	Mice with hemophilia A[a]	1, 10, 100	No	PCMU-102 4.2.3.7.2-1

a. 血友病 A マウスに事前感作処理として 100 U/kg の rhFVIII を週 1 回、合計 5 回にわたり尾静脈から投与後、抗 FVIII 抗体陽性であったマウスを試験に用いた。

Immunogenicity
[結論]
TAK-672 及び Hyate:C を投与したマウスで、pFVIII に対する中和抗体を補正ベセスダ法で測定した。TAK-672 を 1、10 又は 100 U/kg 投与した群及び Hyate:C を 1、10 又は 100 U/kg 投与した群で、中和抗体の発現に有意な差はみられなかった。TAK-672 投与群及び Hyate:C 投与群で、hFVIII 抗体の発現及びその後の pFVIII 抗体の発現を ELISA 又はベセスダ法で測定した結果、両者の発現に相関はみられなかった。

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; GLP: good laboratory practice; hFVIII: human factor VIII; pFVIII: porcine factor VIII; U: unit(s)

2.6.7.17.2 免疫原性：カニクイザル、28 日間

2.6.7.7.1 を参照。

2.6.7.17.3 免疫原性：カニクイザル、90 日間

2.6.7.7.2 を参照。

2.6.7.17.4 免疫原性：カニクイザル、85 日間

被験物質：TAK-672

試験の種類／期間	投与方法	動物種	用量 (U/kg)	GLP 適用	試験番号／ 添付文書番号
Comparative immunogenicity up to 85 days	Intravenous (twice daily at a 12-hour interval, over 4 days)	Cynomolgus monkey	40, 100	Yes [a]	PCM-105-ADA 4.2.3.7.2-2 PCM-105 4.2.3.7.2-3

Immunogenicity			
	TAK-672		Hyate:C
Dose (U/kg)	40	100	100
Anti-porcine fVIII antibodies (positive at BU>1)	0/5	2/5	2/6

BU: bethesda units; fVIII: factor VIII; GLP: good laboratory practice; QA: quality assurance; U: unit(s)

a. The study generally conformed to GLP except that there was no involvement of the QA unit (critical phase inspections or auditing of the study data).