

第2部 CTD の概要

JAN あるいは販売名 : イダルシズマブ（遺伝子組換え）		
剤形・含量 : 注射剤・50 mg/mL		
文書名 : 2.6.1 緒言		
文書作成日 :	26 November 2015	Page 1 of 3
Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved. This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission		

目 次

目 次	2
1. 緒言	3

1. 緒言

イダルシズマブ（BI 655075）は、ダビガトランエテキシラートによる治療中に生命を脅かす又は止血困難な出血を発現している、若しくは緊急手術／処置を要する患者で、ダビガトランの抗凝固作用を速やかに中和する必要がある場合に適用される。

ダビガトランは強力な抗凝固作用を示す直接トロンビン阻害剤であり、プロドラッグであるダビガトランエテキシラートの有効成分である。他の抗凝固剤と同様に、出血はダビガトランの最も一般的な有害事象である。重度の出血性有害事象が発現することは稀であるが、このような状況で速やかに抗凝固作用を中和する効果を有する薬剤は、重度の出血患者の治療のための新たな選択肢になると考えられる。

イダルシズマブはダビガトラン及びその代謝物に強力かつ特異的に結合し、安定な複合体を形成することにより、その抗凝固作用を中和することを意図したヒト化モノクローナル抗体フラグメント（Fab）である。イダルシズマブは軽鎖と重鎖から構成されるタンパク質であり、重鎖フラグメントの 225 位のシステイン残基と軽鎖フラグメントの 219 位のシステイン残基の間のジスルフィド結合により共有結合している。本化合物の分子量は 47,800 Da であり、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞内で直接 Fab として発現させることにより製造する。

予定されているイダルシズマブの投与量は、1 回につき 5 g であり、濃度 50 mg/mL の注射用溶液が入った 2 本の 50 mL バイアルで供給される。市販予定製剤は、25 mM 酢酸ナトリウム、220 mM ソルビトール、及び 0.02% ポリソルベート 20 を含有する。

第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名： イダルシズマブ（遺伝子組換え）		
剤形・含量： 注射剤・50 mg/mL		
文書名： 2.6.2 薬理試験の概要文		
文書作成日： 22 August 2016		Page 1 of 35
Proprietary confidential information		
© 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.		
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission		

目 次

目 次	2
1. まとめ	4
2. 効力を裏付ける試験	5
2.1 イダルシズマブとダビガトランの結合に関する <i>in vitro</i> 評価	5
2.2 ダビガトランの抗凝固作用に対するイダルシズマブの <i>in vitro</i> 阻害作用	8
2.2.1 ヒト血漿及び全血中での阻害	8
2.2.2 イダルシズマブによる創傷部位へのフィブリン及び血小板沈着の回復	9
2.3 他のトロンビン基質に対するイダルシズマブの結合	10
2.4 イダルシズマブの <i>in vivo</i> 評価	14
2.4.1 <i>in vivo</i> での抗凝固活性の中和	14
2.4.2 種々の出血モデルにおけるダビガトランに関連する出血の回復	16
2.4.2.1 ラットにおける出血時間の回復	16
2.4.2.2 治療域を超えるダビガトラン濃度下のブタ鈍的外傷モデル	17
2.4.2.3 ラット尾部出血モデルにおけるイダルシズマブの分割投与	21
2.4.2.4 ブタ二重外傷モデルにおけるイダルシズマブの分割投与	22
2.4.2.5 マウス頭蓋内出血モデル	24
2.5 イダルシズマブのダビガトランに対する特異性	25
2.5.1 膠質液及び晶質液による血液希釈	26
3. 副次的薬理試験	29
3.1 経口または非経口抗凝固薬の抗凝固作用に対するイダルシズマブの影響	29
4. 安全性薬理試験	31
5. 薬力学的薬物相互作用試験	32
5.1 ダビガトラン及び抗血小板薬に関連する出血時間延長に対するイダルシズマブの影響	32
5.2 <i>in vitro</i> でのイダルシズマブによるダビガトラン中和作用に対する凝固因子濃縮製剤の影響	33
6. 考察及び結論	34

2.6.2 薬理試験の概要文

イダルシズマブ (遺伝子組換え)

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

略号一覧及び用語の定義

ACT	activated clotting time	活性化凝固時間
aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
ASA	acetylsalicylic acid	アセチルサリチル酸
AUC ₀₋₂₄	area under the curve over 24 hours	投与後時間 0 から 24 までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BI	Boehringer Ingelheim	
CAT	calibrated automated thrombogram	較正自動化トロンボグラム
CHO	chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
CNS	central nervous system	中枢神経系
C _{max}	maximum concentration	最高血漿中濃度
DE	dabigatran etexilate	ダビガトランエテキシラート
DTI	direct thrombin inhibitor	直接トロンビン阻害剤
dTT	diluted thrombin time	希釈トロンビン時間
ECG	electrocardiogram	心電図
ECT	ecarin clotting time	エカリン凝固時間
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定法
Fab	antibody fragment	抗体フラグメント
Feiba [®]	factor VIII inhibitor bypassing activator	第 VIII 因子抗体迂回活性複合体
FOB	functional observational battery	機能観察総合評価法
HR	heart rate	心拍数
ICH	intracranial hemorrhage	頭蓋内出血
K _D	binding affinity	結合親和性
LC-MS/MS	liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法
LMWH	low molecular weight heparin	低分子量ヘパリン
MWT	molecular weight	分子量
PAR1	protease activated receptor 1	プロテアーゼ活性化受容体 1
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PCC	prothrombin complex concentrate	プロトロンビン複合体濃縮製剤
PRP	platelet-rich plasma	多血小板血漿
PT	prothrombin time	プロトロンビン時間
rFVIIa	recombinant factor VIIa	遺伝子組換え活性型第 VII 因子製剤
SD	standard deviation	標準偏差
SEM	standard error of the mean	平均値の標準誤差
SFLLRN	thrombin receptor activating peptide	トロンビン受容体活性化ペプチド
SPR	surface plasmon resonance	表面プラズモン共鳴
TT	thrombin time	トロンビン時間

1. まとめ

ダビガトランは強力な抗凝固作用を示す直接トロンビン阻害剤であり、プロドラッグであるダビガトランエテキシラート (DE) の活性本体である。他の抗凝固剤と同様に、出血はダビガトランの最も一般的な副作用である。重度の出血性副作用が発現することは稀ではあるものの、こうした副作用が発現した場合に特異的中和剤を用いて速やかに抗凝固作用を中和できる薬剤は、重度の出血患者の治療のための新たな選択肢になり得ると考えられる。本薬理試験の概要文では、ダビガトランの抗凝固作用を特異的かつ安全に中和する必要がある患者への緊急処置を目的として設計された生物製剤であるイダルシズマブの *in vitro* 及び *in vivo* 薬理試験について記載する。

2. 効力を裏付ける試験

マウスに[REDACTED]を施し、ダビガトランに特異的に結合するマウス抗体を選択することにより、マウス抗ダビガトランモノクローナル抗体を産生させた。最良の候補モノクローナル抗体を切断して Fab フラグメントにし、ヒト化した。イダルシズマブ (BI 655075) は軽鎖と重鎖 (アミノ酸 1-225) から構成され、重鎖フラグメントの 225 位のシステイン残基と軽鎖フラグメントの 219 位のシステイン残基の間のジスルフィド結合により共有結合している。イダルシズマブはチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞内で直接 Fab フラグメントとして発現させることにより製造され、また、完全抗体として[REDACTED]の CHO 細胞系を用いて製造される。

2.1 イダルシズマブとダビガトランの結合に関する *in vitro* 評価

Biacore の親和性測定法を用いた評価で、イダルシズマブのダビガトランに対する結合親和性 (K_D) は 2.1 pM であることが明らかになった (表 2.1: 1)。これはダビガトランのトロンビンに対する結合親和性 K_D 0.7 nM に比べて 300 倍を超える高い親和性である [CTD 4.3-01_P07-07983]。イダルシズマブ - ダビガトラン複合体の結合動態についても評価した結果、イダルシズマブとダビガトランの会合速度は非常に速く、解離速度は遅いため、イダルシズマブ - ダビガトラン複合体の安定性を示す *in vitro* での半減期は約 260 時間であると見積もられた [CTD 4.3-03_P13-05131, CTD 4.2.1.1-08_n00231289]。このことから、イダルシズマブとダビガトランの結合は不可逆的であると考えられる。

表 2.1: 1 ダビガトランのイダルシズマブに対する結合親和性 (K_D) 並びに会合速度 (k_a) 及び解離速度 (k_d) (平均値±SD, n=3)

Fab	K_D (pM)	$k_a \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_d \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ (calculated)	estimated $T_{1/2}$ of complex
イダルシズマブ	2.1 ± 0.7	3.4 ± 0.4	0.7 ± 0.08	~260 h

重症な血液喪失又は急性腎不全に起因するアシドーシス条件下では、pH が変動することから、様々な pH 条件下でのダビガトランとイダルシズマブの結合親和性についても評価した。重症例では、血液の pH 値が約 7.0 まで低下する。Kinexa の親和性測定法を用いて評価した結果、pH 範囲 6.7~8 の間で結合親和性の明らかな低下は認められなかった (表 2.1: 2), [CTD 4.2.1.1-08_n00231289]。

表 2.1: 2 ダビガトランとイダルシズマブの結合親和性の pH 依存性（各親和性実験の K_D 値及び適合曲線の 95%信頼区間を示す）

pH	6.7	7.4	8.0
Binding affinity (K_D , pM)	9	4	1
95% CI	(7-12)	(3-5)	(0.6-2)

イダルシズマブのダビガトラン結合部位について、X 線結晶構造解析を用いて特性評価を行った結果、この結合部位には、トロンビン活性部位とよく似た複数の構造的特徴があることが明らかになった [CTD 4.3-03_P13-05131]。ダビガトランは、イダルシズマブの軽鎖と重鎖の間の界面にある溝でイダルシズマブと結合する (図 2.1: 1)。ダビガトランとイダルシズマブの結合親和性が高い理由は、ある 1 つの特異的相互作用ではなく、2 つの分子間の一連の塩橋及び水素結合による相互作用に起因すると考えられる。

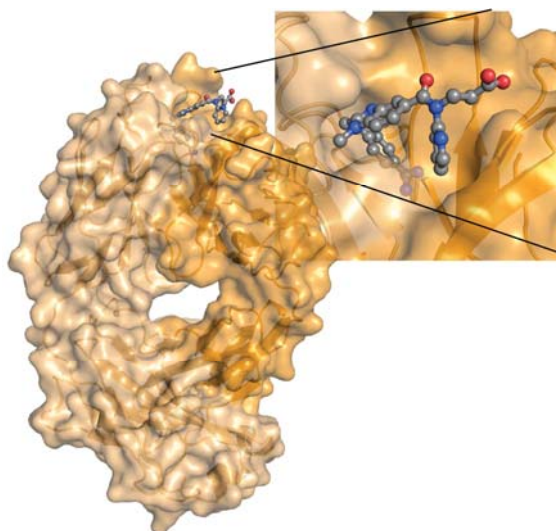


図 2.1: 1 X 線結晶構造解析法を用いて検討したダビガトラン結合部位（拡大表示したイダルシズマブ結合ポケット内にダビガトランを stick 表示で示す）。結合部位はイダルシズマブの重鎖と軽鎖の間に位置する。

イダルシズマブの軽鎖と重鎖の間に形成された溝にダビガトランが結合している様子を surface 表示で図 2.1: 2A 及び 2.1: 2B に示す。この図から明らかなように、イダルシズマブに結合した状態ではダビガトラン分子の約 22%が露出しているが、大部分はイダルシズマブの溝に包み込まれている。露出した部分は、プロピオン酸部分とピリジン環から構成されるダビガトランの末端部位であり、イダルシズマブに結合したときにこの末端部位が著しく突出することはない (図 2.1: 2A)。この結合の様子はトロンビンに結合したダビガトランと同様であり (図 2.1: 2C)，よく似た溶媒接触可能表面積を有している。

グルクロン酸抱合化されたダビガトランのトロンビン及びイダルシズマブに対する結合も同様である。ダビガトランに比べて、グルクロン酸抱合化部分が複合体からわずかに延びた形になっている（34%の露出）が、依然大部分はイダルシズマブの溝に包み込まれている。したがって、イダルシズマブと複合体を形成した際のダビガトラン及びダビガトラングルクロン酸抱合体の血漿又は表面への曝露は極わずかである。

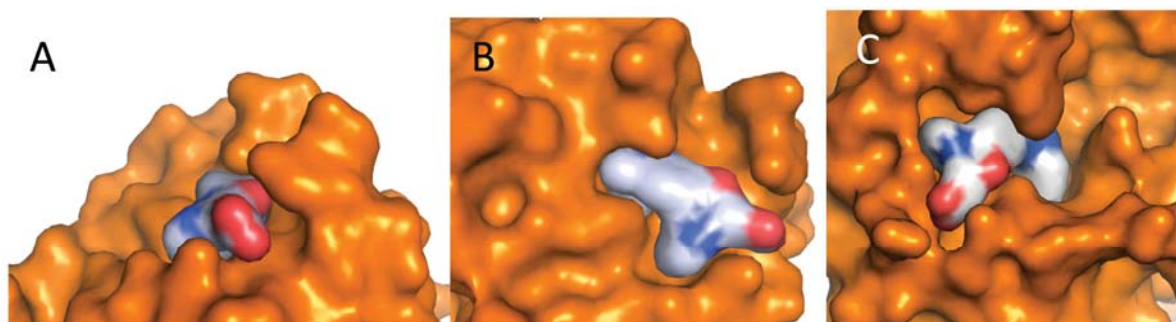


図 2.1: 2 ダビガトラン - イダルシズマブ複合体 (A 及び B) 並びにダビガトラン - トロンビン複合体 (C) の surface 表示。Fab 表面からの血漿曝露は極わずかであり、トロンビンに結合した場合と類似していることを示す。

X 線結晶構造解析から得られた構造を surface 表示し、イダルシズマブ、トロンビン及びダビガトランの大きさの差を図 2.1: 3 に示す [CTD 4.3-03_P13-05131]。矢印はこれら 2 種類の基質に対するダビガトランの相対的会合及び解離速度の概算を示している。

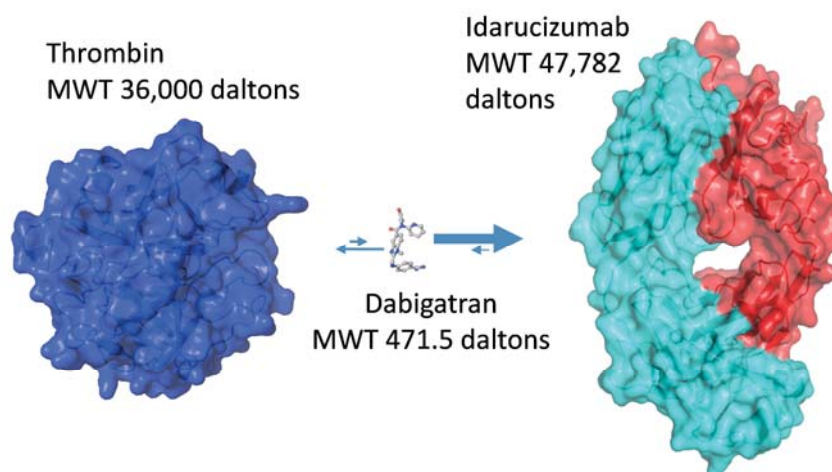


図 2.1: 3 トロンビン、イダルシズマブ及びダビガトランの相対的大きさを示した surface 表示。ダビガトランのトロンビン及びイダルシズマブに対する相対的な会合及び解離速度を矢印で示す。

2.2 ダビガトランの抗凝固作用に対するイダルシズマブの *in vitro* 阻害作用

2.2.1 ヒト血漿及び全血中での阻害

改良化トロンビン時間 (modified thrombin time) アッセイを用いて、ヒト血漿中でイダルシズマブがダビガトランに結合し、ダビガトランの抗凝固作用を阻害する能力を *in vitro* で測定した [CTD 4.2.1.1-12_n00232054]。トロンビン時間 (TT) を約 40 秒間延長させるダビガトラン濃度 (7 nM) を使用し、この値を 100% に設定するとともに (図 2.2.1: 1), ダビガトラン非存在下でのベースライン凝固時間を 0% に設定した。次に、ダビガトランを含む血漿に複数濃度のイダルシズマブを添加し、凝固時間を測定した。ダビガトランの抗凝固作用に対するイダルシズマブの中和効果の IC_{50} 値は 3.1 nM であった (図 2.2.1: 1A)。また、30 nM のダビガトランを添加したヒト全血及び血漿を用いた追加の *in vitro* 試験を実施した (図 2.2.1: 1B)。これらの試験から、ダビガトランの抗凝固作用に対する中和効果は全血中と血漿中で同程度であり (IC_{50} 値はそれぞれ 11.29 nM 及び 10.85 nM), 血液中のほかの成分に対する非特異的結合はわずかであることが示された [CTD 4.2.1.1-12_n00232054]。さらに、いずれの場合にも、 IC_{50} 値は各アッセイ系でのダビガトラン総濃度 (図 2.2.1: 1A : 7 nM 及び図 2.2.1: 1B : 30 nM) の約半分を示し、それぞれの試験において、イダルシズマブ濃度 7 nM 及び 30 nM ではダビガトラン総濃度 7 及び 30 nM によって生じた抗凝固作用がほぼ完全に消失した。したがって、ダビガトランとイダルシズマブの間の 1 : 1 の化学量論的關係が推察された。

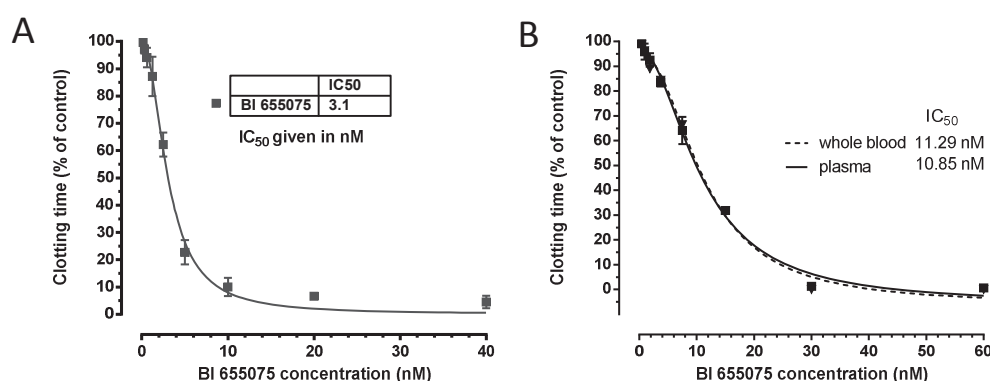


図 2.2.1: 1 ダビガトラン 7 nM を添加したヒト血漿中 (A), 並びにダビガトラン 30 nM を添加したヒト血漿及び全血中 (B) でのダビガトランの抗凝固作用に対するイダルシズマブの中和効果。(平均値 $\pm$ SEM, n=3~4)

ヒトでは、ダビガトランの約 20% が複数のアシルグルクロン酸抱合体の形で存在し [CTD 1.13.1], これらの代謝物は未変化体と同程度の抗凝固作用を示す。そこで、ダビガトラングルクロン酸抱合体をサル (アカゲザル) の尿から単離し、イダルシズマブがこれらのダビガトラングルクロン酸抱合体に対して中和効果を示すかどうか検討した。同様に、TT を約 40 秒間延長させる濃度のダビガトラングルクロン酸抱合体 (10 nM) を血漿に添加したとき、約 10 nM のイダルシズマブによって、ダビガトラングルクロン酸抱合体の抗凝固作用は未変化ダビガトランと同程

度に中和され、 IC_{50} 値は 2.4 nM であった [CTD 4.2.1.1-12_n00232054]。したがって、ダビガトラングルクロン酸抱合体とイダルシズマブの間にも 1:1 の化学量論的關係が推察された。このように、イダルシズマブはダビガトラン及びその活性代謝物の両方を等しい有効性で阻害することが明らかになった。

2.2.2 イダルシズマブによる創傷部位へのフィブリン及び血小板沈着の回復

イダルシズマブがダビガトランに結合し、その抗凝固活性を中和することにより、止血系が正常に戻るかどうか明らかにするため、ヒト血液にダビガトランを添加し、損傷血管表面上での血栓形成に対するイダルシズマブの影響を *in vitro* で評価した。被験者 11 名から血液を採取し、環状チャンバーを通して灌流することにより、血栓形成基板としての損傷血管セグメント（内皮細胞を剥離したウサギ大動脈）にこの血液を曝露した [CTD 4.2.1.1-14_n00237740]。灌流試験をせん断速度 600 s^{-1} で 10 分間実施した後、光学顕微鏡を用いて、損傷血管上に沈着したフィブリン及び血小板量を定量した。

血液にダビガトラン (184 ng/mL, 390 nM) を添加したとき、灌流した損傷内皮下層上のフィブリン被覆率が約 86% 有意に減少した (ダビガトラン群: $9.5 \pm 1.3\%$, 対照群: $67.2 \pm 9.8\%$, $p < 0.01$) (図 2.2.2: 1)。このフィブリン被覆率の減少と一致して、内皮下層に沈着した残存フィブリン塊の断面積が 90% 以上減少した (ダビガトラン群: $26 \pm 3.1\text{ }\mu\text{m}^2$, 対照群: $314 \pm 74\text{ }\mu\text{m}^2$, $p < 0.01$)。また、血小板による血管被覆率も約 35% 減少した (ダビガトラン群: $16.9 \pm 2.9\%$, 対照群: $25.9 \pm 2.7\%$, $p < 0.01$)。無処置血液に最高濃度のイダルシズマブを添加しても、損傷血管上へのフィブリン及び血小板沈着に変化が生じなかったことから、血液中のイダルシズマブは凝固系に影響しないことが示された。

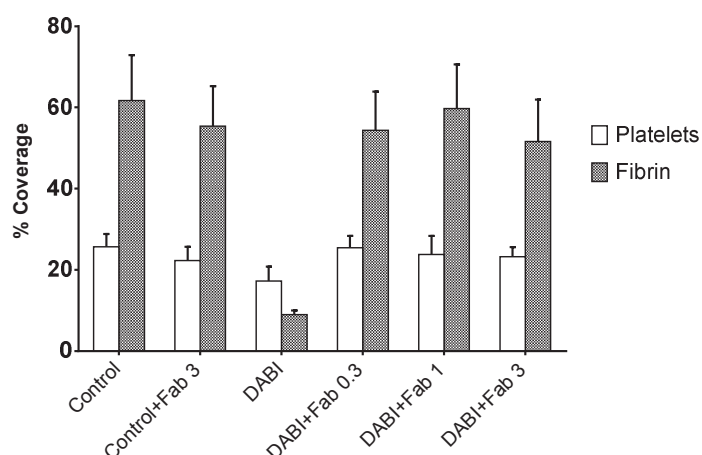


図 2.2.2: 1 種々の処置群におけるフィブリン及び血小板による血管被覆率。ダビガトラン (DABI) 濃度は 184 ng/mL であり、イダルシズマブ (Fab) 濃度は mg/mL で示す。(平均値 $\pm$ SEM, n=11)

あらかじめダビガトランを濃度 184 ng/mL (390 nM) になるように添加した血液にイダルシズマブを濃度 0.3, 1 又は 3 mg/mL (6300, 21000 又は 63000 nM) になるように添加すると、検討し

た 3 濃度のいずれにおいても、ダビガトラン無添加の対照血液で認められた初期値までフィブリン被覆率及びフィブリン塊の断面積が回復した（フィブリン被覆率%の場合 $p < 0.01$ ，フィブリン塊の平均断面積の場合 $p < 0.05$ ）。なお、添加したダビガトラン濃度は、患者に DE150 mg を 1 日 2 回投与したときに達成される最高血漿中濃度とほぼ等しい [CTD 4.3-02_P10-03790]。

上記の結果はイダルシズマブの作用機序と一致していた。最低添加濃度の 0.3 mg/mL でもモルベースで過剰量のイダルシズマブが存在することから、ダビガトランの抗凝固活性に対する最大の中和効果が得られた。さらに、1 mg/mL は臨床で予想される最高血漿中濃度（血液量が約 5 L とすると、5 g 投与は 1 mg/mL に相当する）であることから、臨床に外挿できうる濃度と考えられた。

無処置血液を灌流した損傷血管セグメントのフィブリン及び血小板被覆を示した代表的顕微鏡画像を図 2.2.2: 2A に示す。濃度 184 ng/mL になるようにダビガトランを添加した血液を灌流した場合のフィブリン沈着阻害を図 2.2.2: 2B に示すように、血小板沈着領域が依然として見えるが、フィブリン沈着は阻害されている。ダビガトラン濃度 184 ng/mL の血液にさらにイダルシズマブを添加して灌流すると、図 2.2.2: 2C に示すように、ダビガトラン単独処置（イダルシズマブ無処置）群に比べて、損傷血管上で止血作用の回復が認められた。

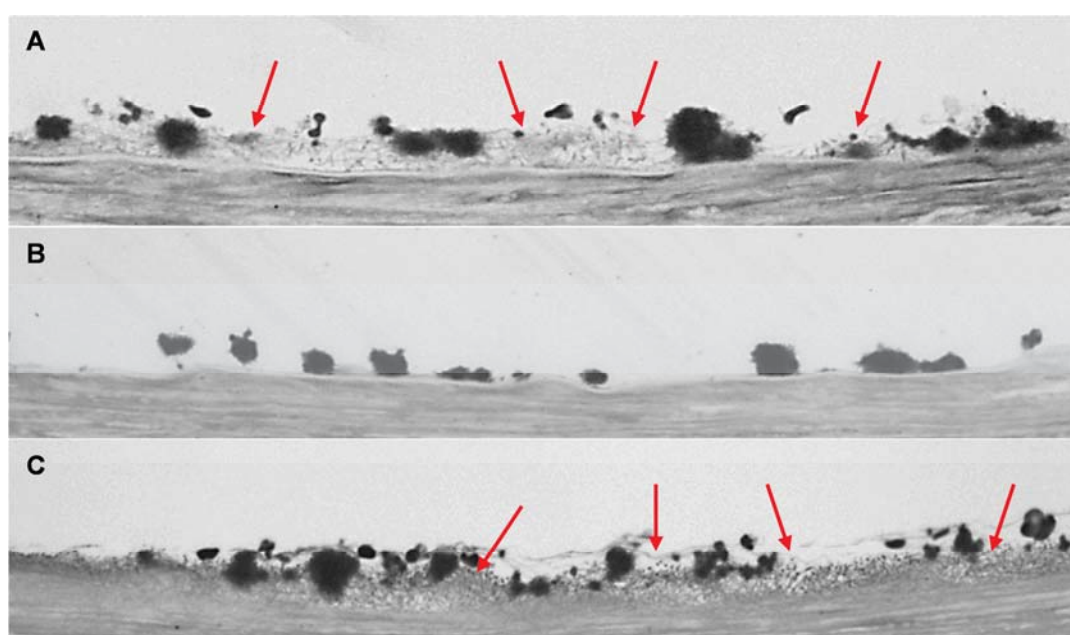


図 2.2.2: 2 灌流血管断面上での血小板及びフィブリン相互作用（赤色矢印）を示した代表的光学顕微鏡画像。(A) 対照群，(B) ダビガトラン処置群 (184 ng/mL)，(C) ダビガトラン (184 ng/mL) 及びイダルシズマブ処置群（フィブリン及び血小板沈着が無処置対照試料で認められたレベルにまで回復）

2.3 他のトロンビン基質に対するイダルシズマブの結合

イダルシズマブとトロンビンには複数の構造的類似性があるため、イダルシズマブにトロンビンと類似した結合特性又は酵素活性があるかどうかを *in vitro* で検討した [CTD 4.3-03_P13-05131]。

はじめに、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、第 V 因子、第 XIII 因子、プロテイン C、フォン・ヴィレブランド因子 (vWF)、S-2238 (トロンビンの特異的基質)、10% プール血漿 (n=6)、ダビガトラン、及び第 V 因子、第 VIII 因子、第 XIII 因子、プロテイン C、フィブリノーゲン、プロテアーゼ活性化受容体 1 (PAR1) の既知トロンビン切断部位を有するペプチドを含むその他のトロンビン基質に対するイダルシズマブの結合能を測定した (図 2.3: 1)。生理学的濃度のトロンビン基質 (S-2238 及びダビガトランは 1 μ M) を 60 秒間にわたり注入した後、120 秒間の解離時間を設けた。これらの結果、ダビガトランを除いて、イダルシズマブはこれらのトロンビン基質に結合しなかった [CTD 4.2.1.1-08_n00231289, CTD 4.3-03_P13-05131]。

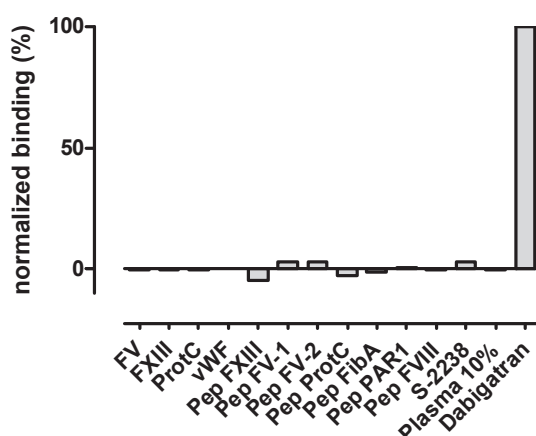


図 2.3: 1 イダルシズマブの様々なトロンビン基質に対する結合に関する SPR 評価。注入時間 60 秒、解離時間 120 秒とし、データを補正結合率として示す。F=因子、Pep=活性化ペプチド

追加の SPR 試験を実施し、ヒト血清アルブミン及びその他のヒト血漿タンパク質に対してイダルシズマブ - ダビガトラン複合体とイダルシズマブ単独で異なる結合プロファイルを示すかどうか検討した。イダルシズマブ - ダビガトラン複合体とイダルシズマブ単独の比較評価が行えるように過剰量のダビガトラン存在下又は非存在下でイダルシズマブの結合プロファイルを測定した。これらの結合プロファイルの測定試験では、個々の実験において、10 nM までの様々な濃度のダビガトランを、4.5 pM から 100 pM の間の異なる濃度のイダルシズマブとインキュベートした。その結果、ヒト血清アルブミン及び他のヒト血漿タンパク質に対する複合体の結合はみられなかった (図 2.3: 2)。したがって、血漿中での複合体の結合挙動はイダルシズマブ単独と同様であると考えられた [CTD 4.2.1.1-08_n00231289]。

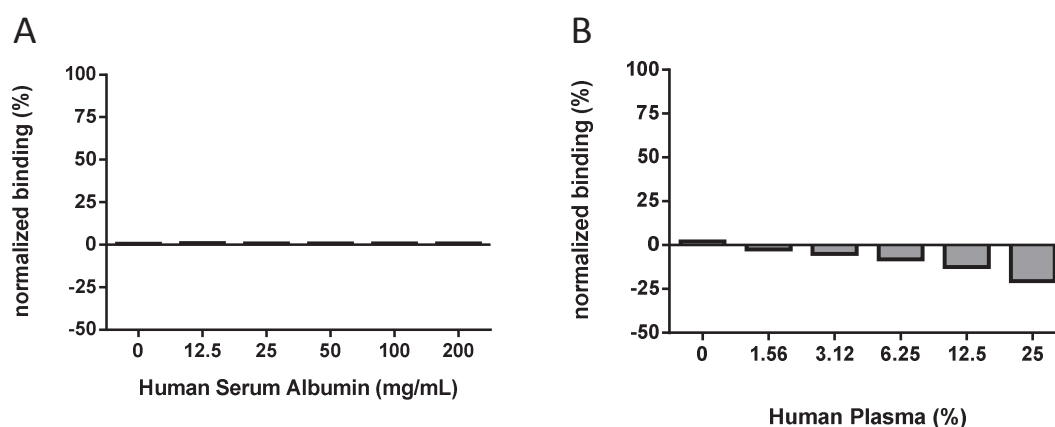


図 2.3: 2 イダルシズマブ - ダビガトラン複合体の (A) ヒト血清アルブミンに対する結合, (B) ヒト血漿タンパク質に対する結合に関する SPR 評価。注入時間 15 秒, 解離時間 300 秒とし, データを補正結合率として示す。

次に, 種々の凝固試験法を用いて, ヒト血漿中におけるイダルシズマブのダビガトラン結合部位のトロンビン様酵素活性を測定した [CTD 4.3-03_P13-05131, CTD 4.2.1.1-07_n00233139]。

(1) フィブリノーゲンからフィブリンへの変換: フィブリノーゲンの活性化の過程でフィブリノペプチド A (FPA) が遊離することから, イダルシズマブによるフィブリノーゲンからフィブリンへの変換能を FPA 生成として測定した。イダルシズマブをカルシウム再添加血漿に加えても FPA 濃度は上昇しなかったが (図 2.3: 3A), 少量のトロンビン (0.1~5 pM) をカルシウム再添加血漿に添加すると FPA 濃度が上昇した [CTD 4.3-03_P13-05131, CTD 4.2.1.1-07_n00233139]。

(2) プロトロンビン除去血漿: プロトロンビン除去血漿に添加して凝固を誘導することが可能な正常血漿の最大希釈倍率は 1 : 8 (プロトロンビン濃度約 0.013 mg/mL) であり, この希釈により, 凝固時間が 22.3 ± 0.8 秒から 52.4 ± 3 秒へと 2 倍になった (図 2.3: 3B, 点線及び灰色網掛け部分, 平均値 $\pm$ SD)。最高 0.1 mg/mL までのプロトロンビンを添加することで, 凝固作用が回復した。イダルシズマブ (最高 3 mg/mL まで) を 0.013 mg/mL プロトロンビン濃度の血漿に添加しても凝固時間は短縮されなかったことから, イダルシズマブはフィブリノーゲンを直接活性化しないことが示された [CTD 4.3-03_P13-05131, CTD 4.2.1.1-07_n00233139]。

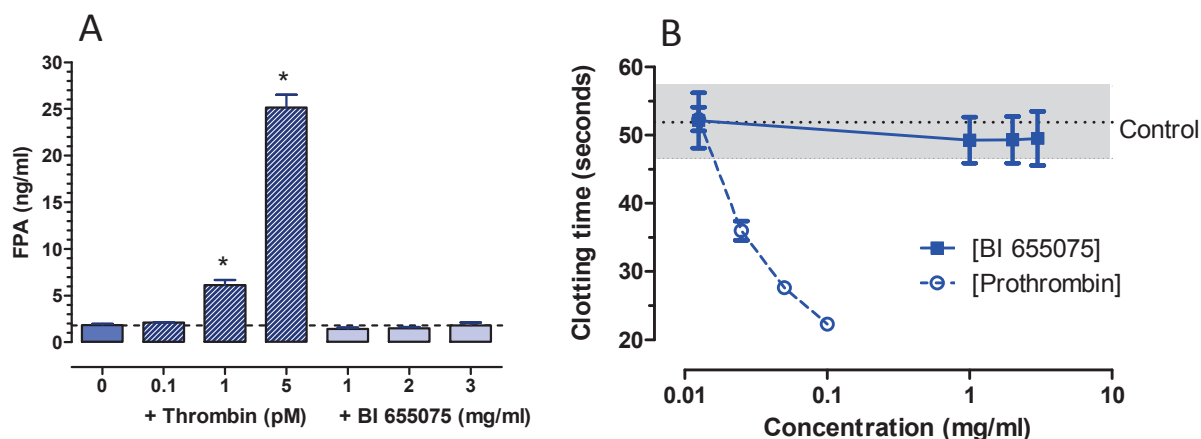


図 2.3: 3 (A) ヒト血漿にイダルシズマブ (BI 655075) 又はトロンビンを添加したときの FPA 遊離に対する影響。(平均値±SD, n=3) *p<0.001 (B) プロトロンビン除去血漿にイダルシズマブ (BI 655075, ■) 及びプロトロンビン (○) を添加したときの凝固時間の比較 (平均値±SD, n=3)

(3) トロンビン生成：血漿にイダルシズマブを添加し、活性型凝固因子濃縮製剤である第 VIII 因子抗体迂回活性複合体 (Feiba®) を陽性対照として、トロンビン生成を比較評価した。トロンビン生成は較正自動化トロンボグラム (CAT) を用いて実施した。血漿にイダルシズマブを濃度 3 mg/mL まで添加しても、対照血漿と比較してトロンビン生成が増加することはなかったが (図 2.3: 4A), Feiba®は対照血漿に比べてピーク トロンビン生成を約 2 倍に上昇させた [CTD 4.3-03_P13-05131, CTD 4.2.1.1-07_n00233139]。

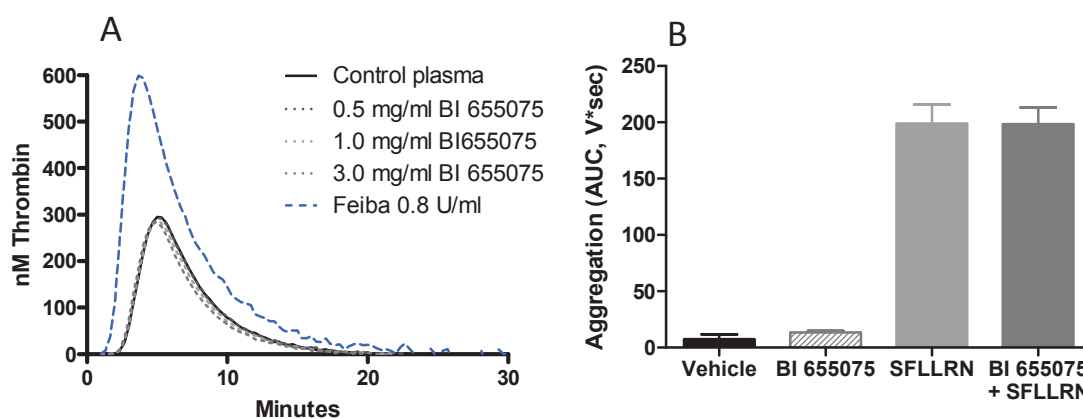


図 2.3: 4 (A) 内因性トロンビン生成に対するイダルシズマブの影響を対照血漿と比較した。陽性対照では Feiba を添加した。(B) 血小板凝集に対する 3 mg/mL イダルシズマブ (BI 655075) の影響を PAR-1 アゴニストである SFLLRN と比較した。(平均値±SD, n=3)

(4) 血小板凝集：光透過型血小板凝集能測定法を用いて、ヒト多血小板血漿（PRP）における血小板凝集を測定した [CTD 4.3-03_P13-05131, CTD 4.2.1.1-07_n00233139]。健康被験者 3 名の前肘静脈から血液を採取し、PRP に処理した。各 PRP 試料に 5 mM CaCl₂ 及び 3 mg/mL イダルシズマブ（最終濃度）を添加した。特異的 PAR-1 アゴニストである SFLLRN（最終濃度 2 µM）を陽性対照として使用し、血小板凝集を誘導した（図 2.3: 4B）。イダルシズマブを添加しても血小板凝集に対する影響は認められず、同様に、SFLLRN を添加する前にイダルシズマブと PRP をインキュベートしても、SFLLRN 単独と比較して、血小板凝集反応に影響はみられなかった（図 2.3: 4B）。したがって、イダルシズマブは血小板に対してトロンビン様活性を示さないことが明らかになった。

以上の結果より、これらの *in vitro* 試験において、イダルシズマブが血漿又は血小板に対して、トロンビン様酵素活性により血栓形成促進作用を示さないことが明らかになった。さらに、イダルシズマブのダビガトラン結合部位とトロンビン活性部位の間で構造的類似性があるにもかかわらず、他のトロンビン基質に対するイダルシズマブの結合は認められなかった。

2.4 イダルシズマブの *in vivo* 評価

2.4.1 *in vivo* での抗凝固活性の中和

サル（アカゲザル）及びラット（CrI:WI(HAN)）を用いて、ダビガトランの抗凝固作用に対するイダルシズマブの中和効果を *in vivo* で評価した。

サル（アカゲザル）においては、非臨床 PK/PD 試験の結果から、イダルシズマブはダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の抗凝固活性を中和した [CTD 2.6.4_3.2.4 及び 3.3.4 項]。

ラット（CrI:WI(HAN)），雄，約 300 g，4~10 例/群）においては、ダビガトランを 0.3 µmol/kg 静脈内投与後、0.1 µmol/kg/hr の速度で静脈内持続投与したとき、本薬を投与する直前の血漿中濃度は 196-200 ng/mL (416-423 nM) に達した。ダビガトランはトロンビン時間（TT）をベースラインである 23 秒から約 4 倍の約 90 秒に延長させた（図 2.4.1: 1A）。時間 0 に等モル用量（0.314 µmol/kg）のイダルシズマブを単回静脈内投与したとき、1 分以内にダビガトランの抗凝固作用をベースラインにまで回復させた（図 2.4.1: 1A, ▲）。イダルシズマブの単回静脈内投与によるこの中和効果は、ダビガトランを静脈内持続投与した 30 分間にわたり維持され、1 : 1 の化学量論的作用機序と一致していた [CTD 4.2.1.1-03_n00226711]。

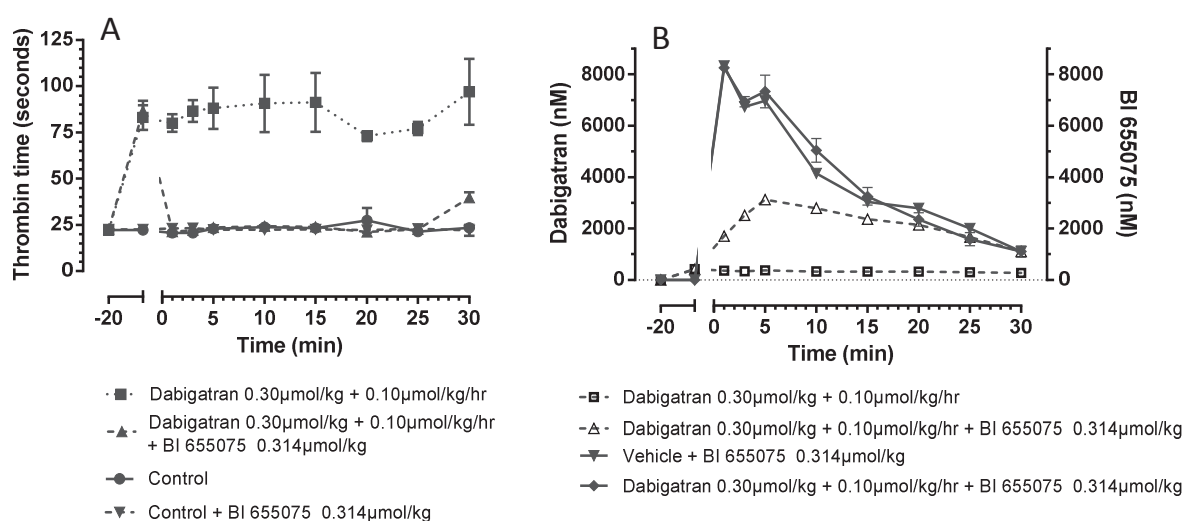


図 2.4.1: 1 (A) 時間 0 にイダルシズマブ (BI 655075) を投与した後のトロンビン時間で評価したダビガトラン活性の中和効果 (平均値±SEM, n = 4~8)
(B) 対応する血漿中ダビガトラン濃度 (破線) を左軸に, 血漿中イダルシズマブ (BI 655075) 濃度 (実線) を右軸に示す (平均値±SEM, when n ≥ 2)

血漿中の総ダビガトラン濃度 (LC-MS/MS 法) 及びイダルシズマブ濃度 (ELISA 法) を測定した (図 2.4.1: 1B)。イダルシズマブ非存在下での血漿中ダビガトラン濃度は約 300 nM であった。イダルシズマブ存在下ではダビガトラン濃度が約 10 倍上昇して約 3000 nM になったが, トロンビン時間の図に示すように (図 2.4.1: 1A), このダビガトランに伴う抗凝固作用は認められなかった。これより, ダビガトランがイダルシズマブに結合することにより, 不活性化された可能性が示唆された。

ダビガトランの分布容積は約 0.6 L/kg であり [CTD 2.6.4_3.1 項], 血管外コンパートメントと血液コンパートメントの両方に分布するのに対して, イダルシズマブの分布は主に血液 (血漿) コンパートメントに限定されていた。このことから, イダルシズマブ存在下で血漿中ダビガトラン濃度が上昇したのは, ダビガトランの平衡に変化が生じたためと推察される。つまり, 血漿中のダビガトランがイダルシズマブに結合すると, 新たな平衡状態を保とうとして, 血管外コンパートメントのダビガトランが血液コンパートメントへと移行する。血中に非結合型イダルシズマブが存在する限りこの過程が継続するが, すべてのイダルシズマブ分子にダビガトランが結合すると, 残りの非結合型ダビガトランが血液コンパートメントと組織コンパートメントの間で再び平衡状態に達する。これにより, 等モル用量を下回る (すなわち, ダビガトランの総身体負荷量と等モル未満の) イダルシズマブを投与したときに, 血漿中に低濃度のダビガトランが再出現することが説明できると考えられる。このメカニズムにより, ダビガトランが組織中から血漿中へと移行するため, 血漿中だけでなく組織中のダビガトランの抗凝固作用も結果的に中和されると考えられる。

イダルシズマブ濃度はダビガトラン存在下と非存在下で同程度であり、最高血漿中濃度は総ダビガトラン濃度の約 2 倍を超える約 7000 nM に達した。この濃度はわずか 30 分以内に約 1000 nM まで低下したことから、イダルシズマブ - ダビガトラン複合体は血漿中から速やかに消失することが示された [CTD 4.2.1.1-03_n00226711]。

2.4.2 種々の出血モデルにおけるダビガトランに関連する出血の回復

2.4.2.1 ラットにおける出血時間の回復

ダビガトランに関連する出血に対するイダルシズマブの影響についても検討した。ラット (CrI:WI(HAN), 雌雄, 約 250 g, 6~8 例/群) に DE を 30 mg/kg の用量で経口投与し、血漿中ダビガトラン濃度が最高値に達する時間に近い 45 分後 (t=0) に、イダルシズマブを 33 mg/kg (0.69 μ mol/kg) の用量で単回静脈内投与した (図 2.4.2.1: 1)。イダルシズマブ投与 5, 15, 30, 120 分後に、ラット尾部に標準的切開処置を行い、止血に要する時間を測定することにより、動物の出血時間を測定した [CTD 4.2.1.1-04_n00227451]。

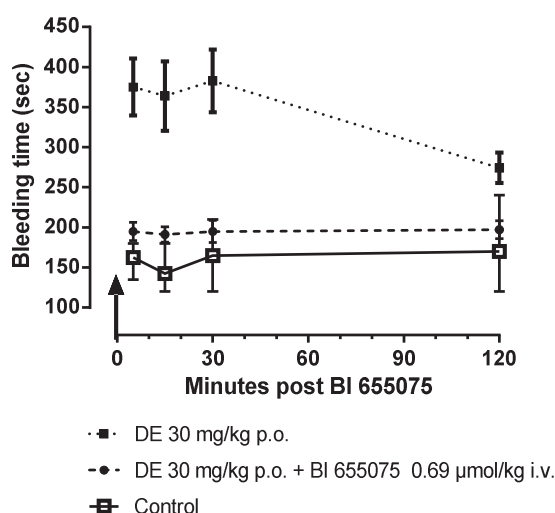


図 2.4.2.1: 1 ラット尾部切開モデルにおけるダビガトランの出血に対する影響及びイダルシズマブ (BI 655075) による中和効果。無処置動物 (対照) の出血時間を実線で示す。矢印はイダルシズマブの投与を示す。(平均値 $\pm$ SEM, n = 6~8)

イダルシズマブ投与直前の血漿中ダビガトラン濃度は 562 ng/mL (約 1200 nM) に達した。この濃度は、臨床で用量 150 mg を 1 日 2 回投与したときに達成される最高血漿中濃度に比べて約 3 倍高かった [CTD 4.3-02_P10-03790]。図 2.4.2.1: 1 の上部の破線は用量 30 mg/kg の DE を経口投与したときの出血時間の延長を示し、下部の実線 (対照) は無処置時のベースラインにおける出血時間を示す。イダルシズマブを 0.69 μ mol/kg (33 mg/kg) の用量で単回静脈内投与すると、最初の時点である投与 5 分後には出血時間がベースラインレベルまで短縮され、投与 15, 30 及び 120 分後に新たな切開処置を行った場合にも、この中和効果が維持された。

血漿中ダビガトラン濃度は、希釈トロンビン時間 (dTT) を用いて凝固時間として測定した。凝固時間を凝固時間－添加ダビガトラン濃度の検量線によりダビガトラン濃度に変換した。したがって、得られた血漿中活性型ダビガトラン濃度は、ダビガトランの抗凝固活性を示す (図 2.4.2.1: 2A)。実線は、ラットに DE を経口投与したときの血漿中活性型ダビガトラン濃度－時間推移を示す。イダルシズマブを静脈内投与すると (図 2.4.2.1: 2A の矢印)、投与 5 分後にダビガトランの抗凝固活性が阻害されたが、投与 15 分後には約 80 nM (約 40 ng/mL) の低濃度になり、投与後 2 時間にわたり維持された。この低濃度による出血時間の延長は認められなかった (図 2.4.2.1: 2A)。このパターンは、活性化部分トロンボプラスチン時間 (aPTT)、トロンビン時間 (TT) 及びエカリン凝固時間 (ECT) を含む測定したすべての抗凝固パラメータにおいて一貫していた [CTD 4.2.1.1-04_n00227451]。

血漿中総ダビガトラン濃度 (ダビガトラン及びその活性代謝物の合計濃度であり、遊離型及び結合型 (イダルシズマブ又は血漿タンパク質に結合) の両方が含まれる) は、イダルシズマブ投与 5 分前の 1309 nM から、イダルシズマブ投与 5 分後には 7184 nM, 15 分後には 3544 nM に上昇した (図 2.4.2.1: 2B)。この結果からも、血中のダビガトランがイダルシズマブに結合し不活性化されると、血管外コンパートメントから血液コンパートメントへとダビガトランが移行して新たな平衡状態に達することが示された。この反応は速やかであり、その後、ダビガトラン及びイダルシズマブはほぼ並行して血漿から消失した (図 2.4.2.1: 2B)。

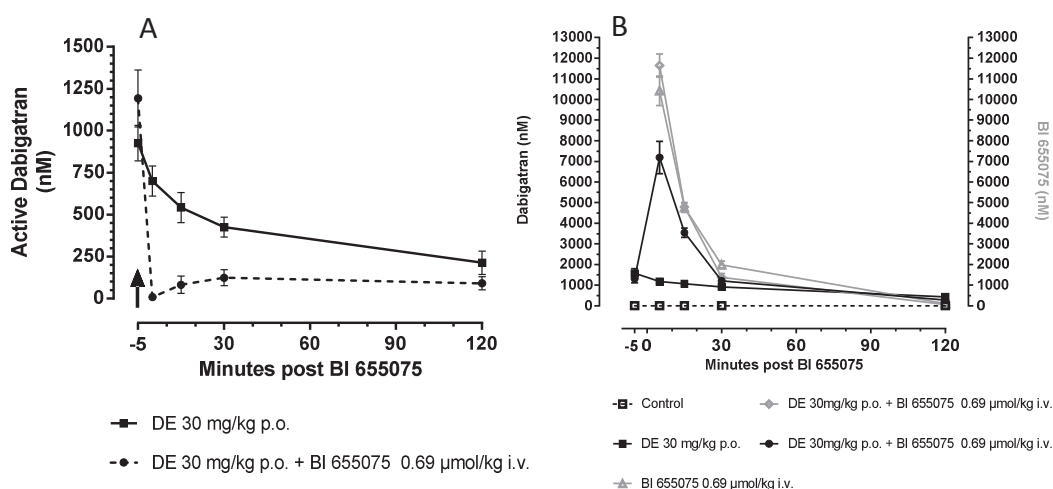


図 2.4.2.1: 2 (A) ラットにおける血漿中活性型ダビガトラン濃度。(B) 同じ動物における総ダビガトラン (黒線) 及びイダルシズマブ (BI 655075, 灰色直線) の血漿中濃度。(平均値±SEM 又は SD, n = 2~8)

2.4.2.2 治療域を超えるダビガトラン濃度下のブタ鈍的外傷モデル

重度のブタ外傷モデルを用いて、ダビガトランを用いた抗凝固療法下での外傷性出血に対するイダルシズマブの中和効果を検討した [CTD 4.3-19_R14-3528, CTD 4.2.1.1-11_n00231240]。

ブタ (Landrace, 雄, 約 42 kg, 6 例/群) に DE (30 mg/kg Pradaxa[®] カプセル) を 1 日 2 回 3 日間経口投与した後, 4 日目に麻酔下で外科的処置を行い, ダビガトランを 90 分間の静脈内持続投与 (0.77 mg/kg/h で 30 分間, 0.52 mg/kg/h で 60 分間, 総静脈内投与量 0.905 mg/kg) により投与し, 治療域を超える濃度とした。その後, 規定圧力で肝中葉を特殊鉗子でクランプすることにより, 標準的な鈍的肝外傷を誘起した。次いで, 開腹部を閉じ, 創傷部に加わる圧力を維持することで, 12 分間にわたり損傷部から出血させて出血性ショックを誘発した。唯一の介入として, 5 分後にリンゲル液 (約 1 L 急速投与後, 40 mL/kg/hr 持続投与) を用いる処置を行い, 血圧を維持した。外傷誘起約 12 分後に出血量を記録した後, 3 用量 (30, 60, 120 mg/kg) のイダルシズマブ又は溶媒のいずれかを投与する群に動物を無作為割付けした。その後, 4 時間又は死亡まで, 経時的に血液試料を採取し, 経時的に出血量をモニターした。動物の全血液量は約 3 L であった。

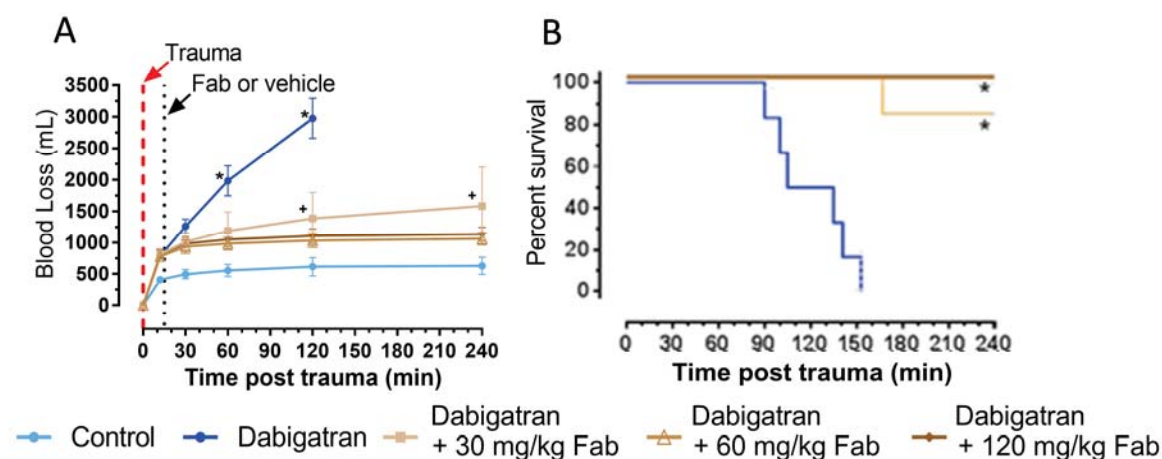


図 2.4.2.2: 1 A: イダルシズマブ (Fab) 又は溶媒 (15 分間) 投与後の累積出血量 (mL)。時間 0 分 (赤色破線) に外傷を誘起した。(平均値±SD, n = 6) *イダルシズマブとの比較で $p < 0.001$, +対照との比較で $p < 0.01$
B: 外傷誘起後 4 時間にわたる Kaplan Meier 生存率曲線。*ダビガトランとの比較で $p < 0.0001$

dTT により測定した血漿中ダビガトラン濃度は治療域を超えていた。鈍的肝臓外傷誘起直前及びイダルシズマブ投与直前の血漿中ダビガトラン濃度 (平均値±標準偏差) は, それぞれ 1090 ± 394 ng/mL (2310 ± 836 nM) 及び 1290 ± 542 ng/mL (2740 ± 1150 nM) であった。ダビガトラン非投与群の出血量は, 外傷誘起後の最初の 12 分間で 409 ± 53 mL であったのに対して, ダビガトラン投与群では約 2 倍に増加して 786 ± 39 mL となった (図 2.4.2.2: 1 A)。ダビガトランを前投与後, イダルシズマブを投与しなかった (溶媒を投与した) ブタでは, 出血量が時間経過に伴って持続的に増加し, 最大出血量は 2977 ± 316 mL に達した。このダビガトラン単独投与群では, 大量出血により, 死亡率は 100% であった (平均生存期間 121 分, 最小値—最大値 90—153 分)。イダルシズマブ 30, 60 及び 120 mg/kg 投与群の出血量は, ダビガトラン単独投与群 (2977 ± 316 mL, $p < 0.001$) に比べて, それぞれ 47% (1586 ± 619 mL), 64% (1065 ± 97 mL) 及び

62% (1140±109 mL) 減少した (図 2.4.2.2: 1 A)。ダビガトランを投与した動物は、イダルシズマブ投与後 15 分以内に止血が誘起され、高用量 2 群 (60 及び 120 mg/kg) では、試験終了時まで止血効果が維持された。30 mg/kg 投与群の出血量は 6 例中 2 例で 1500 mL を超え、1 例が外傷誘起の 167 分後に死亡した。すべてのイダルシズマブ投与群で生存期間が有意に改善され、4 時間の観察期間を通して、60 及び 120 mg/kg 投与群の全動物並びに 30 mg/kg 投与群の 6 例中 5 例 (83%) が生存した (ダビガトラン群との比較で $p<0.0001$) (図 2.4.2.2: 1 B)。

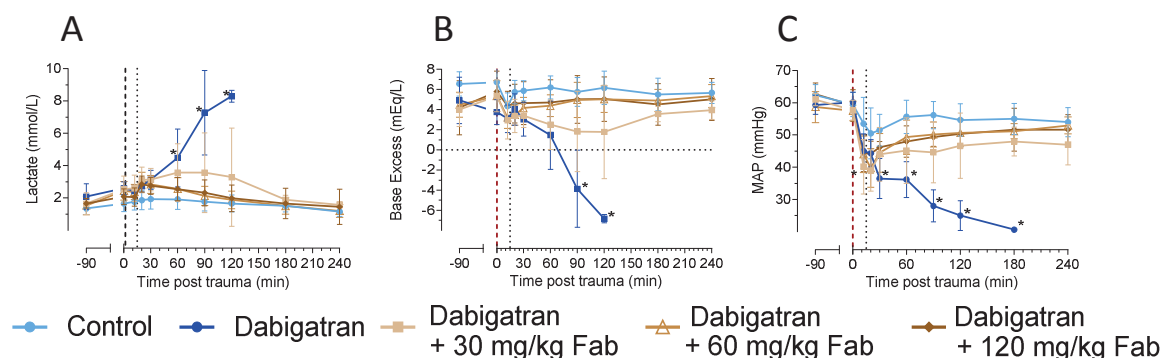


図 2.4.2.2: 2 外傷誘起 (時間 0 分の破線) 後の乳酸濃度 (mmol/L, A), 塩基過剰 (mEq/L, B) 及び平均動脈圧 (MAP, mmHg, C)。点線は外傷誘起 15 分後のイダルシズマブ (Fab) 又はプラセボ投与を示す。

(平均値±SD, n = 6) *イダルシズマブ群との比較で $p<0.001$

ダビガトラン及び外傷に関連する出血の重症度はショックパラメータ (乳酸濃度, base excess (塩基過剰) 及び平均動脈圧) の変化に反映された (図 2.4.2.2: 2A~C)。ダビガトラン単独投与群では、持続的出血に伴って重度のショックが認められ、乳酸濃度の上昇及び base excess の低下 (図 2.4.2.2: 2A, B) 並びにヘモグロビンの減少及び血小板減少がみられた。これに伴って血行動態が不安定となり、心拍出量及び血圧が大きく低下した (図 2.4.2.2: 2C)。一方、複数用量のイダルシズマブを投与した群では、出血量が減少した結果、これらのパラメータは安定した。この効果は高用量 2 群 (60 及び 120 mg/kg) で最も顕著であり、出血量は有意に減少し、平均動脈圧、乳酸濃度及び base excess は 90 分までにベースライン時の外傷誘起前の値で安定化し、4 時間の観察期間終了時まで安定に維持された。

90 分間の静脈内持続投与直後の血漿中ダビガトラン濃度 (1161 ± 372 ng/mL, 2462 ± 788 nM) はすべての群で同程度であった (図 2.4.2.2: 3A)。ダビガトランの抗凝固作用は、イダルシズマブ投与後 5 分以内に速やかに抑制され、4 時間の測定期間を通して血漿中ダビガトラン濃度は用量依存的に低下した。

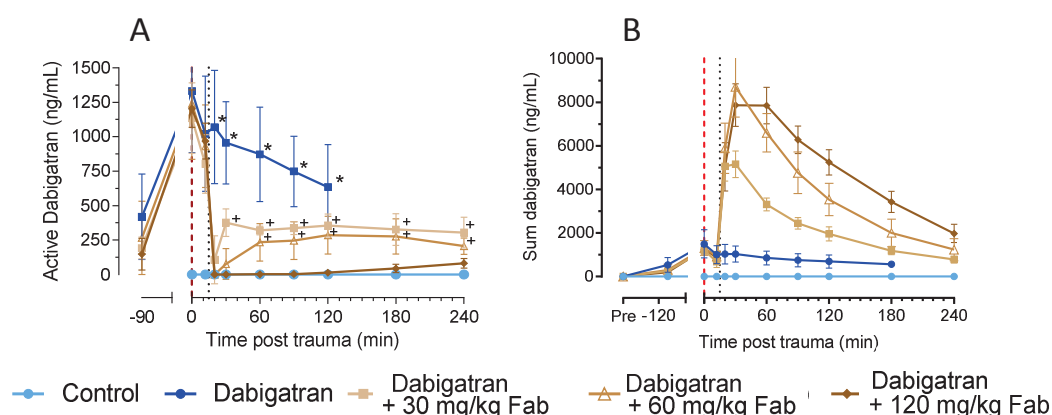


図 2.4.2.2: 3 イダルシズマブ (Fab) 投与後の血漿中ダビガトラン濃度 (ng/mL)。

(A) 活性型ダビガトラン (dTT)。(B) 総ダビガトラン。

(平均値±SD, n = 6)

*イダルシズマブ群との比較で $p < 0.0001$, +偽処置群との比較で $p < 0.001$ 。

イダルシズマブ 30 及び 60 mg/kg 投与群では、ダビガトランの抗凝固作用を完全に中和するのに十分ではなかったが、最高用量である 120 mg/kg 投与群では、4 時間にわたり抗凝固作用がほぼ完全に抑制された。60 mg/kg 投与群ではダビガトランの抗凝固作用の中和が不完全であったにもかかわらず、外傷及びダビガトラン抗凝固療法に関連する出血は停止した。このことから、出血を止めるために必ずしもダビガトランの抗凝固作用を完全に中和する必要はないことが示唆された。

血漿中総ダビガトラン濃度 (図 2.4.2.2: 3B) には、循環血中のイダルシズマブ及び血漿タンパク質に結合した不活性型ダビガトラン及び代謝物並びにすべての活性型ダビガトラン (総ダビガトラン) が含まれる。血漿中総ダビガトラン濃度は、血漿中活性型ダビガトラン濃度に比べて 5 倍以上高く、イダルシズマブ投与 15 分後 (外傷誘起 30 分後) に最高値に達した。この時点における濃度は、ダビガトラン単独投与群で 1030 ng/mL (2180 nM) であり、イダルシズマブ 30, 60 及び 120 mg/kg 投与群でそれぞれ、5060, 8700 及び 7870 ng/mL (10900, 18400 及び 16700 nM) であった (図 2.4.2.2: 3B)。このことから、血漿中総ダビガトラン濃度はイダルシズマブ用量依存的に上昇することが立証されるとともに、血管外コンパートメントから血液コンパートメントへのダビガトランが移行してダビガトランの平衡状態が変化することが明らかになった。注目すべきこととして、最高用量のイダルシズマブは、総ダビガトラン用量とほぼ等モルであった (すなわち、イダルシズマブとダビガトランは分子量に約 100 倍の差があるため、イダルシズマブ 120 mg/kg はモル換算ではダビガトラン 1.2 mg/kg にほぼ等しい。本試験では、ダビガトラン 0.905 mg/kg を 90 分間で投与した)。これより、イダルシズマブとダビガトランがほぼ等モル用量である場合に、試験期間を通して、ダビガトランの抗凝固作用が中和されたことになる。

dTTに加えて (図 2.4.2.2: 3A), ECT, aPTT, 及びトロンボエラストグラフィー (ROTEM) 又は ACT などのポイントオブケア検査 (POCT) を含む種々の分析法により抗凝固作用を測定した (図 2.4.2.2: 4)。作用機序と一致して、血漿中でイダルシズマブがダビガトランに結合し不活性

化することから、いずれの指標についても最高用量のイダルシズマブを投与直後に抗凝固作用がベースラインレベルにまで回復した。分析法毎にダビガトランに対する感受性は異なるが、いずれの分析法についても迅速かつ用量依存的なイダルシズマブによる中和効果が認められた。

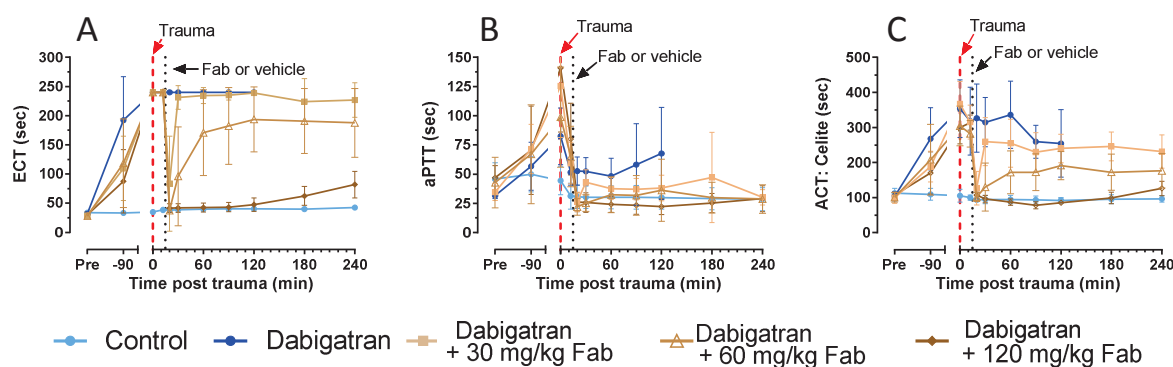


図 2.4.2.2: 4 種々の凝固分析法におけるダビガトランの抗凝固作用及びイダルシズマブによる中和効果

A : ECT, B : aPTT, C : ACT。 (平均値±SD, n = 6)

2.4.2.3 ラット尾部出血モデルにおけるイダルシズマブの分割投与

ダビガトランとイダルシズマブの結合は *in vivo* で速やかに起こり、その複合体も速やかに消失することから、イダルシズマブを1回大量投与するよりも分割投与した方が高い有効性を示すかどうかを、同様のラット尾部出血モデルを用いて検討した。

本試験では、治療域の血漿中ダビガトラン濃度を上回る抗凝固作用下におけるイダルシズマブのダビガトラン中和効果を尾部出血モデルにより検討した。ラット (CrI:WI(HAN), 雌雄, 約 250 g, 3~6 例/群) に DE (30 mg/kg) を 8 時間間隔で 3 回経口投与し、DE 最終投与 45 分後 (t=0) にイダルシズマブを 0.7 及び 1.4 $\mu\text{mol/kg}$ (33 及び 66 mg/kg) で静脈内投与した。イダルシズマブ投与後 5, 15, 30 及び 120 分後に尾部に標準的切開処置を行い、ダビガトランによる出血時間の延長及びイダルシズマブによるダビガトラン中和効果を時間 120 分まで評価した (図 2.4.2.3: 1)。

DE を反復経口投与したとき、血漿中ダビガトラン濃度は $1107 \pm 320 \text{ ng/mL}$ ($2347 \pm 680 \text{ nM}$) に達した。0.7 及び 1.4 $\mu\text{mol/kg}$ (33 及び 66 mg/kg) のイダルシズマブを投与したとき、0.7 $\mu\text{mol/kg}$

(33 mg/kg) 群ではダビガトランにより誘発した出血時間の延長に対してほとんど影響しなかったが、1.4 $\mu\text{mol/kg}$ (66 mg/kg) 群では延長した出血時間がベースラインレベルまで完全に回復した (図 2.4.2.3: 1A)。

さらに、イダルシズマブの総用量 1 回ボラス静脈内投与と 2 回分割ボラス静脈内投与の間で有効性に差が生じるかどうか検討するため、有効量 1.4 $\mu\text{mol/kg}$ (66 mg/kg) を t=0 から 12 分間隔で 2 回に分けて 0.7 $\mu\text{mol/kg}$ ずつボラス静脈内投与した (図 2.4.2.3: 1B の矢印)。いずれの投与法でも出血時間に回復がみられ、同様の抗凝固作用抑制が認められた [CTD 4.2.1.1-05_n00234943]。すなわち、イダルシズマブを 2 回分割投与しても、最終的に得られるダビガトラン中和効果には総用量 1 回投与と差はなかった。

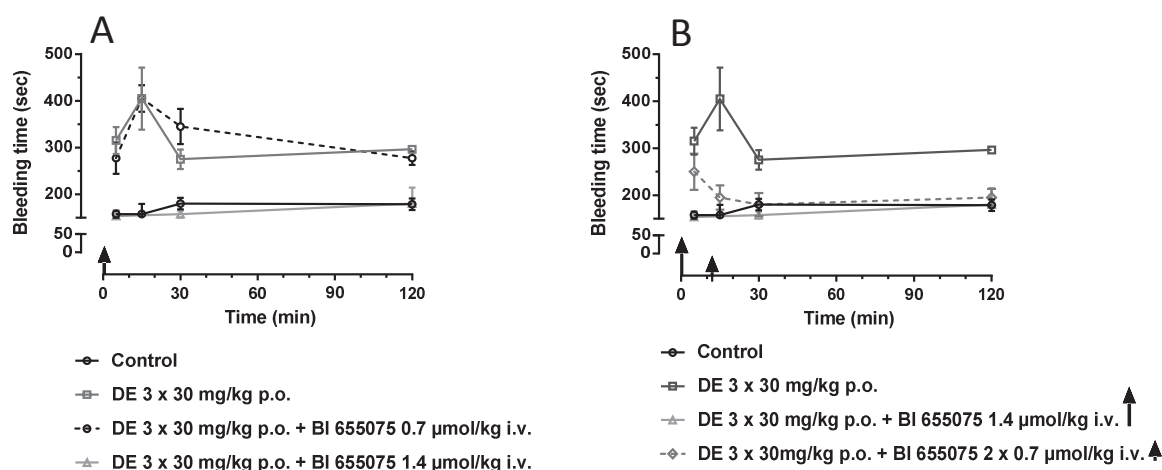


図 2.4.2.3: 1 ダビガトランによって誘発したラット尾部出血時間の延長に対するイダルシズマブの単回（0 分）ボーラス静脈内投与（0.7 µmol/kg 又は 1.4 µmol/kg）又は分割ボーラス静脈内投与（2 x 0.7 µmol/kg）による用量依存的な中和効果（平均値±SEM, n = 3~6）

2.4.2.4 ブタ二重外傷モデルにおけるイダルシズマブの分割投与

ダビガトランを用いた抗凝固療法下でイダルシズマブを単回ボーラス静脈内投与することで出血を十分コントロールできるかどうか、あるいは緊急手術時などで、イダルシズマブを分割投与（最初に半量投与、60 分後に 2 回目の半量投与）した方が効果的であるかどうかをブタ二重外傷モデルで検討した [CTD 4.2.1.1-10_n00238140]。なお、イダルシズマブの用量は、2.4.2.2 項の外傷試験において、60 及び 120 mg/kg 投与により単回外傷後の出血を効果的に抑制できたことに基づいて選択した。この外傷は標準化されたものであり、最初の外傷からの出血とその後の出血を比較できることから、2 回目の外傷を与えることにより、臨床での外科的介入をシミュレートした。

上記の 2.4.2.2 項の外傷試験と同様に、ブタ（Landrace, 雄, 約 39 kg, 6 例/群）に DE（30 mg/kg Pradaxa®カプセル）を 1 日 2 回 3 日間経口投与後、4 日目に麻酔下で外科的処置を行い、ダビガトランを 90 分間静脈内持続投与（0.77 mg/kg/h で 30 分間、0.52 mg/kg/h で 60 分間、総静脈内投与量 0.905 mg/kg）した後、上述したように標準的な鈍的肝外傷を誘起した。その後、開腹部を閉じ、12 分間にわたり外傷部から出血させて出血性ショックを誘発した。外傷誘起 12 分後並びに 30 及び 60 分後に出血量を記録し、外傷誘起 15 分後にイダルシズマブを 60 又は 120 mg/kg の用量で投与した。最初の外傷誘起 60 分後、異なる肝葉に 2 回目の外傷を誘起し、その約 15 分後に 2 回目のイダルシズマブ 60 mg/kg 又は溶媒投与を行った。2 回目の外傷後 4 時間にわたり、出血量を測定した。

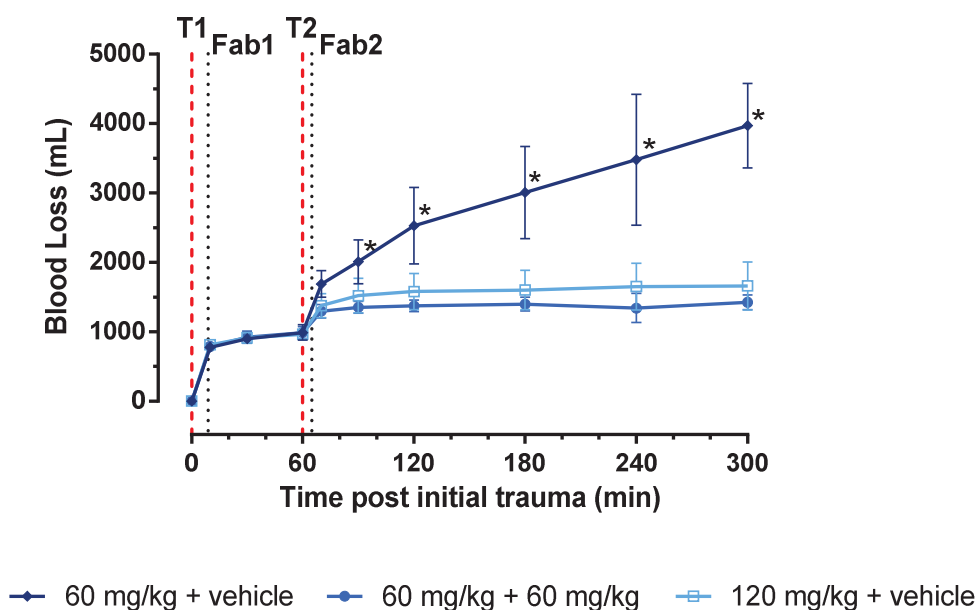


図 2.4.2.4: 1 ブタ鈍的肝外傷モデルにイダルシズマブを分割投与 (2×60) 又は単回投与 (1×120) したときの効果。時間 0 の破線 T1 は初回外傷, T2 は 2 回目の外傷を意味する。点線 Fab1 は初回イダルシズマブ (Fab) 投与, Fab2 は 1 時間後の 2 回目のイダルシズマブ (Fab) 投与又は溶媒投与を意味する。
(平均値±SD, n = 6) , *60 mg/kg+vehicle 群と他の 2 群との比較で p<0.001

外傷誘起直前の血漿中ダビガトラン濃度は 1100～1160 ng/mL (2330～2460 nM) の範囲であり、投与群間で有意差は認められなかった。ダビガトラン抗凝固療法により、外傷誘起 12 分後に同程度の出血が認められた。初回外傷誘起後にイダルシズマブを 60 又は 120 mg/kg の用量で投与することにより、その後 60 分間にわたる出血量が同程度に抑制された (図 2.4.2.4: 1)。

2 回目外傷誘起後、溶媒を投与した動物 (初回外傷誘起後にイダルシズマブ 60 mg/kg 投与) では再び出血が始まり、初回外傷誘起 300 分後には出血量は 3970 ± 610 mL まで増加し、死亡率は 83%、平均生存期間は 235 ± 55 分であった。しかし、初回外傷誘起 60 分までに止血効果が認められ凝血塊が形成された初回外傷部位からのさらなる出血は認められなかった。2 回目外傷誘起後に 2 回目のイダルシズマブ 60 mg/kg 静脈内投与を行った動物では、2 回目外傷部位からの出血が速やかに停止した。初回外傷誘起 15 分後にイダルシズマブ 120 mg/kg を 1 回限り投与した動物でもこの反応が認められたことから、十分高用量のイダルシズマブを投与した場合、初回外傷誘起 60 分後の時点でも新たな外傷部位で血栓が形成されることが明らかになった。

従前の試験同様、ダビガトランの抗凝固作用は一貫して中和され、血漿中総ダビガトラン濃度が上昇した。等モル用量 (2×60 mg/kg 及び 1×120 mg/kg) のイダルシズマブを投与することで、試験期間を通して、抗凝固作用が完全に中和された。

これらの外傷試験の結果から、イダルシズマブ投与量増加に伴う出血量の減少と血漿中ダビガトラン濃度の減少、種々の凝固パラメータ及び生存率の改善の間に直接的相関関係が認められた。

また、1000 ng/mL を超える血漿中ダビガトラン存在下、1 時間間隔で 2 回にわたり損傷を誘起した後であっても、イダルシズマブの 120 mg/kg 単回投与（総用量約 5 g）又は 60 mg/kg 2 回分割投与（総用量約 2×2.5 g）で効果的に出血を抑制できることが明らかになった。

2.4.2.5 マウス頭蓋内出血モデル

マウス頭蓋内出血（ICH）モデルを用いて、ダビガトラン抗凝固療法下でイダルシズマブを投与することで血腫容積に影響するかどうか検討した[CTD 4.2.1.1-01_n00237737]。マウス（C57BL/6, 雄, 20~25 g, 4~20 例/群）に DE を 4.5 又は 9.0 mg/kg（7.16 又は 14.32 $\mu\text{mol/kg}$ ）の用量で腹腔内投与することで、血漿中ダビガトラン濃度はそれぞれ 1600 及び 2800 ng/mL（3392 及び 5936 nM）に達した。脳定位固定装置を用いて、麻酔下でコラゲナーゼを線条体内に投与することで、マウスで ICH を誘起した。コラゲナーゼ投与 30 分後、イダルシズマブを 191 mg/kg（4 $\mu\text{mol/kg}$ ）、382 mg/kg（8 $\mu\text{mol/kg}$ ）又は 764 mg/kg（16 $\mu\text{mol/kg}$ ）又は生理食塩液を尾静脈に注入した。凍結切片を作成し、分光光度法を用いてヘモグロビンを定量することにより、ICH 容積及び脳内血液含量を定量した（図 2.4.2.5: 1）。

本モデルにおいて、ICH 誘起後最初の 1~3 時間にわたり約 80~90%の血腫拡大が認められたことから、ICH 誘起後 1 時間以内に抗凝固作用の中和を開始した。マウスに DE を投与することで高い血漿中ダビガトラン濃度を達成し、対照群に比べて ICH を増加させた（図 2.4.2.5: 1C~E）。本モデルでは、等モル用量のイダルシズマブを投与することにより、血腫容積の拡大が抑制された。図 2.4.2.5: 1C 及び D に示すように、用量 4.5 mg/kg（7.16 $\mu\text{mol/kg}$ ）の DE を投与した場合、低モル用量のイダルシズマブ（4 $\mu\text{mol/kg}$ ）でも血腫容積がベースラインレベルまで有意に減少した。用量 9 mg/kg（14.32 $\mu\text{mol/kg}$ ）の DE を投与した場合、ほぼ等モル用量のイダルシズマブ（16 $\mu\text{mol/kg}$ ）を投与したときにのみ、血腫容積がベースラインレベルまで有意に減少した。

これらの試験から、イダルシズマブを投与することで、ダビガトラン抗凝固療法に起因する血腫容積を減少できることが立証された。有効性は従前のモデルと一致しており、等モル量のイダルシズマブを投与した場合に抗凝固療法を行っていない動物と同等のレベルまで血腫容積を減少させることが可能であった。

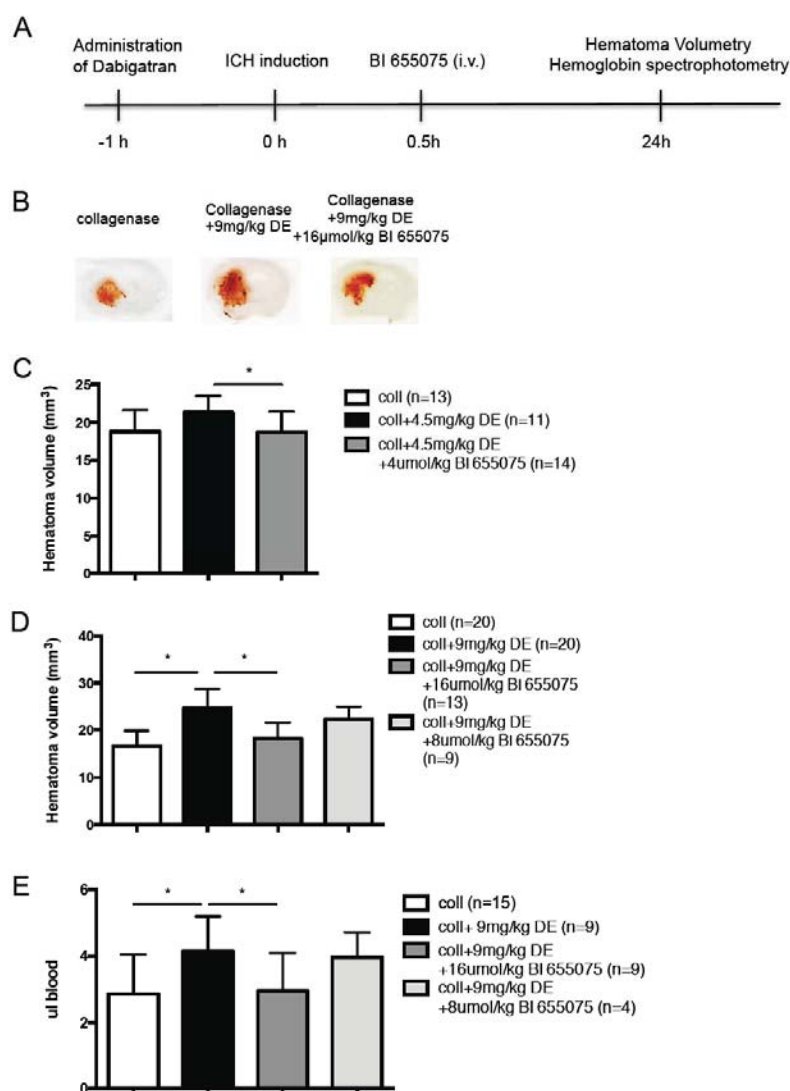


図 2.4.2.5: 1

マウス ICH モデルにおける DE の影響及びイダルシズマブ (BI 655075) によるその中和効果。

(A) 実験プロトコル, (B) コラゲナーゼ注射 24 時間後の注射管レベルでの代表的冠状断面, (C) DE 4.5 mg/kg (7.16 μmol/kg) の投与に続いて 4 μmol/kg のイダルシズマブ又は生理食塩液を投与したマウスの血腫容積, * $p < 0.05$, (D) DE 9.0 mg/kg (14.32 μmol/kg) に続いて 8 μmol/kg 又は 16 μmol/kg のイダルシズマブ又は生理食塩液を投与したマウスの血腫容積, * $p < 0.05$, (E) コラゲナーゼ注射 1 日後の出血性脳半球ホモジネート中の血液含量, * $p < 0.05$ 。(平均値±SD)

2.5 イダルシズマブのダビガトランに対する特異性

抗凝固療法による治療中の患者で出血に対する緊急の処置を行う場合、抗凝固作用を中和するだけでなく、急速輸液により血液量を回復させるとともに、凝固因子濃縮製剤を投与するなどの出血管理プロトコルが必要となる。非ビタミン K 拮抗型経口抗凝固薬 (NOAC) を使用してい

る患者の出血管理に関する多くのガイドラインにおいて、これら両方の処置が推奨されている [CTD 4.3-04_P13-06400]。これに加えて、患者が抗血小板薬などの出血に寄与する可能性がある他の薬剤を使用している場合もある。さらに、第 Xa 因子阻害剤、ビタミン K 拮抗薬、低分子量ヘパリンなど、別の抗凝固薬を使用している患者に対して、ダビガトランに特異的な中和剤が誤って投与される可能性がある。このような状況でのイダルシズマブ投与は他の薬剤の抗凝固作用を抑制しないと予想され、また、イダルシズマブは追加の体液補充又は凝固因子濃縮製剤投与による影響を受けないと予想されるが、これを検討する試験は実施されていなかった。さらに、臨床での使用頻度はそれほど多くないが、hirudin 又はアルガトロバンのような他の直接トロンビン阻害剤に対するイダルシズマブの影響を検討する試験も実施されていなかった。そのため、これらの薬剤/緊急処置について、様々な試験条件でイダルシズマブとダビガトランの特異的結合に影響するかどうかを検討した。膠質液及び晶質液を用いた血液希釈によるイダルシズマブのダビガトランの抗凝固作用の中和への影響については CTD 2.6.2_2.5.1 項に記載する。また、経口又は非経口抗凝固薬の抗凝固作用に対するイダルシズマブの影響については副次的薬理試験に記載する [CTD 2.6.2_3.1 項]。さらに、ダビガトラン及び抗血小板薬に関連する出血時間延長に対するイダルシズマブの影響、及びイダルシズマブによるダビガトラン中和作用に対する凝固因子濃縮製剤の影響については薬力学的薬物相互作用試験に記載する [CTD 2.6.2_5.1 及び 5.2 項]。

2.5.1 膠質液及び晶質液による血液希釈

重度の出血患者の処置では、血液量を回復させ、血行動態学的循環不全状態を安定化させて組織灌流を維持するため、通常、血漿増量剤が使用される [CTD 4.3-05_P13-10404]。血液量を回復させるための処置を選択する際には、晶質液（リンゲル液）、膠質液（でんぷん配合剤又はゼラチン）及び術中自己血回収術を用いた患者自身の赤血球輸血など、多様な選択肢がある。本試験では、重度出血及び出血性ショック下で様々な補液療法を併用しながらイダルシズマブを使用したとき、イダルシズマブのダビガトランへの結合に影響が生じるかどうかを検討した [CTD 4.2.1.1-09_n00230830]。

ブタ (Landrace, 雄, 約 50 kg, 5-6 例/群) に DE (30 mg/kg) を 1 日 2 回 3 日間経口投与した後、4 日目に麻酔処置を行い、ダビガトランを 90 分間静脈内持続投与 (0.77 mg/kg/h で 30 分間, 0.26 mg/kg/h で 60 分間) した結果、血漿中ダビガトランの濃度 (dTT 法) は 596~629 ng/mL (1264~1333 nM) に達した。ダビガトラン投与後、出血性ショックに似た状態にするため、全血液量の約 50% (65 mL/kg 体重) を 100 mL/min の速度で抜き取った。その後、晶質液、6%ヒドロキシエチルデンプン (HES) 130/0.4, 6% HES 200/0.5, 4%ゼラチン、洗浄赤血球 (RBC) 輸血又は血液希釈を行わない対照処置群のいずれかに動物を無作為割付けした。処置方法は、晶質液の場合は出血量に対して 1:1, 膠質液の場合は 25 mL/kg, 輸血の場合は 12 mL/kg で投与した。

この処置により、図 2.5.1: 1 に示すように、血液が約 50%希釈された（灰色網掛け領域は 60 分間の血液希釈を示す）。ヘモグロビン濃度は輸血及び対照処置の場合にのみ正常レベルに維持され、他のすべてでは希釈後に約 50%低下した。

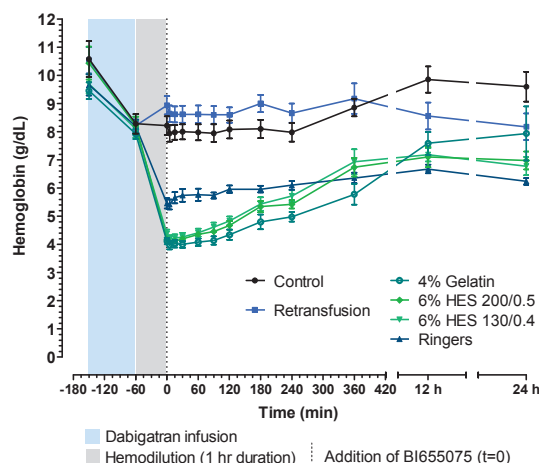


図 2.5.1: 1 出血及び補液療法（灰色網掛け領域）前後に測定したヘモグロビン濃度。
イダルシズマブ（BI 655075）は時間 0 に投与した。（平均値±SEM, n=5）

血液希釈（点線，t=0）直後にイダルシズマブ（30 mg/kg）を静脈内投与し，24 時間にわたり経時的に血液試料を採取し，イダルシズマブのダビガトランへの結合を検討した。全試験群において，血漿中ダビガトラン濃度（dTT 法）は，初期濃度 620 ± 206 ng/mL（範囲 253～1089 ng/mL）から，イダルシズマブ投与後 5 分以内に 44 ± 85 ng/mL（範囲 0～292 ng/mL）に低下した（図 2.5.1: 2）。

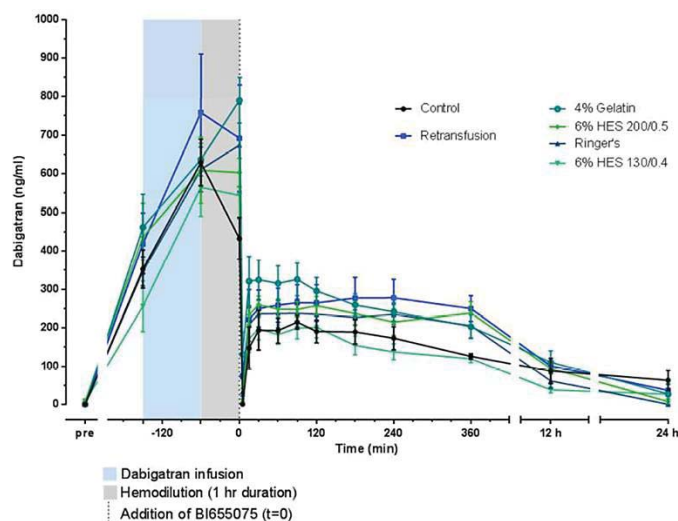


図 2.5.1: 2 様々な血漿増量剤存在下で dTT 法により測定した血漿中ダビガトラン濃度。
イダルシズマブ（BI 655075，30 mg/kg）は時間 0（点線）に投与した。（平均値±SD, n=5）

イダルシズマブ投与 15 分後に再び血漿中ダビガトランが測定可能な濃度となり，30 分後に最高値（ 242 ± 95 ng/mL）に達した（図 2.5.1: 2）。その後，血漿中ダビガトラン濃度は再び低下し，イダルシズマブ投与 24 時間後には， 27 ± 48 ng/mL（範囲 0～160 ng/mL）となった。イダルシズマブ投与後 24 時間にわたり，種々の血漿増量剤間で血漿中ダビガトラン濃度に有意差は認められな

かった。つまり、ダビガトランの抗凝固作用はイダルシズマブによって速やかに中和され、30 mg/kg の投与で約 70%まで凝固作用は回復した。ダビガトランの濃度と抗凝固作用の相関関係には多少の相違が認められたものの、おそらくこの相違は部分的には血液希釈が凝固に及ぼす直接の作用によるものであると考えられ、イダルシズマブによるダビガトランの抗凝固作用の中和効果は重度の出血患者の処置に用いられる血漿増量剤とは関係なく一貫して達成された。異なる凝固試験において、dTT と diluted PT (dPT) は血液希釈にはほとんど影響されず、ダビガトランの血漿濃度と良い相関を示した。aPTT のアッセイはある程度血液希釈の影響を受け、ばらつきもみられた。さらに、トロンボエラストグラフィー若しくは ACT のような全血を用いたアッセイは感度が良く、dTT のアッセイ結果と高い相関を示した。このように、ポイントオブケア検査 (POCT)、血漿を用いた一般的な凝固試験の両方とも、血液希釈下であってもイダルシズマブによるダビガトランの定性的な中和作用を測定するために用いることができた。したがって、これらの試験から、通常使用される様々な補液療法による 50%血液希釈によって、イダルシズマブによるダビガトランの抗凝固作用の中和に影響が生じることはないことが証明された。

3. 副次的薬理試験

イダルシズマブはダビガトランに特異的に結合するよう設計され、それ自体に酵素活性はない。イダルシズマブにトロンビン様作用がないことは、効力を裏付ける試験の一部で検討されており [CTD 2.6.2_2.3 項] , *in vivo* で血栓形成促進作用がないことは毒性試験及び臨床試験の一部で確認されている [CTD 2.6.6 及び 2.7.1] 。ここでは、経口又は非経口抗凝固薬の抗凝固作用に対するイダルシズマブの影響を評価した。

3.1 経口又は非経口抗凝固薬の抗凝固作用に対するイダルシズマブの影響

リバーロキサバン又はアピキサバンのような経口第 Xa 因子阻害剤, ワルファリンのようなビタミン K 拮抗剤, ヘパリン又は低分子量ヘパリン (LMWH, エノキサパリン) のような非経口抗凝固薬, hirudin, アルガトロバン又は melagatran のような他の直接トロンビン阻害剤 (DTI) など, 他の抗凝固薬による凝固作用の阻害に対するイダルシズマブの影響について, *in vitro* 及び *in vivo* で検討した [CTD 4.2.1.2-01_n00237733] 。

直接トロンビン阻害剤 (DTI) : ベースライン凝固時間を約 40 秒間延長させる濃度の DTI を添加したヒト血漿にイダルシズマブを添加したときの抗凝固作用に対する影響について, 改良化トロンビン時間アッセイを用いて *in vitro* で評価した。高濃度のイダルシズマブ (3 mg/mL 又は 62.7 μ M) を hirudin (2 nM) 又はアルガトロバン (150 nM) に追加しても, いずれの DTI の抗凝固作用も影響を受けなかったが, イダルシズマブ (3 mg/mL) を追加すると, melagatran (10 nM) の抗凝固作用は部分的に中和された。そこで, melagatran の抗凝固作用に対するイダルシズマブの濃度依存的反応について検討した (図 3.1: 1)。melagatran の抗凝固作用に対するイダルシズマブの阻害作用は, 弱いものの特異的であった (IC_{50} 値 7.7 μ M)。しかし, melagatran は現時点で市販されていないため, この阻害作用の臨床的意義はないと考えられる。

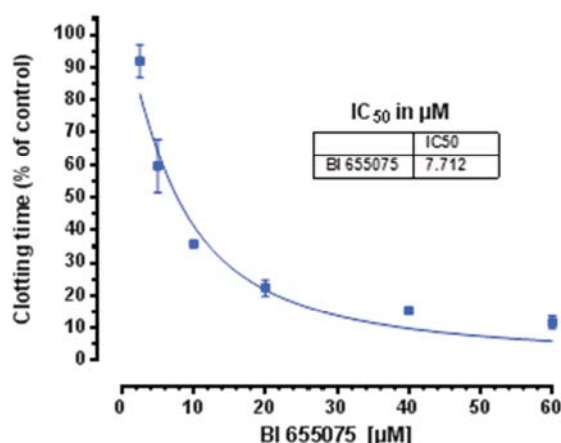


図 3.1: 1 ヒト乏血小板血漿 (platelet poor plasma) 中での melagatran (10 nM) の抗凝固作用に対するイダルシズマブ (BI 655075) の影響 (平均値 $\pm$ SEM, n=3) IC_{50} 値 (μ M)

第 Xa 因子阻害剤：リバーロキサバン及びアピキサバンを添加したときの抗凝固作用について、各阻害剤を含有するヒト血漿を用いて、抗第 Xa 因子活性測定法により *in vitro* で評価した。イダルシズマブ (3 mg/mL) を追加しても、第 Xa 因子阻害剤による抗凝固作用に影響はみられなかった。

ヘパリン及び LMWH: 複数濃度のヘパリン及び LMWH を添加したときの抗凝固作用について、各阻害剤を含有するヒト血漿を用いて、抗第 Xa 因子活性測定法により *in vitro* で評価した。イダルシズマブ (3 mg/mL) を追加しても、これらの薬剤による抗凝固作用に影響はみられなかった。

ビタミン K 拮抗剤：雌雄 Crl:WI(Han)ラット (約 250 g, 4~5 例/群) にワルファリンを 0.5 mg/kg の用量で 4 日間経口投与し、プロトロンビン時間 (PT) を有意に延長させた。ワルファリンの最終投与 45 分後にイダルシズマブを 0.70 $\mu\text{mol/kg}$ で静脈内投与しても PT に影響はなかった。

以上より、ビタミン K 拮抗剤、第 Xa 因子阻害剤、ヘパリン、又はアルガトロバン及び hirudin のようなダビガトランと構造的に異なるその他の DTI などのほかの薬剤の抗凝固作用に対してイダルシズマブは影響を及ぼさなかった。しかし、イダルシズマブは低分子 DTI である melagatran (ダビガトランと構造及び分子量が類似) の抗凝固作用をわずかに阻害した。melagatran は現時点で市販されていないことから、この阻害作用の臨床的意義はないと考えられる。

4. 安全性薬理試験

イダルシズマブの安全性薬理コアバッテリー試験を表 4: 1 に示す。これには、ラット (CrI:WI(HAN)) を用いた GLP 適用の呼吸器系評価試験、ラット (RccHanTM:WIST) を用いた GLP 適用 4 週間毒性試験の一部として実施した中枢神経系 (CNS) 評価試験、サル (アカゲザル) を用いた GLP 適用 2 回投与毒性試験の一部として実施した心血管系評価試験が含まれる。

ラット (CrI:WI(HAN)), 雄, 187~254 g, 8 例/群) に用量 150 あるいは 500 mg/kg のイダルシズマブを静脈内投与しても、投与 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 及び 240 分後に測定した呼吸数, 1 回換気量及び分時換気量に対する影響はみられなかった [CTD 4.2.1.3-01_U12-3330]。

ラット (RccHanTM:WIST, 雄, 171-222 g, 6 例/群) において, CNS 機能に対する影響は認められなかった。この CNS 評価は, Irwin 変法の機能的臨床観察及び自発運動試験について, イダルシズマブ 150 及び 500 mg/kg の投与前並びに投与後 1 及び 24 時間の時点で, 1 群当たり雄ラット 6 例を対象として GLP 適用 4 週間毒性試験で実施した [CTD 4.2.3.2-02_U12-3327]。雄ラットに用量 500 mg/kg のイダルシズマブを投与したときの 1 日目の C_{max} は 157000 nM (7520000 ng/mL), AUC_{0-24} は 82700 nM·h (3950000 ng·h/mL) であった。

サル (アカゲザル, 雌雄, 3.05~4.02 kg, 3 例/性別/群) において, DE 12 mg/kg 併用又は非併用でイダルシズマブを 500 mg/kg の用量で静脈内投与しても, 心血管系機能に対する影響はなかった [CTD 4.2.3.2-03_U12-3328]。用量 500 mg/kg のイダルシズマブを投与したときの C_{max} は 235000 nM (11250000 ng/mL), AUC_{0-24} は 223000 nM·h (10650000 ng·h/mL) であった。試験 5 日目 (DE 経口投与 5 日目, イダルシズマブ静脈内投与 2 日目) に動物に心電図テレメトリー測定用ジャケットを装着し, 雌雄ごとに群単位でケージに収容し, 24 時間の心電図を記録した。心血管系パラメータとして心拍数及び ECG パラメータ (波形, P, PR, QRS 及び QT 間隔, QTcR 間隔) を評価した。テレメトリー測定は, 少なくとも投与開始 90 分前から開始し, 投与終了後少なくとも 6 時間にわたり継続した。投与前及び投与後 1, 2, 4, 6 時間に 5 分間 ECG 波形を分析した。

表 4: 1 イダルシズマブの安全性薬理試験の概要

Organ system: Test (GLP status)	Species	Dose (mg/kg)	Parameters	Results	Report no.
Cardiovascular: Cardiovascular function (GLP)	Rhesus monkey	0, 12/500, 0/500 ^a	HR, ECG	No effects	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328
CNS: Modified Irwin screen (GLP)	Rat RccHan TM :WIST	0, 150, 500 intravenous	panel of functional clinical observation, motor activity	No effects	CTD 4.2.3.2-02_U12-3327
Respiratory: plethymography (GLP)	Rat CrI:WI(HAN) (males)	0, 150, 500 intravenous	respiration rate, tidal volume, minute volume	No effects	CTD 4.2.1.3-01_U12-3330

ECG = 心電図, HR = 心拍数

a: DE/イダルシズマブは経口/静脈内投与した。経口投与 1.5 時間後に静脈内投与を実施した。

5. 薬力学的薬物相互作用試験

イダルシズマブはダビガトランに特異的に結合するよう設計されたことから、他の薬剤との間に相互作用が生じることはないと予想される。ここでは、イダルシズマブと抗血小板薬又は凝固因子濃縮薬との相互作用の可能性について検討した。

5.1 ダビガトラン及び抗血小板薬に関連する出血時間延長に対するイダルシズマブの影響

ラット (Crl:WI(HAN), 雌雄, 約 250 g, 3~6 例/評価時点) に抗血小板薬であるアセチルサリチル酸 (100 mg/kg, Aspirin[®], ASA), クロピドグレル (4 mg/kg, Plavix[®]) 又は Ticagrelor (3 mg/kg, Brilique[®]) を経口投与し, 血小板機能の低下を *ex vivo* 血小板凝集能測定法により確認した [CTD 4.2.1.4-01_n00238041]。抗血小板薬投与 75 分後, DE (30 mg/kg) を経口投与した。DE 投与の 45 分後に, イダルシズマブ (0.7 μ mol/kg) 又は溶媒を静脈内投与し, さらに 15 分後, 尾部に標準的切開処置を行い止血に要する時間を測定することにより, 出血時間を測定した。イダルシズマブ投与直前の血漿中ダビガトラン濃度は各動物間でばらついていてはいたものの, ダビガトラン単独投与群と抗血小板薬併用群の平均値には大きな差がみられなかった。DE と各抗血小板薬の併用投与により, 出血時間はベースラインにおける 138 $\pm$ 11 秒から 260 $\pm$ 36 秒 (DE+ASA), 345 $\pm$ 38 秒 (DE+Clop), 383 $\pm$ 77 秒 (DE+Tica) へと延長した ($p<0.001$)。イダルシズマブを静脈内投与したとき, DE と各抗血小板薬の併用投与によって誘発した出血時間の延長を部分的に回復させたただけであったが (図 5.1: 1), DE 投与によって誘発した出血時間の延長は, 同用量のイダルシズマブによってベースラインレベルまで回復した。

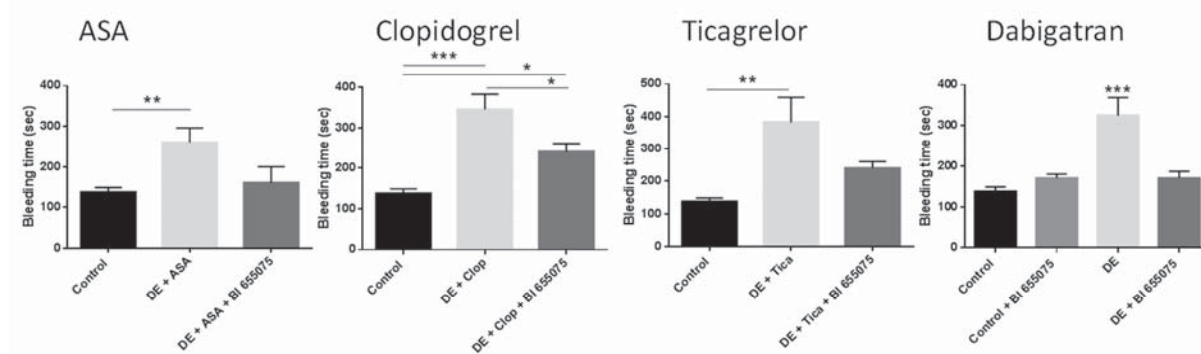


図 5.1: 1 イダルシズマブ (BI 655075) 投与又は非投与での対照, 経口 DE 及び各抗血小板薬を投与したときの出血時間 (秒)

(平均値 $\pm$ SEM, $n=3\sim6$), 対照との比較で * $p<0.05$, ** $p<0.01$ *** $p<0.001$

以上より, ダビガトランを特異的に中和するイダルシズマブは, ダビガトランと抗血小板薬併用時の出血時間延長を部分的に回復させるだけであった。したがって, 臨床でダビガトランを使用している患者に抗血小板薬を追加することで悪化した出血事象は, ダビガトラン及び抗血小板薬の相対的寄与に応じて, 回復する場合もあれば回復しない場合もあると考えられる。

5.2 *in vitro* でのイダルシズマブによるダビガトラン中和作用に対する凝固因子濃縮製剤の影響

3 因子及び 4 因子含有プロトロンビン複合体濃縮製剤 (PCC), 活性型プロトロンビン複合体濃縮製剤 (aPCC) 又は遺伝子組換え活性型第 VII 因子製剤 (rFVIIa) について, イダルシズマブによるダビガトラン中和作用への影響を dTT を用いて *in vitro* で検討した [CTD 4.2.1.4-02_n00238187]。

PCC (1 U/mL) 又は rFVIIa (100 nM) を含むヒト血漿に複数濃度のダビガトランを添加し, これらの凝固因子濃縮製剤存在下でダビガトランの抗凝固作用に影響が生じるかどうかを検討した。次にダビガトランを含む血漿にイダルシズマブ (3 mg/mL) を添加し, PCC, aPCC 及び rFVIIa の凝固作用に対する影響を評価した。

ダビガトランを添加すると, 濃度依存的に dTT が延長した。ダビガトランを含む血漿に 3 因子及び 4 因子含有 PCC 又は rFVIIa を添加しても, ダビガトランによる dTT の延長作用に影響はみられなかった。濃度 3 mg/mL のイダルシズマブを添加すると, ダビガトランの抗凝固作用はベースラインレベルまで中和された。PCC, aPCC 及び rFVIIa 添加しても, イダルシズマブによるダビガトラン抗凝固作用の中和効果に影響はなかった。4 因子含有 PCC である Beriplex® (米国では Kcentra®) の例を図 5.2: 1 に示すが, 検討したすべての凝固因子濃縮製剤においても同様であった [CTD 4.2.1.4-02_n00238187]。これらの *in vitro* 試験から, ダビガトランの濃度依存的 dTT 延長作用及びイダルシズマブによるダビガトランの中和効果に対して, PCC, aPCC 及び rFVIIa は影響しないことが立証された。

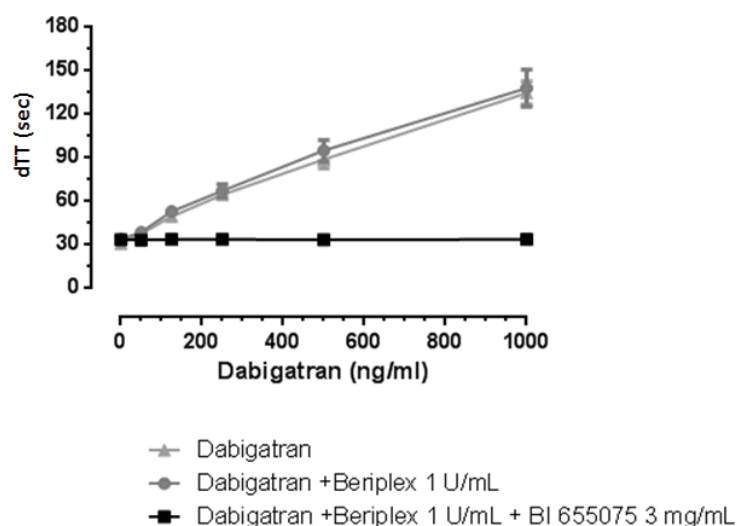


図 5.2: 1 ダビガトランによる dTT 延長作用及びイダルシズマブ (BI 655075) によるダビガトランの中和効果に対する PCC の影響 (平均値±SD, n=2~3)

6. 考察及び結論

イダルシズマブは、抗凝固作用を有するダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体に対して非常に高い親和性で結合するヒト化抗体フラグメントである。イダルシズマブとダビガトランが複合体を形成する際の会合速度は非常に速く、解離速度は遅いため、複合体の結合は不可逆的なものとなる。このように高い結合親和性を示す理由の 1 つは、イダルシズマブとダビガトランの結合部位がトロンビンとダビガトランの結合部位の一部とよく似ているためと考えられるが、*in vitro* 及び *ex vivo* 試験の結果、イダルシズマブはトロンビン基質には結合せず、トロンビン様酵素活性を示さなかった。イダルシズマブは単独でも、ダビガトランと複合体を形成した場合でも、血漿タンパク質に結合しなかった。イダルシズマブは、血漿中のダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体に特異的に結合し、これらを不活性化させることにより抗凝固作用を中和する。また、イダルシズマブとダビガトランの結合の間には 1:1 の化学量論的關係が存在し、ダビガトランの抗凝固作用を完全に中和するためには、血漿中ダビガトランと等モル用量以上のイダルシズマブが必要である。

In vitro 及び *in vivo* 試験の結果、イダルシズマブを添加又は投与すると、ダビガトランの抗凝固作用が速やかに中和された。ダビガトランの抗凝固作用はイダルシズマブ投与数分以内に中和され、血漿中イダルシズマブが等モル用量以上である場合、その中和効果は維持された。イダルシズマブによってダビガトランの抗凝固作用が消失すると、フィブリンの沈着が正常に回復した。複数の出血モデルにおいて、イダルシズマブによってダビガトランの抗凝固作用を中和することで、速やかな止血効果が得られた。抗凝固作用の中和と出血阻止の間には相関関係が認められた。この相関関係は、重度の致命的な抗凝固剤に関連する出血及び外傷性出血の場合でも認められ、また、ダビガトランの抗凝固作用を測定する全血及び血漿凝固検査での中和効果においても認められた。

ラット及びブタ出血モデル、並びにマウス ICH モデルにおいて、治療域を上回る血漿中ダビガトラン濃度下で認められるような抗凝固作用を示すモデルを作製することが出来たが、ダビガトラン濃度が高いにもかかわらず、イダルシズマブによって、ダビガトランの抗凝固作用及び関連する出血作用を完全に中和することが可能であった。また、投与するイダルシズマブの総用量が重要であり、1 回投与か 2 回分割投与（60 分間隔）にかかわらず、ダビガトランの投与量と等モル以上のイダルシズマブを投与する限り同様の中和効果が得られた。

ラット及びブタにイダルシズマブを投与したとき、LC-MS/MS 法により測定した血漿中ダビガトラン濃度が 5~10 倍上昇した。これらの濃度はダビガトラン及びその活性代謝物の合計濃度（総ダビガトラン）を反映しており、遊離型及び結合型（イダルシズマブ又は血漿タンパク質に結合）の両方が含まれる。しかし、活性型ダビガトランの存在を示す抗凝固作用はほとんど認められず、この総ダビガトラン濃度はイダルシズマブに結合したダビガトラン及びその活性代謝物に相当することが示唆された。これらのダビガトラン濃度の上昇は、血漿中のダビガトランがイダルシズマブに結合し、新たな平衡状態を保とうとして、血管外コンパートメントのダビガトランが血液コンパートメントへと移行したことを意味している。血中に非結合型イダルシズマブが残存する限り、血中のイダルシズマブがダビガトランで飽和するか、又は血管外コンパートメントのダビ

ガトランが枯渇するまで、このダビガトランの血管外コンパートメントから血液コンパートメントへの移行が継続すると考えられる。このように、組織中のダビガトランの活性もイダルシズマブによって血漿中で中和されると考えられる。イダルシズマブがダビガトランの等モル用量以下である場合、イダルシズマブ投与約 30～60 分後に非常に低濃度の活性型ダビガトランが再出現する。これは、イダルシズマブに結合していない残存の活性型ダビガトランの再平衡状態を意味する。

二重外傷モデルにおいて、イダルシズマブが活性型ダビガトランの等モル用量未満であり、イダルシズマブ投与 30～60 分後で残存する活性型ダビガトランの抗凝固作用が再出現した場合であっても、外傷部位で止血状態が既に定着していれば、該当部位からさらなる出血が生じないことが示され、出血は新たに生じた外傷部位のみで起こった。

PCC, aPCC 及び rFVIIa は、イダルシズマブとダビガトランの結合に対して影響を及ぼさなかった。また、その作用機序から予想されるように、直接作用型第 Xa 因子阻害薬、ヘパリン、ビタミン K 拮抗薬又はその他の市販されている直接トロンビン阻害薬によって誘導される抗凝固作用に対して、イダルシズマブは影響を及ぼさなかった。抗血小板薬とダビガトランの併用投与を受けているラットにイダルシズマブを投与したとき、出血時間の延長が限定的に回復されただけであったことから、イダルシズマブは抗血小板薬によって惹起された出血には阻止効果がないことが示された。

ラットを用いた安全性薬理試験において、イダルシズマブは呼吸器系及び CNS に対して影響を及ぼさなかった。サルを用いた *in vivo* 心血管系試験においても、DE 併用にかかわらず、イダルシズマブに起因する毒性所見は認められなかった。したがって、ヒトにイダルシズマブを投与しても、呼吸器系、中枢神経系及び心血管系に関連する有害事象が発現する可能性は低いと考えられる。

以上より、イダルシズマブはダビガトランに特異的な強力かつ不可逆的な阻害剤であり、単回投与してもどの器官にも非特異的影響を及ぼさないと考えられる。イダルシズマブはダビガトランの抗凝固作用を中和することにより、正常な止血機能を回復させる作用を示し、その結果として、創傷部に正常な血餅が形成され、出血が停止する。

第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名 : イダルシズマブ（遺伝子組換え）		
剤形・含量 : 注射剤・50 mg/mL		
文書名 : 2.6.3 薬理試験概要表		
文書作成日 :	17 August 2016	Page 1 of 16
Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved. This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission		

目 次

目 次	2
1. 薬理試験一覧表	3
2. 効力を裏付ける試験	9
3. 副次的薬理試験	14
4. 安全性薬理試験	15
5. 薬力学的薬物相互作用試験	16

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬理試験一覧表

Test Article: idarucizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD number / Document number
Primary Pharmacodynamics				
Binding affinity of idarucizumab for dabigatran, influence of pH; specificity of idarucizumab to dabigatran vs other thrombin substrates; plasma protein binding	K _d and on and off rates measured using Biacore and Kinexa, surface plasmon resonance (SPR) for binding to thrombin substrates, human plasma proteins	<i>In vitro</i>	BI	CTD 4.2.1.1-08_n00231289
Reversal of dabigatran (and glucuronidated dabigatran) anticoagulant activity in human plasma by idarucizumab; comparison of reversal of dabigatran anticoagulant activity in human plasma and whole blood	Concentration required to reduce anticoagulant activity by 50% (IC ₅₀) using a modified thrombin time assay in human plasma	<i>In vitro</i>	BI	CTD 4.2.1.1-12_n00232054
Impairment of fibrin and platelet deposition at a damaged vessel site with dabigatran; restored hemostatic function after addition of idarucizumab	Human whole blood +/- dabigatran +/- idarucizumab exposure to damaged blood vessel segment in a chamber under flow conditions, deposition of fibrin and platelets quantitated	<i>In vitro</i>	 Spain	CTD 4.2.1.1-14_n00237740
Idarucizumab was tested in a series of assays for any thrombin-like enzymatic activity due to some structural similarities with the thrombin active site	Thrombin generation assay in human plasma Supplementation in human prothrombin-depleted plasma Ecarin chromogenic assay measuring prothrombin activation in human plasma Thrombin mediated activation of fibrinogen to fibrin <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> in the rat Platelet activation via thrombin receptor in human platelet rich plasma	<i>In vitro</i> Intravenous (<i>ex vivo</i>)	BI	CTD 4.2.1.1-07_n00233139

BI Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬理試験一覧表（続き）

Test Article: idarucizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD number / Document number
Primary Pharmacodynamics (Continued)				
Reversal by idarucizumab of <i>in vivo</i> dabigatran anticoagulant activity	Thrombin time and aPTT prolongation with dabigatran and its reversal with idarucizumab in rats (CrI:WI(Han)); measures of sum dabigatran, idarucizumab plasma levels	Intravenous	BI [REDACTED] Germany	CTD 4.2.1.1-03_n00226711
Reversal by idarucizumab of prolonged bleeding effects by dabigatran	Rat tail bleeding time (CrI:WI(Han)) with oral dabigatran dosing (30 mg/kg); blood samples taken for <i>ex vivo</i> anticoagulation measures, dTT, ECT, TT, aPTT; measures of sum dabigatran, idarucizumab plasma levels	Intravenous	BI [REDACTED] Germany	CTD 4.2.1.1-04_n00227451
Reversal by idarucizumab of prolonged bleeding effects by supra-therapeutic dabigatran levels, effects of split dosing idarucizumab	Rat tail bleeding time (CrI:WI(Han)) with multiple oral dabigatran dosing (3x30 mg/kg); idarucizumab given as a single dose or split dose, 12 min apart. Blood samples taken for <i>ex vivo</i> anticoagulation measures, dTT, ECT, TT, aPTT	Intravenous	BI	CTD 4.2.1.1-05_n00234943
Reversal by idarucizumab of dabigatran- and trauma-induced bleeding with supra-therapeutic dabigatran levels	Porcine (domestic landrace) lethal blunt liver trauma model, blood loss measured for 4 hrs; blood samples taken for <i>ex vivo</i> assay assessment; anticoagulation measures and sum dabigatran, idarucizumab plasma levels	Intravenous	[REDACTED] Germany; [REDACTED] NL; idarucizumab plasma levels: BI; [REDACTED] Germany	CTD 4.2.1.1-11_n00231240

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬理試験一覧表 (続き)

Test Article: idarucizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD number / Document number
Primary Pharmacodynamics (Continued)				
Reversal by idarucizumab of dabigatran- and trauma-induced bleeding with supra-therapeutic dabigatran levels; effects of split dosing idarucizumab	Porcine (domestic landrace) lethal blunt liver trauma model, blood loss measured for 4 hrs; blood samples taken for <i>ex vivo</i> assay assessment; anticoagulation measures and sum dabigatran, idarucizumab plasma levels	Intravenous	Germany; idarucizumab plasma levels: BI; NL; idarucizumab plasma levels: BI; Germany	CTD 4.2.1.1-10_n00238140
Reversal by idarucizumab of dabigatran-induced intracranial hemorrhage (ICH) and correlation to reversal of prolonged tail bleeding	Model of ICH induced by striatal collagenase injection in C57BL/6 Mice, hematoma volume was quantitated, correlated with mouse tail bleeding; blood sampling for dabigatran plasma levels	Intravenous	Germany	CTD 4.2.1.1-01_n00237737
Effects of hemodilution with volume expanders on idarucizumab binding to dabigatran	Porcine (domestic landrace) hemodilution model, 50% reduction of blood loss and volume replacement with colloids, crystalloids and washed red cells (retransfusion); blood samples taken for <i>ex vivo</i> assay assessment; anticoagulation measures and sum dabigatran, idarucizumab plasma levels	Intravenous	Germany; NL; idarucizumab plasma levels: BI; Germany	CTD 4.2.1.1-09_n00230830

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬理試験一覧表（続き）

Test Article: idarucizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD number / Document number
Secondary Pharmacodynamics Effect of idarucizumab on reversal of anticoagulant activity of other agents, including anti-factor Xa inhibitors, heparins, vitamin K antagonists and other direct thrombin inhibitors	Anticoagulation tests specific for each agent were performed in human plasma, anti-factor Xa activity (chromogenic); modified TT for thrombin inhibitors; vitamin K antagonists were tested in the rat (CrI: WJ(Han)), anticoagulant activity was monitored as the prothrombin time	<i>In vitro</i> Intravenous (<i>ex vivo</i>)	BI	CTD 4.2.1.2-01_n00237733

BI Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬理試験一覧表（続き）

Test Article: idarucizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD number / Document number
Safety Pharmacology				
Evaluation of respiratory parameters in the conscious male rat using whole body bias flow plethysmography	Rat/Crl:WI(Han)	Intravenous	■■■■	CTD 4.2.1.3-01_U12-3330
Evaluation of central nervous system effects using a modified Irwin screening	Rat/ RceHan TM .WIST	Intravenous	■■■■	CTD 4.2.3.2-02_U12-3327
Evaluation of cardiovascular parameters	Rhesus monkey	Intravenous/oral	■■■■	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328



Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬理試験一覧表（続き）

Test Article: idarucizumab

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	CTD number / Document number
Pharmacodynamic Drug Interactions Influence of coagulation factor concentrates on the inhibition of dabigatran by idarucizumab	A diluted thrombin time assay in human plasma with commercially available coagulation factor concentrates were added to dabigatran in plasma, ability of 3 mg/mL idarucizumab to inhibit dabigatran in presence of these concentrates was tested	<i>In vitro</i>	BI	CTD 4.2.1.4-02_n00238187
Effect of idarucizumab on the prolonged bleeding obtained when antiplatelet (ASA, clopidogrel and ticagrelor) and dabigatran anticoagulant activity is present	Platelet aggregations performed <i>ex vivo</i> with rat platelet rich plasma; Rat tail bleeding time (Crl:WI(Han)) with oral antiplatelet and dabigatran dosing (30 mg/kg); blood samples taken for <i>ex vivo</i> dTT	(<i>Ex vivo</i>) intravenous	BI	CTD 4.2.1.4-01_n00238041

BI Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc.

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 効力を裏付ける試験

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Affinity of BI 655075 for dabigatran, pH dependence and binding to plasma proteins	Idarucizumab, dabigatran, several thrombin substrates	Biacore affinity determinations for binding affinity, on-off rate, complex half-life, Kinexa affinity determinations for pH dependence, surface plasmon resonance (SPR) for selectivity vs several thrombin substrates / No time points	(<i>In vitro</i>) Human plasma, Human serum albumin, buffer	N/A	CTD 4.2.1.1-08_n00231289
Neutralization of the anticoagulant activity of dabigatran and its acylglucuronides by BI 655075 <i>in vitro</i> using a modified thrombin time assay in plasma or whole blood	Idarucizumab, dabigatran, dabigatran acylglucuronides	Measurement of anticoagulation of dabigatran and its acylglucuronides with idarucizumab using modified thrombin time with 0.4 U /mL (plasma), 1.5 U/mL (plasma, whole blood) thrombin: <i>In vitro</i> clotting test / No time points	(<i>In vitro</i>) Human plasma, whole blood N=3-4	D: 7, 30 nM D-glu : 10 nM in plasma I: 0-3 µg/mL	CTD 4.2.1.1-12_n00232054
Effects of dabigatran on platelet interaction and fibrin generation and reversal of its antihemostatic action by procoagulant strategies or a specific antidote (BI 655075): studies <i>in vitro</i> with circulating human blood	Idarucizumab, dabigatran, aPCC, PCC, rFVIIa	Thrombin generation assay (TGA), thromboelastometry studies, perfusion studies/ 10 min, activation of coagulation mechanisms	(<i>In vitro</i>) Human whole blood; N=11 (4 female, 7 male) volunteers	D: 184 ng/mL I: 0.3, 1, 3 mg/mL aPCC: 25, 75 U/kg PCC: 70 IU/kg rFVIIa: 120 µg/kg	CTD 4.2.1.1-14_n00237740

BI 655075, I = idarucizumab

DE = dabigatran etexilate

D = dabigatran

D-glu = dabigatran acylglucuronides

2.6.3 薬理試験概要表

イダルシズマブ（遺伝子組換え）

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Lack of potential prothrombotic activity of BI 655075 investigated in human plasma <i>in vitro</i> and in rats <i>in vivo</i>	Idarucizumab, FEIBA	Model 1: Thrombin generation, no time points	(<i>In vitro</i>) Human plasma N=5/conc.	I: 0.5, 1, 3 mg/mL, FEIBA: 0.8 U/mL	CTD 4.2.1.1-07_n00233139
	Idarucizumab	Model 2: Clotting time in prothrombin depleted plasma, no time points	(<i>In vitro</i>) Human plasma N=3/conc.	I: 1, 2, 3 mg/mL	
	Idarucizumab dabigatran	Model 3: Ecarin chromogenic assay, no time points	(<i>In vitro</i>) Human plasma N=2-4/conc.	I: 0.68, 1, 3 mg/mL D: 100 nM	
	Idarucizumab, thrombin	Model 4: Fibrinopeptide assay <i>in vitro</i> , no time points	(<i>In vitro</i>) Human plasma N=3/conc.	I: 1, 2, 3 mg/mL Thrombin: 0.1, 1, 5 pM	
	Idarucizumab, dabigatran etexilate	Model 5: Fibrinopeptide assay 5, 30, 120 min post administration	(<i>Ex vivo</i>) N=3-4/group; rat Ctrl: WI(HAN)	DE: 30 mg/kg p.o. I: 0.69 µmol/kg i.v.	
	Idarucizumab, TRAP-6	Model 6: Platelet aggregation, no time points	(<i>In vitro</i>) Human platelet rich plasma	I: 3.0 mg/mL TRAP-6: 2 µM	

BI 655075, I = idarucizumab

DE = dabigatran etexilate

D = dabigatran

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 効力を裏付ける試験 (続き)

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Neutralization of the anticoagulant activity of dabigatran with BI 655075 after intravenous administration in a rat model of anticoagulation	Idarucizumab, dabigatran	Intravenous administration of dabigatran and reversal with idarucizumab (i.v.) Model: <i>In vivo</i> reversal of circulating anticoagulation Time points: -20, -2, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min post idarucizumab	N=4-10 per group, male rat Crl:WI(HAN)	I: 0.314 µmol/kg i.v. D: 0.3 µmol/kg i.v. bolus + 0.1 µmol/kg/hr i.v. infusion	CTD 4.2.1.1-03_n00226711
Reversal of dabigatran-induced bleeding with BI 655075 after single oral administration of dabigatran etexilate in an <i>in vivo</i> rat tail bleeding model	Idarucizumab, dabigatran etexilate	Administration of dabigatran etexilate (p.o.) and reversal with idarucizumab (i.v.) Model: Rat tail bleeding model Time points: -5, 5, 15, 30, 120 min post idarucizumab	N=6-8 per group, rat Crl:WI(HAN)	I: 0.69 µmol/kg i.v. DE: 30 mg/kg p.o.	CTD 4.2.1.1-04_n00227451
Effects of BI 655075 on dabigatran-induced bleeding and hemorrhagic shock in a porcine blunt liver trauma model	Idarucizumab, dabigatran, dabigatran etexilate	Reversal of dabigatran anticoagulant activity in an ongoing porcine bleeding model after trauma Model: Porcine trauma model Time points: Blood samples: -90, 0, 12, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min post injury Blood loss: 12, 30, 60, 120, 240 min post injury	N=6 per group, 30 male Landrace pigs	DE: 30 mg/kg p.o. bid over 3 days D: 0.77 mg/kg/hr over 30 min and 0.52 mg/kg/hr over 60 min i.v. I: 30, 60 or 120 mg/kg i.v.	CTD 4.2.1.1-11_n00231240

BI 655075, I = idarucizumab
DE = dabigatran etexilate
D = dabigatran

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Reversal of supra-therapeutic dabigatran anticoagulation and subsequent bleeding with BI 655075 in an <i>in vivo</i> rat model	Idarucizumab, dabigatran etexilate	Reversal of dabigatran anticoagulation with idarucizumab given in 2 split doses or one dose in rats Model: Rat tail bleeding model Time points: -5, 5, 15, 30, 120 min post idarucizumab	N=3-6 per group, rat Crl:WI(HAN)	DE: 3x30 mg/kg p.o. 8 hr interval. I: 2x0.7 µmol/kg 12 min apart or 1x1.4 µmol/kg i.v.	CTD 4.2.1.1-05_n00234943
Effects of BI 655075 as a split dose (2 bolus injections 60 min apart) on dabigatran-induced bleeding and hemorrhagic shock in a porcine blunt liver double trauma model	Idarucizumab, dabigatran, dabigatran etexilate	Reversal of dabigatran anticoagulation with idarucizumab given in 2 split doses or one dose in pigs Model: Porcine trauma model Time points: Blood samples: -90, 0, 12, 20, 30, 60, 80, 90, 120, 150, 180, 240, 300 min post injury Blood loss: 10, 30, 60, 70, 90, 120, 180, 240, 300 min post injury	N=6 per group, 18 male Landrace pigs	DE: 30 mg/kg p.o. bid over 3 days D: 0.77 mg/kg/hr over 30 min and 0.52 mg/kg/hr over 60 min i.v. I: 1x 60 mg/kg or 2x60 mg/kg or 120 mg/kg i.v.	CTD 4.2.1.1-10_n00238140

BI 655075, I = idarucizumab
DE = dabigatran etexilate
D = dabigatran

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 効力を裏付ける試験（続き）

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Efficacy of hemostatic therapy with BI 655075 in experimental intracerebral hemorrhage associated with the oral anticoagulant dabigatran etexilate	Idarucizumab, dabigatran etexilate	Reversal of hematoma volume expansion under dabigatran anticoagulation by idarucizumab Model: Tail vein bleeding time to determine hemostatic dose of idarucizumab in mice Time points: 15 min post idarucizumab	N=3-9 per group (bleeding time), N=4-20 per group (ICH), 213 male mice C57BL/6 (age: 10-12 weeks)	DE: 2.25, 4.5, 9 mg/kg i.p. I: 2, 4, 8, 16 µmol/kg i.v.	CTD 4.2.1.1-01_n00237737
Neutralization of dabigatran by BI 655075, the specific antidote for dabigatran, after haemodilution and administration of various volume expanders in a pig model	Idarucizumab, dabigatran, dabigatran etexilate	Reversal of dabigatran anticoagulation with idarucizumab in the presence of 50% hemodilution Model: Porcine hemodilution model Time points: Pre, -150, -60, 0, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 min, 6, 12, 24 hrs post hemodilution	N=5-6 per group, male Landrace pigs	DE: 30 mg/kg p.o. bid over 3 days D: 0.77 mg/kg/hr over 30 min and 0.26 mg/kg/hr over 60 min i.v. I: 30 mg/kg i.v.	CTD 4.2.1.1-09_n00230830

BI 655075, I = idarucizumab
DE = dabigatran etexilate
D = dabigatran
Pre = 2 days prior to initial dose with dabigatran etexilate

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3. 副次的薬理試験

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Lack of effect of the dabigatran-specific antidote BI 655075 on other parenteral and oral anticoagulants in human plasma and in a rat model of coagulation	Idarucizumab, dabigatran, rivaroxaban, apixaban, low molecular weight heparin (LMWH), unfractionated heparin (UFH), melagatran, hirudin	Potential effect of idarucizumab on inhibition of anticoagulant activity of direct factor Xa inhibitors, heparins, warfarin or other direct thrombin inhibitors	(<i>In vitro</i>) Human plasma N=3/conc.	I: 3 mg/mL, 2.5-60 µM D: 7 nM Rivaroxaban: 0-500 ng/mL Apixaban: 0-500 ng/mL LMWH: 0-5.55 µg/mL UFH: 0-2.22 U/mL Melagatran: 10 nM Hirudin: 2 nM Argatroban: 150 nM	CTD 4.2.1.2-01_n00237733
	argatroban	Model 1: <i>in vitro</i> neutralization of anticoagulant activity in specific assays for each inhibitor Time points: N/A			
BI 655075, I = idarucizumab D = dabigatran LMWH = Low molecular weight heparin UFH = Unfractionated heparin	Idarucizumab, warfarin, LMWH	Model 2: Neutralization of warfarin and low molecular weight heparin anticoagulation in rats Time points: -5, 0, 5, 15, 30, 120	N=4-6 per group, rat Crl: WI(HAN)	I: 0.7 µmol/kg i.v. Warfarin: 0.5 mg/kg/day p.o. over 4 days LMWH: 5 mg/kg/hr over 1 hour i.v.	

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4. 安全性薬理試験

Test Article: idarucizumab

Organ Systems Evaluated	Species / Strain	Method of Administration	Doses ^a (mg/kg)	Gender and No. per Group	Noteworthy Finding	GLP Compliance	CTD number / Document number
Respiratory	Rat/Crl:WI(Han)	Intravenous	0, 150, 500	8 males/group	No statistically or biologically relevant effects on respiration rate, tidal volume and minute volume	Yes	CTD 4.2.1.3-01_U12-3330
Central nervous system	Rat/RecHan TM .WIST	Intravenous	0, 150, 500	6 males/group	No treatment related effects recorded for Irwin observations (panel of functional clinical observation, motor activity) @500: C _{max} = 157000 nM, AUC ₍₀₋₂₄₎ = 82700 nM	Yes	CTD 4.2.3.2-02_U12-3327
Cardiovascular	Rhesus monkey	Intravenous/oral	0/0 ^{b,e} 500/0 ^{c,e} 500/12 ^{d,e}	3/sex/group	No treatment related changes in cardiovascular parameters @500/0: C _{max} = 235000 nM, AUC ₍₀₋₂₄₎ = 223000 nM	Yes	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328

a - Single dose unless specified otherwise.

b - Monkeys received oral vehicle on Days 1 – 5 and intravenous vehicle on Days 4 and 5 at 90 minutes after oral dosing.

c - Monkeys received oral vehicle on Days 1 – 5 and 500 mg/kg idarucizumab intravenously on Days 4 and 5 at 90 minutes after oral dosing.

d - Monkeys received 12 mg/kg dabigatran etexilate orally on Days 1 – 5, and 500 mg/kg idarucizumab intravenously on Days 4 and 5 at 90 minutes after oral dosing.

e - ECG recordings began prior to second dose on Day 5 and continued for approximately 6 hours after dosing.

Proprietary confidential information © 2016 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5. 薬力学的薬物相互作用試験

Test Article: idarucizumab

Study	Compound / Control	Methods / Time points	Species/ Strain	Concentration/Dose	Report number
Effect of BI 655075 on bleeding induced by dabigatran in combination with the antiplatelet agents ASA, clopidogrel and ticagrelor	Idarucizumab,	Partial reversal of bleeding time by idarucizumab under dabigatran and antiplatelet therapy Model: <i>Ex vivo</i> aggregation using rat platelet rich plasma: arachidonic acid, adenosine diphosphate, collagen stimuli Time points: 125 min post antiplatelet treatment Model: Rat tail bleeding model Time points: (Blood samples) -5, 5, 15 min, (Bleeding time) 15 min post idarucizumab	<i>(Ex vivo)</i> N=3-6 per group, rat Crl:WI(HAN)	I: 0.7 µmol/kg i.v.	CTD
	dabigatran etexilate, ASA,			DE: 30 mg/kg p.o. ASA: 100 mg/kg p.o.	4.2.1.4-01_n002 38041
	Clopidogrel, Ticagrelor			Clopidogrel: 4 mg/kg p.o. Ticagrelor: 3 mg/kg p.o.	
Inhibition of dabigatran anticoagulant activity by BI 655075 in the presence of coagulation factor concentrates <i>in vitro</i>	Idarucizumab,	Potential effect of coagulation factor concentrates on the inhibition of dabigatran anticoagulation by idarucizumab Model: Diluted thrombin time Time points: N/A	<i>(In vitro)</i> Human plasma N=2-6 / conc.	I: 3 mg/mL	CTD
	dabigatran, PCC,			D: 50, 125, 250, 500, 1000 ng/mL	4.2.1.4-02_n002 38187
	aPCC, rFVIIa			PCC: 1 U/mL aPCC: 1 U/mL rFVIIa: 100 nM	

ASA = acetylsalicylic acid
BI 655075, I = idarucizumab
DE = dabigatran etexilate
D = dabigatran