Boehringer Ingelheim

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：	2.6.4 薬物動態試験の概要文
文書作成日：	17 August 2016

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

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

目　次

目　次 2
1.　まとめ 5
2.　分析法 9
2.1　イダルシズマブの定量法 9
2.1.1　ラット血漿中イダルシズマブの定量 10
2.1.2　サル血漿中イダルシズマブの定量 11
2.1.3　ブタ血漿中イダルシズマブの定量 12
2.1.4　ラット尿中イダルシズマブの定量 12
2.1.5　サル尿中イダルシズマブの定量 13
2.2　ダビガトラン及び総ダビガトランの定量法 13
2.2.1　ラット血漿中ダビガトランの定量 14
2.2.2　サル血漿中ダビガトラン及び総ダビガトランの定量 15
2.2.3　ブタ血漿中総ダビガトランの定量 16
2.2.4　ラット尿中ダビガトランの定量 16
2.2.5　サル尿中ダビガトラン及び総ダビガトランの定量 17
2.3　抗イダルシズマブ抗体の検出法 18
2.3.1　ラット血漿中抗イダルシズマブ抗体の検出 18
2.3.2　サル血漿中抗イダルシズマブ抗体の検出 19
2.3.2.1　検出法 1 19
2.3.2.2　検出法 2 19
2.4　サル血漿中抗ダビガトラン抗体の検出法 20
2.4.1　サル血漿中抗ダビガトラン抗体の検出 20
2.4.2　サル血漿中抗ダビガトラン中和抗体の検出 21
2.5　バイオマーカーアッセイ：抗凝固活性及び血栓形成促進活性 21
2.5.1　ラット血漿中ダビガトランの抗凝固活性測定 21
2.5.2　サル血漿中ダビガトランの抗凝固活性測定 22
2.5.3　サル血漿中血栓形成促進活性を評価するための D-ダイマー及び F1+2 測定 22
2.5.3.1　D-ダイマー測定 23
2.5.3.2　F1+2 測定 24
3.　吸収，薬物動態及び薬力学 26
3.1　ラットにおけるイダルシズマブ及びダビガトラン単独又は併用投与後の薬物動態 26
3.2　サルにおけるイダルシズマブの薬物動態，並びにダビガトランの薬物動態及び PK/PD に及ぼすイダルシズマブの影響 28
3.2.1　試験デザイン 29
3.2.2　サルにおけるイダルシズマブの薬物動態 30
3.2.3　イダルシズマブを投与したサルにおけるダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態 31

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

3.2.4 サルにおけるダビガトランの抗凝固活性に対するイダルシズマブの中和効果.....32
3.3 サルにダビガトランエテキシラートを前経口投与した後にイダルシズマブを単回及び反復投与する PK/PD 試験.....34
3.3.1 試験デザイン.....34
3.3.2 サルにおけるイダルシズマブの薬物動態.....35
3.3.3 サルにおけるダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態に及ぼすイダルシズマブの影響.....36
3.3.4 サルにおけるイダルシズマブによる抗凝固作用の中和効果.....38
3.4 イダルシズマブとダビガトラン間の相互作用を記述するモデルの開発.....39
3.5 反復投与後のトキシコキネティクス.....42
4. 分布.....44
5. 代謝.....45
6. 排泄.....46
6.1 ラットにおけるイダルシズマブ及びダビガトランを単独又は併用投与したときの尿中排泄.....46
6.2 サルにおけるイダルシズマブの尿中排泄及びダビガトランとの相互作用.....47
6.3 サルにおけるイダルシズマブ及びダビガトランの尿中排泄.....47
7. 薬物動態学的薬物相互作用.....49
8. その他の薬物動態試験.....50
8.1 ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの薬物動態及び尿中排泄に及ぼす腎機能障害の影響.....50
8.2 ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの PK/PD に及ぼす腎機能障害の影響.....52
9. 考察及び結論.....54

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

略語一覧及び用語の定義

aPTT	activated partial thromboplastin time	活性化部分トロンボプラスチン時間
AUC_{0-t}	area under the concentration-time curve from time 0 to time t	投与後時間 0 から t までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	area under the concentration-time curve from time zero to infinity	投与後時間 0 から無限大時間まで外挿した血漿中濃度－時間曲線下面積
CL	clearance	全身クリアランス
C_{max}	maximum concentration	最高血漿中濃度
CV	coefficient of variation	変動係数
dTT	(Hemoclot®) diluted thrombin time	（Hemoclot®）希釈トロンビン時間
ECL	electrochemiluminescence	電気化学発光
ECT	ecarin clotting time	エカリン凝固時間
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素結合免疫吸着測定
F1+2	prothrombin fragment 1+2	プロトロンビンフラグメント 1+2
Fab	monoclonal antibody fragment	モノクローナル抗体フラグメント
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
FEU	fibrinogen equivalent units	フィブリノーゲン換算量
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
HES	hydroxyethyl starch	ヒドロキシエチルデンプン
HRP	horseradish peroxidase	ホースラディッシュペルオキシダーゼ
ICH	International Conference on Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IV	intravenous	静脈内
K_3EDTA	tri-potassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸三カリウム
kDa	kiloDalton	キロダルトン
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
IgG	immunoglobulin G	免疫グロブリン G
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
LLQC	lower limit quality control	定量下限 QC
MRT	mean residence time	平均滞留時間
MSD	meso-scale discovery	メソスケールディスカバリー
m/z	mass per charge number	質量電荷比
n	sample size	標本数，症例数
NA	not applicable	該当せず
PD	pharmacodynamics	薬力学
PK	pharmacokinetics	薬物動態
PO	per os (oral administration)	経口
QC	quality control	品質管理
RIPA	radio-immunoprecipitation assay	放射性免疫沈降法
Ru	ruthenium	ルテニウム
SD	standard deviation	標準偏差
SOP	standard operating procedure	標準操作手順書
$t_{1/2}$	half-life	半減期
t_{max}	time to reach maximum concentration (C_{max})	最高血漿中濃度（C_{max}）到達時間
TK	toxicokinetics	トキシコキネティクス
TT	thrombin time	トロンビン時間
ULQC	upper limit quality control	定量上限 QC
V_{ss}	steady-state volume of distribution	定常状態における分布容積

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

1. まとめ

イダルシズマブ（開発コード：BI 655075）はダビガトランに特異的かつ高い親和性で結合し，その抗凝固作用を中和させることを意図して設計されたヒト化モノクローナル抗体フラグメント（Fab）である。Fab は完全長抗体と比べて半減期が短いことから，イダルシズマブ－ダビガトラン複合体は速やかに消失することが期待されるため，ダビガトランの中和剤として Fab を選択した。イダルシズマブ及びイダルシズマブ－ダビガトラン複合体は分子量がそれぞれ 47.8 及び 48.3 kDa であり，腎糸球体で濾過されるのに十分な低分子である。イダルシズマブ及びイダルシズマブ－ダビガトラン複合体は，腎糸球体濾過に続いて，腎尿細管上皮での再取込み及び異化作用又は尿中への直接排泄によって消失する。

イダルシズマブ，ダビガトラン及び総ダビガトラン（ダビガトランとその活性代謝物であるグルクロン酸抱合体の合計）を定量するための分析法を開発した。また，抗イダルシズマブ抗体及び抗ダビガトラン抗体を検出するための分析法，並びにダビガトランによる抗凝固活性及び血栓形成促進活性を測定するための分析法も開発した。GLP 適用毒性試験にはバリデートされた分析法を用いた。

イダルシズマブの非臨床薬物動態試験の概要を表 1: 1 に示す。大部分の試験において，イダルシズマブとダビガトラン間の相互作用を検討した。ラット及びサルにダビガトランの前投与あり又はなしでイダルシズマブを静脈内投与したときの薬物動態プロファイル及び尿中排泄を検討した。また，ラットにダビガトランを静脈内投与及びサルにダビガトランエテキシラート（ダビガトランのプロドラッグ）を経口投与したときの PK/PD に対するイダルシズマブの影響を検討した。なお，サル試験では，投与期の間にウォッシュアウト期間を設け複数の投与期で実施したことから，免疫原性及び PK/PD に対する免疫原性の影響についても評価した。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に対するイダルシズマブの中和効果は，凝固試験から評価した。さらに，5/6 腎摘出ラットモデルを用いて，ダビガトラン及びイダルシズマブの PK/PD 及び尿中排泄に対する腎機能障害の影響についても検討した。その他の薬効薬理試験については薬理試験の概要文［CTD 2.6.2］，単回及び反復投与時のトキシコキネティクス並びに免疫原性については毒性試験の概要文に記載する［CTD 2.6.6］。

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

表 1: 1 非臨床薬物動態試験の概要

Species, strain *(Idarucizumab lot#)*	Type of study	Test article (Dose route)	Dose level (mg/kg)	Report no.
Rat, Crl:WI(Han) *(Lot: DAB-314-09)*	PK	Dabigatran (IV)	0.2	CTD 4.2.2.2-01_U12-3083
		Idarucizumab (IV)	20	
		Dabigatran (IV) + Idarucizumab (IV)	0.2 +20	
	Urinary excretion	Dabigatran (IV)	0.2	
		Idarucizumab (IV)	20	
		Dabigatran (IV) + Idarucizumab (IV)	0.2 +20	
Rat, Crl:WI(Han): renally impaired & sham-operated *(Lot: E2736F01)*	PK	Dabigatran (IV)	0.2	CTD 4.2.2.7-01_U13-3340
		Idarucizumab (IV)	20	
	Urinary excretion	Dabigatran (IV)	0.2	
		Idarucizumab (IV)	20	
Rat, Crl:WI(Han): renally impaired, sham-operated, and normal *(Lot: DAB-FTOX-02)*	PK/PD	Dabigatran (IV)	0.4	CTD 4.2.2.7-02_U13-3577
		Dabigatran (IV) + Idarucizumab (IV)	0.4 +20	
			0.4 +40	
Monkey, Rhesus (Lot: E1739F01)	3-phase dose escalating exploratory PK/PD, urinary excretion	Vehicle (PO)+Vehicle (IV)	0 (control)	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326
		Vehicle (PO) + Idarucizumab (IV)	30, 90, 175	
		Dabigatran etexilate (PO) + Idarucizumab (IV) a	12 +30, 90, 175	
Monkey, Rhesus (Lot: E2739F01)	3-phase PK/PD (various regimens), urinary excretion	Dabigatran etexilate (PO) + Idarucizumab (IV) b	12+30, 12+30×2	CTD 4.2.2.2-04_U12-3849[c] CTD 4.2.2.2-05_U13-3539[B]
			12+60, 12+60×2	

[a] PK/PD 及び用量設定の併合試験。3 つの各投与期にダビガトランエテキシラートを 1 日 1 回 4 日間経口投与し，各投与期の 4 日目のダビガトランエテキシラート投与 1.5 時間後にイダルシズマブを静脈内投与した。PK/PD 試験の結果については本概要文，用量設定試験の結果については毒性試験の概要文 CTD 2.6.6_3.2.2 項に示す。
[b] 3 つの各投与期にダビガトランエテキシラートを 1 日 1 回 4 日間経口投与し，各投与期の 4 日目のダビガトランエテキシラート投与 1.5～3 時間後にイダルシズマブを 1 又は 2 回静脈内投与した。
[c] 動物試験部分。
[d] PK/PD 部分。

ラット及びサルにおいて，静脈内投与したイダルシズマブは短い初期半減期及び中等度の終末相半減期を有する二相性の血漿中濃度－時間推移を示し，主に初期相で速やかに消失した。イダルシズマブの全身クリアランス（CL）は全用量及び全投与期を通して大きな違いはなかった。定常状態における分布容積（V_{ss}）は小さく，血漿容積をわずかに上回る程度であった。イダルシズマブの尿中排泄率は投与量の約 10～20%であり，残りの 80～90%は異化作用によって消失すると推定された。イダルシズマブの血漿中動態及び尿中排泄率はダビガトランの前投与により影響されなかったことから，イダルシズマブ－ダビガトラン複合体の分布及び排泄動態はイダルシズマブと同様であることが示された。

中等度の腎機能障害を表す動物モデルである 5/6 腎摘出ラットを使用したとき，イダルシズマブの CL は偽処置ラットに比べて 56%低下したことから，イダルシズマブの排泄において腎臓が

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

重要な役割を果たしていることが示唆された。この結果は，分子量が 60 kDa 未満のタンパク質の排泄に主に腎臓における異化作用が大きく寄与していることを示した文献と一致している［CTD 4.3-09_R13-0058］。すなわち，5/6 腎摘出ラットでみられたイダルシズマブの CL の大きな低下は，糸球体濾過速度が低下したことを示していると考えられた。糸球体濾過速度は，イダルシズマブの尿細管上皮での再取込み及び異化作用，並びに尿中へのイダルシズマブの直接排泄を含むすべての腎クリアランスの律速段階である。ラットにおいて，イダルシズマブ未変化体の尿中への排泄は主要な排泄経路ではないことから（投与量の約 15%），5/6 腎摘出ラットモデルで観察されたイダルシズマブの大幅な CL の低下は主に腎臓での異化クリアランスの低下によると考えられた。

動物種において，ダビガトランは代謝されて複数のグルクロン酸抱合体を生成したが，その程度は動物種によって様々であった。これらのグルクロン酸抱合体の抗凝固活性はダビガトランとほぼ同等であり，イダルシズマブに対する結合親和性も同程度であった［CTD 2.6.2_2.2.1 項］。ラット血漿中ではダビガトランのグルクロン酸抱合体は未変化体に比べて無視できる程度しか存在しないので［CTD 4.2.2.2-03_U04-1627］，ラットではダビガトランの血漿中濃度のみを測定した。一方，サル血漿中では複数のグルクロン酸抱合体が高濃度に存在し，抗凝固活性を示すことから，ダビガトラン及び総ダビガトラン（非抱合型ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の合計）濃度を測定した。イダルシズマブを投与すると，凝固試験により測定した活性型（イダルシズマブ非結合型）ダビガトランの血漿中濃度はイダルシズマブの用量依存的に低下したが，これと同時に，ダビガトラン及び総ダビガトランの血漿中濃度の上昇が認められた。これは，イダルシズマブとダビガトランの速やかな結合により，血漿中でイダルシズマブ－ダビガトラン複合体及びイダルシズマブ－ダビガトラングルクロン酸抱合体複合体が生成し，組織から血漿へダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の再分布が起こったことを示している。また，イダルシズマブを投与しても，ラットにおけるダビガトランの尿中排泄率及びサルにおける総ダビガトランの尿中排泄率に変化はみられなかった。

サルにおいて，血漿中に総ダビガトランと等モル濃度以上のイダルシズマブが存在すると，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は迅速かつ完全に中和された。イダルシズマブの低用量群において，血漿中でダビガトランの抗凝固活性が再出現したが，その際にはイダルシズマブが総ダビガトランよりモル濃度で下回っていた。イダルシズマブの高用量投与又はイダルシズマブの追加投与によって，ダビガトランの抗凝固活性は 24 時間にわたり完全に中和された。サルの PK/PD データを用いて，イダルシズマブとダビガトラン間の相互作用を記述するための semi-mechanistic モデルを開発した。このモデルを用いて，ヒトにイダルシズマブを投与したときの PK/PD 及び有効な投与量を推定することができた。

要約すると，血漿中のイダルシズマブはダビガトラン及び抗凝固活性を有するグルクロン酸抱合体に速やかに結合し，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用量依存的に抑制した。血漿中のイダルシズマブは速やかに消失し，投与量の約 10～20%が尿中に排泄され，残りは主に腎臓で起こる異化作用によって消失すると推定された。イダルシズマブの分布及び排泄動態はダビガトランの存在により影響されなかったが，ダビガトラン及びそのグルクロン酸の

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

分布及び排泄動態は一度イダルシズマブに結合した後はイダルシズマブによって制御されることが示された。

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

2. 分析法

非臨床試験で用いた分析法の概要を表 2: 1 に示す。これらの分析法には，イダルシズマブ，ダビガトラン及び総ダビガトランの血漿及び尿中濃度測定法に加えて，血漿中の抗イダルシズマブ抗体及び抗ダビガトラン抗体を検出するための分析法，並びに血漿中の抗凝固活性及び血栓形成促進活性を測定するための分析法も含まれている。

表 2: 1 非臨床試験で使用した分析法 [a]

Analyte	Matrix	Species, strain	Assay format	Validation report no.
Idarucizumab	Plasma	Rat, Crl:WI(Han)	ELISA	CTD 4.2.2.1-02_U12-3608
		Monkey, Rhesus	ELISA	CTD 4.2.2.1-03_U12-3423
		Pig, Landrace	ELISA	NA [b]
	Urine	Rat, Crl:WI(Han)	ELISA	NA [b]
		Monkey, Rhesus	ELISA	NA [b]
Dabigatran	Plasma	Rat, Crl:WI(Han)	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-04_U12-1251
		Monkey, Rhesus	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-05_U12-1327
	Urine	Rat, Crl:WI(Han)	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-08_U12-1501
		Monkey, Rhesus	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-09_U12-1500
Sum dabigatran c	Plasma	Monkey, Rhesus	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-06_U12-1328
	Urine	Monkey, Rhesus	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-10_U12-1587
	Plasma	Pig, Landrace	LC-MS/MS	CTD 4.2.2.1-07_U13-1328
Anti-idarucizumab antibodies	Plasma	Rat, Crl:WI(Han)	ECL	CTD 4.2.2.1-11_U13-3028
		Monkey, Rhesus	ECL	CTD 4.2.2.1-12_U13-3029 CTD 4.2.2.1-14_n00231001
Anti-dabigatran antibodies	Plasma	Monkey, Rhesus	Radio immunoprecipitation	CTD 4.2.2.1-16_n00237363
Neutralizing anti-dabigatran antibodies	Plasma	Monkey, Rhesus	Modified thrombin clotting time	CTD 4.2.2.1-17_n00233140
Biomarker: anticoagulant activity	Plasma	Rat, Crl:WI(Han)	dTT, aPTT, ECT	CTD 4.2.2.1-19_U13-1409
		Monkey, Rhesus	dTT, aPTT, ECT	CTD 4.2.2.1-18_U12-1035
Biomarker: D-dimer (prothrombosis)	Plasma	Monkey, Rhesus	ELISA	CTD 5.3.1.4-27_n00237426
Biomarker: F1+2 (prothrombosis)	Plasma	Monkey, Rhesus	ELISA	CTD 4.2.2.1-20_n00237010

[a] 分析法の妨害に関する追加試験の報告書は本表に含まれていないが，2.1~2.3 項に記載する。
[b] NA：該当せず。本分析法は GLP 非適用試験のみに使用されたことから，バリデーション報告書はなく，各 GLP 非適用報告書に合わせて記載する。
[c] 総ダビガトラン（ダビガトラン+その複数のグルクロン酸抱合体）。なお，グルクロン酸抱合体はダビガトランと同程度の抗凝固活性を有する。

2.1 イダルシズマブの定量法

酵素結合免疫吸着測定（ELISA）法を用いて，ラット，ブタ及びサルの血漿試料，並びにラット及びサルの尿試料中のイダルシズマブ濃度を定量した。本概要文において，イダルシズマブとは総イダルシズマブ（ダビガトランとの結合型及び非結合型の合計）を意味する。GLP 適用試験にはバリデートした ELISA 法を使用し，GLP 非適用試験には適格性を確認した ELISA 法又はバリデートした ELISA 法を使用した。

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

ラット及びサルの GLP 適用試験から得られた血漿試料中のイダルシズマブの定量に使用した ELISA 法は，GLP 適用下で生体試料を免疫測定する際に適用されるすべての社内 SOP に準じてバリデートした。バリデートしたすべての分析法の真度及び精度は，定量下限（LLOQ）及び定量上限における QC 試料については 25%以内，その他の濃度の QC 試料については 20%以内という許容基準範囲内であった。

最初にマイクロタイタープレートに抗ヒト IgG 抗体を添加して一晩放置することによりコーティングした。次に，このコーティングプレートのブロッキング及び洗浄を行い，希釈した検量線用標準試料及びアンカーポイント試料，ブランク試料，QC 試料及び測定検体を添加してインキュベートした。インキュベーション後，ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を添加した。結合した HRP 標識抗体をテトラメチルベンジジンとともにインキュベートし，プレートリーダーを用いて比色定量した。検出したシグナル強度は，試料中に存在するイダルシズマブ量に比例した。4 パラメータロジスティックモデルを用いて検量線を作成した。

ELISA 法によるイダルシズマブの定量に対するダビガトランの影響について，ラット（Crl:WI(Han)）の血漿及び尿，並びにサル（アカゲ）の血漿及び尿にダビガトランを添加した場合と添加しなかった場合の結果を比較することにより検討した。添加したダビガトランとイダルシズマブのモル濃度比は，検討したすべての生体試料について，1：10～10：1 の範囲とした。検討したいずれの生体試料についても，添加したダビガトランによりイダルシズマブ定量値の真度及び精度に影響が生じることはなかった［CTD 4.2.2.1-01_n00236666］。

GLP 適用・非適用にかかわらず，イダルシズマブの分析に使用したすべての装置について，正確に機能することを定期的に確認し，該当するすべての社内 SOP に従って適切に維持管理した。

2.1.1 ラット血漿中イダルシズマブの定量

ラット（Crl:WI(Han)）から抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取した血漿中のイダルシズマブ濃度を測定するための ELISA 法を開発し，限定的妥当性を評価し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-02_U12-3608］。バリデーションされた分析法の LLOQ は 100 ng/mL であり，精度及び真度は許容基準を満たした。また，プロゾーン効果や希釈による影響も認められなかった。ラット血漿中イダルシズマブに対して選択性を示すことが示された。ラット血漿中イダルシズマブは，室温で少なくとも 24 時間，冷蔵保存下で 7 日間，5 回の凍結／融解サイクル，並びに-80°C の長期保存下で 90 日間にわたり安定であった。

フルバリデーションを行う前に，最初に LLOQ 15.6 ng/mL の ELISA 法を開発し，その限定的妥当性を評価した。ラットを用いた以下の GLP 非適用試験，すなわち，単回投与毒性試験［CTD 4.2.3.1-01_U12-3325］，PK 試験［CTD 4.2.2.2-01_U12-3083］及びダビガトランの抗凝固作用に対する中和効果を評価する最初の PD 試験［CTD 4.2.1.1-03_n00226711］には，限定的妥当性を評価した分析法を用いた。その後の GLP 適用試験及び PD 試験を除く GLP 非適用試験では，バリデートした分析法を使用した。5/6 腎摘出ラットの血漿を用いて調製した QC 試料を，正常ラットの血漿を用いて調製した検量線用標準試料を用いて正確に測定することが可能であり，マトリックス効果がないことが示された。したがって，正常ラット，偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラッ

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

ト由来の試料を分析する際，正常ラットから採取した血漿を用いて調製した検量線用標準液を使用した。

ラット血漿中イダルシズマブ濃度を測定した試験の一覧を表 2.1.1: 1 に示す。

表 2.1.1: 1　　ラット血漿中イダルシズマブ濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Single dose toxicity study	Non-GLP	11R091	CTD 4.2.3.1-01_U12-3325[a]
PK study	Non-GLP	dm-11-1095	CTD 4.2.2.2-01_U12-3083[a]
PD study: reversal of anticoagulant activity	Non-GLP	MD2013/05/PPSS	CTD 4.2.1.1-03_n00226711[a]
PK study in renally impaired rat	Non-GLP	dm-12-1102	CTD 4.2.2.7-01_U13-3340[b]
PK/PD study in renally impaired rats	Non-GLP	dm-13-1030	CTD 4.2.2.7-02_U13-3577[b]
PD study: reversal of bleeding	Non-GLP	MD2013/06/PPSS	CTD 4.2.1.1-04_n00227451[a]
4-week toxicity study	GLP	11R141	CTD 4.2.3.2-02_U12-3327[b]

[a] バリデーション前の限定的妥当性を評価した分析法を使用した。
[b] バリデートした分析法を使用した。

2.1.2　　サル血漿中イダルシズマブの定量

サル（アカゲ）から抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取した血漿中のイダルシズマブ濃度を測定するための ELISA 法を開発し，限定的妥当性を評価し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-03_U12-3423］。バリデーションされた分析法の LLOQ は 50.0 ng/mL であり，精度及び真度は許容基準を満たした。また，プロゾーン効果や希釈による影響も認められなかった。サル血漿中のイダルシズマブに対して選択性を示すことが示された。サル血漿中のイダルシズマブは，室温で少なくとも 24 時間，冷蔵保存下で 7 日間，5 回の凍結／融解サイクル，並びに-80°C の長期保存下で 584 日間にわたり安定であった。

フルバリデーションを行う前に，最初に LLOQ 7.8 ng/mL の ELISA 法を開発し，その限定的妥当性を評価した。本法はサルを用いた最初の GLP 非適用予備試験［CTD 4.2.3.2-01_U12-3326］に使用した。その後の GLP 適用毒性試験及び GLP 非適用 PK/PD 試験では，すべてバリデートした分析法を使用した。

サル血漿中イダルシズマブ濃度を測定した試験の一覧を表 2.1.2: 1 に示す。

表 2.1.2: 1　　サル血漿中イダルシズマブ濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Escalating dose exploratory study	Non-GLP	11R090	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326[a]
PK/PD study	Non-GLP	dm-12-1103	CTD 4.2.2.2-05_U13-3539[b]
2-dose toxicity study	GLP	11R149	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328[b]
2-dose toxicity study, renal focus	GLP	12R169	CTD 4.2.3.2-04_U13-3538[b]
2-week toxicity study	GLP	13R093	CTD 4.2.3.2-05_n00230533[b]

[a] バリデーション前の限定的妥当性を評価した分析法を使用した。
[b] バリデートした分析法を使用した。

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

2.1.3 ブタ血漿中イダルシズマブの定量

ブタ（Landrace）から抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取した血漿中のイダルシズマブ濃度を測定するための ELISA 法を開発し，限定的妥当性を評価した。本法の LLOQ は 150 ng/mL であった。50%ブタ血漿／50%血漿増量剤（検討した血漿増量剤は，4% ゼラチン，リンガー液，6% HES 130/0.4 及び 6% HES 200/0.6 を含む）を用いて調製した QC 試料の濃度を，100%ブタ血漿を用いて作成した検量線から正確に測定できることが示された。したがって，すべてのブタ血漿試料について，100%ブタ血漿を用いて調製した検量線用標準液を用いてイダルシズマブ濃度を定量した。

ブタ血漿中イダルシズマブ濃度を測定した試験の一覧を表 2.1.3: 1 に示す。

表 2.1.3: 1 ブタ血漿中イダルシズマブ濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Neutralization of dabigatran by idarucizumab in pigs with hemodilution	Non-GLP	MD2013/07/PPSS/ 2012-008A	CTD 4.2.1.1-09_n00230830
Effects of idarucizumab on dabigatran-induced bleeding and hemorrhagic shock in a porcine blunt liver trauma model	Non-GLP	MD2013/08/PPSS	CTD 4.2.1.1-11_n00231240
Effects of idarucizumab as a split dose on dabigatran-induced bleeding and hemorrhagic shock in a porcine trauma model	Non-GLP	MD2014/12/PPSS	CTD 4.2.1.1-10_n00238140

2.1.4 ラット尿中イダルシズマブの定量

ラット（Crl:WI(Han)）の尿中イダルシズマブ濃度を測定するための ELISA 法を開発し，限定的妥当性を評価した。ラットブランク尿を用いて検量線用標準試料及びQC試料を調製したことと，抗ヒト IgG 抗体のコーティング濃度を少し変更したことを除いて，ラット血漿中濃度測定法と同一である（2.1.1 項）。

最初の PK 試験由来の試料測定用に，LLOQ 15.6 ng/mL の ELISA 法を開発して，限定的妥当性を評価した［CTD 4.2.2.2-01_U12-3083］。腎機能障害モデルラットを用いた PK/PD 試験由来の試料については，分析法の LLOQ を 50.0 ng/mL に変更した［CTD 4.2.2.7-01_U13-3340］。分析法の開発中，正常ラット由来の尿と比較して，5/6 腎摘出ラット由来の尿ではマトリックス効果が認められた。したがって，正常ラット及び 5/6 腎摘出ラット由来の尿それぞれについて，正常ラット又は 5/6 腎摘出ラット由来の尿を用いて別々に標準試料を調製することとした。

ラット尿中イダルシズマブ濃度を測定した試験の一覧を表 2.1.4: 1 に示す。

表 2.1.4: 1 ラット尿中イダルシズマブ濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
PK study	Non-GLP	dm-11-1095	CTD 4.2.2.2-01_U12-3083
PK study in renally impaired rat	Non-GLP	dm-12-1102	CTD 4.2.2.7-01_U13-3340

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

2.1.5 サル尿中イダルシズマブの定量

サル（アカゲ）の尿中イダルシズマブ濃度を測定するための ELISA 法を開発し，限定的妥当性を評価した。サルブランク尿を用いて検量線用標準試料及び QC 試料を調製したことを除いて，サル血漿中濃度測定法と同一である（2.1.2 項）。本法の LLOQ は 25.0 ng/mL であった。

サル尿中イダルシズマブ濃度を測定した試験の一覧を表 2.1.5: 1 に示す。

表 2.1.5: 1 サル尿中イダルシズマブ濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Escalating dose exploratory study	Non-GLP	11R090	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326
PK/PD study	Non-GLP	dm-12-1103	CTD 4.2.2.2-05_U13-3539

2.2 ダビガトラン及び総ダビガトランの定量法

イダルシズマブの存在下及び非存在下，ラット及びサルの血漿及び尿中のダビガトラン濃度を測定するための LC-MS/MS 法を開発し，バリデーションを行った。また，イダルシズマブの存在下及び非存在下で，サル血漿，ブタ血漿，並びにサル尿中の総ダビガトラン（ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の合計）濃度を測定するための LC-MS/MS 法も開発し，バリデーションを行った。本分析法では，イダルシズマブが存在しても，ダビガトラン及び総ダビガトランの定量に対する影響はないことが示された。

ダビガトランを定量する場合，アルカリ加水分解処理することなく LC-MS/MS 法で測定したが，総ダビガトランを定量する場合は，ダビガトランのグルクロン酸抱合体をアルカリ処理により脱抱合した後に LC-MS/MS 法で測定した。また，下記の試料処理法（HCl の添加）により，ダビガトランがイダルシズマブ及び血漿蛋白から解離するため，イダルシズマブ及び血漿蛋白が存在しても，抽出回収率に影響はないと考えられる。したがって，本 LC-MS/MS 法により，イダルシズマブ及び血漿蛋白との結合型及び非結合型を併せた「ダビガトラン」及び「総ダビガトラン」を定量することが可能である。

すべての生体試料中のダビガトラン及び総ダビガトランの LC-MS/MS 法に適用される試料処理法は，以下のとおりである。

- 同位体標識内部標準物質である[$^{13}C_6$]ダビガトランを一定量の試料に添加する。
- ダビガトランアシルグルクロン酸抱合体のアルカリ処理による脱抱合を促進させるため，NaOH を添加してインキュベートする。この操作は，総ダビガトラン濃度を定量する際のみに適用され，抱合されていないダビガトラン濃度を定量する際には省略する。
- イダルシズマブ及び血漿蛋白からダビガトランを解離させるため，試料に HCl を添加して酸性化する。
- オンライン固相抽出法（カラムスイッチング）により試料を抽出する。
- 分析用の逆相カラムを用いて試料を分析する。
- 多重反応モニタリングモードの MS/MS 法を用いて，ダビガトラン及び内部標準物質について，それぞれ m/z 472 → 289 及び m/z 478 → 295 のプリカーサーイオンからプロダクトイオンへの生成をモニターすることにより，ダビガトランを定量する。さらに，ダビガトランの

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

グルクロン酸抱合体を定性的に測定する場合，m/z 648 → 289 の生成をモニターする。総ダビガトランを定量する際には，アルカリ処理後にダビガトラングルクロン酸抱合体のピークがないことを確認する。

イダルシズマブ存在下及び非存在下で検討したすべての LC-MS/MS 法において，あらかじめ設定した許容基準（すなわち，LLOQ での真度及び精度は 20%以内で，その他の濃度での真度及び精度は 15%以内）を満たしていることを確認した。

2.2.1 ラット血漿中ダビガトランの定量

ラットでのダビガトラングルクロン酸抱合体の血漿中濃度は，ダビガトランの血漿中濃度と比較して無視できる程度である［CTD 4.2.2.2-03_U04-1627］。したがって，抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取したラット（Crl:WI(Han)）血漿中のダビガトラン濃度を測定するための LC-MS/MS 法のみバリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-04_U12-1251］。バリデーションはダビガトラン濃度 4.00～400 ng/mL（8.48～848 nM）の範囲で実施した。イダルシズマブ存在下及び非存在下での LLOQ 試料，低濃度，中濃度及び高濃度 QC 試料（4.00，12.0，80.0 及び 320 ng/mL）における日内精度（n=6）（変動係数：%CV）及び真度（バイアス：%Bias）の最大値を表 2.2.1: 1 に示す。

表 2.2.1: 1 イダルシズマブ存在下及び非存在下におけるラット血漿中ダビガトラン定量法の精度及び真度

Analyte: dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	1.43	-3.04
With 4.8 µg/mL idarucizumab	2.16	-3.79
With 480 µg/mLidarucizumab	2.02	-4.58

バリデーション試験の結果は，真度，精度，選択性，直線性及び回収率における許容基準を満たしていた。ラット血漿中のダビガトランは，室温で少なくとも 6 時間，4°C で 6 日間（オートサンプラー中の処理後試料），3 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-20 ± 5°C）で 278 日間にわたり安定であった。本法を用いて，表 2.2.1: 2 に示す 3 つの PK 及び PK/PD 試験の血漿中ダビガトラン濃度を測定した。また，表 2.2.1: 2 に示す 2 つの PD 試験では，LLOQ を 1 ng/mL に変更した LC-MS/MS 法を使用した。

表 2.2.1: 2 ラット血漿中ダビガトラン濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
PK study	Non-GLP	dm-11-1095	CTD 4.2.2.2-01_U12-3083
PK study in renally impaired rat	Non-GLP	dm-12-1102	CTD 4.2.2.7-01_U13-3340
PK/PD study in renally impaired rats	Non-GLP	dm-13-1030	CTD 4.2.2.7-02_U13-3577
PD study: reversal of anticoagulant activity	Non-GLP	MD2013/05/PPSS	CTD 4.2.1.1-03_n00226711
PD study: reversal of bleeding	Non-GLP	MD2013/06/PPSS	CTD 4.2.1.1-04_n00227451

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

2.2.2 サル血漿中ダビガトラン及び総ダビガトランの定量

抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取したサル（アカゲ）血漿中のダビガトラン［CTD 4.2.2.1-05_U12-1327］及び総ダビガトラン（グルクロン酸抱合体のアルカリ脱抱合処理あり）［CTD 4.2.2.1-06_U12-1328］濃度を測定するための LC-MS/MS 法を開発し，バリデーションを行った。両測定法とも，濃度範囲 4.00～400 ng/mL（8.48～848 nM）でバリデーションを実施した。イダルシズマブ存在下及び非存在下での LLOQ 試料, 低濃度, 中濃度及び高濃度 QC 試料（4.00, 12.0，80.0 及び 320 ng/mL）における日内精度（n=18）（%CV）及び真度（%Bias）の最大値を表 2.2.2: 1 に示す。

表 2.2.2: 1 イダルシズマブ存在下及び非存在下におけるサル血漿中ダビガトラン定量法の精度及び真度

Analyte: dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	2.40	-4.33
With 4.8 µg/mL idarucizumab	2.67	-4.07
With 480 µg/mLidarucizumab	2.39	-3.94
Analyte: sum dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	2.12	-6.32
With 4.8 µg/mL idarucizumab	2.51	-6.95
With 480 µg/mLidarucizumab	1.87	-7.83

追加検討の結果から，非常に高濃度（16,667 µg/mL，349,000 nM）のイダルシズマブが存在しても，ダビガトラン 12 ng/mL 又はダビガトラングルクロン酸抱合体約 100 ng/mL（ダビガトラン当量）を添加したサル血漿中のダビガトラン及び総ダビガトラン濃度の定量に影響しないことが明らかになった。

バリデーション試験の結果は，真度，精度，選択性，直線性及び回収率における許容基準を満たしていた。サル血漿中ダビガトランは，氷／水浴中で少なくとも 6 時間，4°C で 48 時間（オートサンプラー中の処理後試料），3 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-75 ± 15°C）で 261 日間にわたり安定であった。また，サル血漿中で総ダビガトランは，室温で少なくとも 6 時間，4°C で 72 時間（オートサンプラー中の処理後試料），3 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-75 ± 15°C）で 254 日間にわたり安定であった。バリデートした両測定法を用いて，表 2.2.2: 2 に示すサルを用いた 3 つの GLP 適用毒性試験並びに GLP 非適用の探索的用量漸増試験及び PK/PD 試験の血漿中ダビガトラン及び総ダビガトラン濃度を測定した。

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

表 2.2.2: 2 サル血漿中ダビガトラン及び総ダビガトラン濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Escalating dose exploratory study	Non-GLP	11R090	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326
PK/PD study	Non-GLP	dm-12-1103	CTD 4.2.2.2-05_U13-3539
2-dose toxicity study	GLP	11R149	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328
2-dose toxicity study, renal focus	GLP	12R169	CTD 4.2.3.2-04_U13-3538
2-week toxicity study	GLP	13R093	CTD 4.2.3.2-05_n00230533

2.2.3 ブタ血漿中総ダビガトランの定量

抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取したブタ（Landrace）血漿中の総ダビガトラン濃度を測定するための LC-MS/MS 法を開発し，濃度 2.00～2000 ng/mL（4.24～4240 nM）の範囲で限定的妥当性を評価した［CTD 4.2.2.1-07_U13-1328］。イダルシズマブ存在下及び非存在下での LLOQ 試料，低濃度，中濃度及び高濃度 QC 試料（2.00，6.00，160 及び 1600 ng/mL）における日内精度（n=6）（%CV）及び真度（%Bias）の最大値を表 2.2.3: 1 に示す。

表 2.2.3: 1 イダルシズマブ存在下及び非存在下におけるブタ血漿中総ダビガトラン定量法の精度及び真度

Analyte: sum dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	5.0	11.9
With 480 µg/mL (~10,000 nM) idarucizumab	4.4	-4.8

バリデーション試験の結果は，真度，精度，選択性及び直線性における許容基準を満たしていた。Landrace ブタ血漿中の総ダビガトランは，4°C で少なくとも 72 時間（オートサンプラー中の処理後試料），3 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-20 ± 5°C）で 157 日間にわたり安定であった。本法を用いて，表 2.2.3: 2 に示すブタを用いた 3 つの GLP 非適用 PK/PD 試験の血漿中総ダビガトラン濃度を測定した。

表 2.2.3: 2 ブタ血漿中総ダビガトラン濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Neutralization of dabigatran by idarucizumab in pigs with hemodilution	Non-GLP	MD2013/07/PPSS/ 2012-008A	CTD 4.2.1.1-09_n00230830
Effects of idarucizumab on dabigatran-induced bleeding and hemorrhagic shock in a porcine blunt liver trauma model	Non-GLP	MD2013/08/PPSS	CTD 4.2.1.1-11_n00231240
Effects of idarucizumab as a split dose on dabigatran-induced bleeding and hemorrhagic shock in a porcine trauma model	Non-GLP	MD2014/12/PPSS	CTD 4.2.1.1-10_n00238140

2.2.4 ラット尿中ダビガトランの定量

ラット（Crl:WI(Han)）尿中のダビガトラン濃度を測定するための LC-MS/MS 法開発し，濃度 20.0～10,000 ng/mL（42.4～21,200 nM）の範囲で限定的妥当性を評価した［CTD 4.2.2.1-08_U12-1501］。イダルシズマブ存在下及び非存在下での LLOQ 試料，低濃度，中濃度及び高濃度 QC 試料（20.0,

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

60.0，750 及び 7,500 ng/mL）における日内精度（n=6）（%CV）及び真度（%Bias）の最大値を表 2.2.4: 1 に示す。

表 2.2.4: 1　　イダルシズマブ存在下及び非存在下におけるラット尿中ダビガトラン定量法の精度及び真度

Analyte: dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	1.96	-4.26
With 10.0 µg/mL idarucizumab	2.45	-3.29
With 200 µg/mL idarucizumab	1.15	-2.35

バリデーション試験の結果は，真度，精度，選択性，直線性及び回収率における許容基準を満たしていた。ラット尿中のダビガトランは，室温で少なくとも 6 時間，試料採取条件（冷蔵，5 ± 3°C）で少なくとも 24 時間，4°C で 3 日間（オートサンプラー中の処理後試料）及び凍結保存下（-20 ± 5°C）で 269 日間にわたり安定であった。この測定法を用いて，表 2.2.4: 2 に示すラットを用いた 2 つの GLP 非適用試験の尿中ダビガトラン濃度を測定した。

表 2.2.4: 2　　ラット尿中ダビガトラン濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
PK study	Non-GLP	dm-11-1095	CTD 4.2.2.2-01_U12-3083
PK study in renally impaired rat	Non-GLP	dm-12-1102	CTD 4.2.2.7-01_U13-3340

2.2.5　　サル尿中ダビガトラン及び総ダビガトランの定量

サル尿中のダビガトラン及び総ダビガトラン濃度を測定するための LC-MS/MS 法を開発し，バリデーションを行った。両測定法とも，濃度範囲 20.0～10,000 ng/mL（42.4～21,200 nM）で限定的妥当性を評価した［CTD 4.2.2.1-09_U12-1500 及び CTD 4.2.2.1-10_U12-1587］。イダルシズマブ存在下及び非存在下での LLOQ 試料，低濃度，中濃度及び高濃度 QC 試料（20.0，60.0，750 及び 7,500 ng/mL）における日内精度（n=6）（%CV）及び真度（%Bias）の最大値を表 2.2.5: 1 に示す。

表 2.2.5: 1　　イダルシズマブ存在下及び非存在下におけるサル尿中ダビガトラン及び総ダビガトラン定量法の精度及び真度

Analyte: dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	3.78	13.58
With 10.0 µg/mL idarucizumab	2.88	-8.61
With 200 µg/mL idarucizumab	2.27	11.6
Analyte: sum dabigatran	Max. CV (%)	Max. Bias (%)
Without idarucizumab	6.74	12.22
With 10.0 µg/mL idarucizumab	1.78	-5.61
With 200 µg/mL idarucizumab	1.37	7.78

バリデーション試験の結果は，真度，精度，選択性，直線性及び回収率における許容基準を満たしていた。サル尿中ダビガトランは，4°C で少なくとも 24 時間（オートサンプラー中の処理後

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

試料），3 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-75 ± 15°C）で 210 日間にわたり安定であった。室温で 6 時間及び冷蔵条件で 24 時間（試料採取と同様の条件）保存したサル尿中で，ダビガトラングルクロン酸抱合体からダビガトランへの部分的な加水分解が認められたため，ダビガトラン濃度が過大評価される可能性がある。また，サル尿中総ダビガトランは，室温で少なくとも 6 時間，冷蔵条件で 24 時間，4°C で 120 時間（オートサンプラー中の処理後試料），3 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-75 ± 15°C）で 216 日間にわたり安定であった。したがって，表 2.2.5: 2 に示す 2 つの GLP 非適用試験には，サル尿中総ダビガトラン濃度データのみを採用した。

表 2.2.5: 2 サル尿中総ダビガトラン濃度を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Escalating dose exploratory study	Non-GLP	11R090	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326
PK/PD study	Non-GLP	dm-12-1103	CTD 4.2.2.2-05_U13-3539

2.3 抗イダルシズマブ抗体の検出法

ラット及びサル血漿中の抗イダルシズマブ抗体を検出するための薬物架橋電気化学発光（ECL）法を開発し，バリデーションを行った。血漿及び対照試料を 325 mM 酢酸で処理し，試料中に存在する抗イダルシズマブ抗体をイダルシズマブから解離させた。次に，この酢酸処理試料を 1.5 M Trizma® base を用いて調製したビオチン及びルテニウム（Ru）標識イダルシズマブ混合液とともにインキュベートし，酸を中和するとともに，抗イダルシズマブ抗体と標識イダルシズマブの間で複合体を形成させた。ストレプトアビジンでコーティングした Meso-Scale Discovery（MSD）プレート上に複合体を捕捉した後，プレートを洗浄し，MSD®リード緩衝液を添加し，電気化学反応を介して $Ru(bpy)_3^{2+}$錯体を化学発光させ，MSD Sector 6000 検出器を用いて電気化学発光量を測定することにより，複合体を検出した。ECL シグナルと試料中に存在する抗イダルシズマブ抗体濃度の間に相関関係が成立する。

2.3.1 ラット血漿中抗イダルシズマブ抗体の検出

ラット（Crl:WI(Han)）から抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取した血漿中の抗イダルシズマブ抗体を検出するための ECL 法を開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-11_U13-3028］。抗イダルシズマブ抗体の陽性対照として，市販のヤギ抗ヒト IgG ポリクローナル抗体を使用した。バリデーション試験の結果は，精度，感度，選択性，プロゾーン効果及び安定性における許容基準を満たしていた。イダルシズマブ非存在下での抗イダルシズマブ抗体の検出感度は 0.22 ng/mL であった。また，drug tolerance に関して，最大 150 µg/mL のイダルシズマブ存在下で 400 ng/mL の抗イダルシズマブ抗体を検出可能であった。

ラット血漿で調製した抗イダルシズマブ抗体の陽性対照試料は，室温で 24 時間，5 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-80°C）で 92 日間にわたり安定であった。

本法は，ラットを用いた GLP 適用の 4 週間反復投与毒性試験［CTD 4.2.3.2-02_U12-3327，試験番号 11R141］で得られた血漿試料に使用した。

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

2.3.2 サル血漿中抗イダルシズマブ抗体の検出

サル（アカゲ）から抗凝固剤として K_3EDTA を使用して採取した血漿中の抗イダルシズマブ抗体を検出するための 2 種類の ECL 法（検出法 1 及び検出法 2）を開発し，バリデーションを行った。これらの測定法を用いて，サルを用いた 2 つの GLP 非適合試験及び 3 つの GLP 適合毒性試験の抗イダルシズマブ抗体を測定した（表 2.3.2: 1）。

表 2.3.2: 1 サル血漿中抗イダルシズマブ抗体を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number	Method used [a]
Escalating dose exploratory study	Non-GLP	11R090	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326	BBM-12-1002
PK/PD study	Non-GLP	dm-12-1103	CTD 4.2.2.2-05_U13-3539	BBM-12-1002
2-dose toxicity study	GLP	11R149	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328	BBM-12-1002
2-dose toxicity study, renal focus	GLP	12R169	CTD 4.2.3.2-04_U13-3538	BBM-13-1001
2-week toxicity study	GLP	13R093	CTD 4.2.3.2-05_n00230533	BBM-13-1001

[a] 検出法 1（方法番号 BBM-12-1002）では，ダビガトランエテキラートのみの投与で抗イダルシズマブ抗体の偽陽性シグナルが検出されたが，検出法 2（方法番号 BBM-13-1001）では検出されなかった。

2.3.2.1 検出法 1

検出法 1［CTD 4.2.2.1-12_U13-3029］の場合，抗イダルシズマブ抗体陽性対照として，市販のヤギ抗ヒト IgG ポリクローナル抗体を使用した。バリデーション試験の結果は，精度，感度，選択性，プロゾーン効果及び安定性における許容基準を満たしていた。イダルシズマブ非存在下での検出感度は 0.29 ng/mL であった。また，drug tolerance に関して，125 µg/mL のイダルシズマブ存在下まで 100 ng/mL の抗イダルシズマブ抗体を検出可能であった。サル血漿で調製した抗イダルシズマブ抗体陽性対照は，室温で少なくとも 24 時間，5 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-80°C）で 92 日間にわたり安定であった。

この高感度 ECL 法を用いたとき，ダビガトランエテキシラートのみを投与したサルから採取した血漿試料中で抗イダルシズマブ抗体の偽陽性シグナルが検出された［CTD 4.2.2.1-13_U13-3027, CTD 4.2.3.2-03_U12-3328］。この干渉はダビガトランエテキシラートの経口投与 24 時間後に認められたが，ダビガトランエテキシラートの最終投与の 2 週間後の試料には検出されなかった。ダビガトランエテキシラート投与の 2 週間以降に採取した回復期の試料の評価において，この干渉現象が影響を与えることはなく，この時点までに干渉作用は消失したことから，この検出法 1 は抗イダルシズマブ抗体を検出する信頼性の高い方法と考えられた。

2.3.2.2 検出法 2

第 2.3.2.1 項に記述した干渉を克服するため，新しいビオチン及びルテニウム標識イダルシズマブ試薬を用いて新しい ECL 法（検出法 2）を開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-14_n00231001］。この方法では，マウスを用いてイダルシズマブに対して産生させた抗イディオタイプモノクローナル抗体を抗イダルシズマブ抗体陽性対照として使用した。この ECL 法では，ダビガトランエテキシラートを投与したサルから採取した血漿試料中で干渉シグナルは検出されなかった［CTD 4.2.2.1-15_n00234019］。バリデーション試験の結果は，精度，感度，

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

選択性，プロゾーン効果及び安定性における許容基準を満たしていた。イダルシズマブ非存在下での検出感度は，サル血漿で調製した抗イダルシズマブ抗体陽性試料に関して 15.1 ng/mL であった。また，drug tolerance に関して，50 µg/mL のイダルシズマブ存在下まで 125 ng/mL の抗イダルシズマブ抗体を検出可能であった。

サル血漿中で抗イダルシズマブ抗体陽性対照は，室温で少なくとも 24 時間，4 回の凍結／融解サイクル及び凍結保存下（-80°C）で 272 日間にわたり安定であった。

2.4 サル血漿中抗ダビガトラン抗体の検出法

2.4.1 サル血漿中抗ダビガトラン抗体の検出

抗凝固剤として K_3EDTA を使用してサル（アカゲ）から採取した血漿中の抗ダビガトラン抗体を検出するための放射性免疫沈降（RIPA）法を開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-16_n00237363］。この方法の原理は，試料中の抗ダビガトラン抗体を放射性標識したダビガトランに結合させ，ポリエチレングリコール（PEG）を添加することにより，ダビガトランー抗ダビガトラン抗体複合体を沈殿させ，沈殿物中の放射能に基づいて抗ダビガトラン抗体の存在を検出する方法である。

イダルシズマブの完全長 IgG 抗体である BI 655080 を抗ダビガトラン抗体の陽性対照として使用した。被験試料，陽性対照及び陰性対照に[^{3}H]ダビガトランを濃度 0.5 ng/mL となるように添加した。この添加試料を混和し，37°C で 30 分間インキュベートすることにより，[^{3}H]ダビガトランー抗ダビガトラン抗体の複合体を生成させた。その後，等容量の 20%（w/v）PEG 6000 溶液を各試料に添加し，ボルテックスで混和し，2～8°C で 18 時間冷蔵保存することにより，[^{3}H]ダビガトランー抗ダビガトラン抗体の複合体を沈殿させた。次に，この試料を室温で 20 分間遠心分離（1000 *g*）した。沈渣を pH 7.2 の NaCl 含有 Tris 緩衝液で洗浄した後，同液に再懸濁させ，液体シンチレーションカウンターを用いて放射能を測定した。

この RIPA 法により，ダビガトラン及びイダルシズマブ非存在下において，サル血漿中では下限 6.9 ng/mL までの陽性対照が検出可能であった。また，drug tolerance に関して，20 ng/mL 及び 100 ng/mL のダビガトラン存在下で，それぞれ 125 ng/mL 及び 1000 ng/mL の抗ダビガトラン抗体を検出可能であった。

本法に関して，ダビガトラン由来の干渉で偽陰性率が上昇したことに加えて，イダルシズマブが存在することでも逆方向ではあるがこの RIPA 法に干渉が生じ，偽陽性率が上昇した。陰性対照（ブランク血漿）ではイダルシズマブ濃度で 10 ng/mL までは依然として陰性と判定されたが，100 ng/mL のイダルシズマブ存在下では偽陽性シグナルが誘発された。

スクリーニングアッセイで使用した 20 ng/mL の濃度の陽性対照試料において，マトリックスの選択性は許容されるものであった。50,000 ng/mL までの濃度の陽性対照試料においてフック効果は認められなかった。陽性対照試料は，血漿中で 6 回の凍結／融解サイクル，室温で少なくとも 24 時間，2～8ºC で 3 日間及び-60～-80ºC で 1 カ月間にわたり安定であった。

バリデーション試験の結果から，イダルシズマブ及び抗イダルシズマブ抗体（ヒツジ抗ヒト IgG 抗体を使用）両方の存在下，抗ダビガトラン抗体の偽陽性シグナルが検出されたが，イダルシズ

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

マブブロッキング抗イディオタイプ抗体（クローン 2C6）によってこの偽陽性シグナルが消失できることが示された。対照的に，イダルシズマブとは異なる可変領域を有する 2 番目の抗ダビガトラン抗体陽性対照である IgG093 からの陽性シグナルは，2C6 抗体によって消失されなかった。このブロッキング操作により，イダルシズマブ－抗イダルシズマブ抗体複合体の存在による偽陽性シグナルと真の抗ダビガトラン抗体陽性シグナルを区別することが可能である。しかし，この方法であっても，すべてのタイプのイダルシズマブ－抗イダルシズマブ抗体複合体に由来する偽陽性シグナルを排除できるわけではない。特に，クローン 2C6 抗体の結合部位と重複する領域で抗イダルシズマブ抗体がイダルシズマブに結合し，クローン 2C6 抗体が複合体中のイダルシズマブに結合するのが妨害される場合（結果として，2C6 抗体による反応の阻害はない），偽陽性シグナルを排除できないと考えられる。

本法は, サルを用いた GLP 適用試験に使用した［CTD 4.2.3.2-05_n00230533, 試験番号 13R093］。

2.4.2 サル血漿中抗ダビガトラン中和抗体の検出

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを使用して採取したサル（アカゲ）血漿中の抗ダビガトラン中和抗体をスクリーニングするため，トロンビン凝固時間測定法を改良・開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-17_n00233140］。本法は，トロンビン及びダビガトランが一定濃度で存在する時の抗凝固活性の阻害程度に基づいて，抗ダビガトラン中和抗体を検出する凝固測定法である。抗ダビガトラン中和抗体の陽性対照として BI 655080 を使用した。

サル血漿試料，陰性対照試料及び陽性対照試料に 7 nM のダビガトランを添加し，37°C で 2 分間インキュベートした。高純度の α トロンビンを希釈したものを添加することにより凝固を開始させ，トロンビン添加から血栓形成までの経過時間をトロンビン凝固時間とした。7 nM のダビガトランによって誘発される凝固時間の延長は，ほぼ等モル濃度の陽性対照によって完全に中和された。7 nM のダビガトラン存在下，陽性対照の濃度上昇に伴いトロンビン凝固時間が短縮したことから，ダビガトラン誘発性の凝固時間延長は濃度依存的に陽性対照によって中和されることが示された。本法の感度，選択性，精度及び安定性に関してバリデーションを行った。サル血漿での感度は 450 ng/mL であった。ダビガトランの存在により影響を受けることから，ダビガトランをウォッシュアウトした後に採取した試料のみに本法を使用した。サル血漿中の陽性対照は，3 回の凍結／融解サイクル及び-20 ± 10°C の凍結保存下で少なくとも 12 週間にわたり安定であった。

本法は, サルを用いた GLP 適用試験に使用した［CTD 4.2.3.2-05_n00230533, 試験番号 13R093］。

2.5 バイオマーカーアッセイ：抗凝固活性及び血栓形成促進活性

ラット及びサル血漿中の抗凝固活性，並びにサル血漿中の血栓形成促進活性を測定するための薬力学的バイオマーカーアッセイ法を開発し，バリデーションを行った。

2.5.1 ラット血漿中ダビガトランの抗凝固活性測定

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを使用して採取したラット（Crl:WI(Han)）血漿中のダビガトランによる抗凝固活性を測定するための 3 種類の分析法，すなわち，Hemoclot®希釈トロンビン

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

時間（dTT），活性化部分トロンボプラスチン時間（aPTT）及びエカリン凝固時間（ECT）を測定する方法を開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-19_U13-1409］。バリデーションの結果は，精度及び真度における許容基準を満たしていた。検量線用試料及び QC 試料は，室温で少なくとも 6 時間にわたり安定であった。また，QC 試料は，dTT 及び ECT アッセイに関して 3 回の凍結／融解サイクル，aPTT アッセイに関して 2 回の凍結／融解サイクルまで安定であった。さらに，保存時の安定性について，dTT 及び ECT アッセイに関して-20°C で 12 週間，aPTT アッセイに関して 8 週間まで安定であった。これらの測定法は，表 2.5.1: 1 に示す GLP 非適用 PK/PD 試験及び PD 試験に使用した。

表 2.5.1: 1　　ラット血漿中抗凝固活性を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
PK/PD study in renally impaired rats	Non-GLP	dm-13-1030	CTD 4.2.2.7-02_U13-3577
PD study: reversal of anticoagulant activity	Non-GLP	MD2013/05/PPSS	CTD 4.2.1.1-03_n00226711
PD study: reversal of bleeding	Non-GLP	MD2013/06/PPSS	CTD 4.2.1.1-04_n00227451

2.5.2　　サル血漿中ダビガトランの抗凝固活性測定

抗凝固剤としてクエン酸ナトリウムを使用して採取したサル（アカゲ）血漿中のダビガトランによる抗凝固活性を測定するための 3 種類の分析法，すなわち，dTT，aPTT 及び ECT を測定する方法を開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.1-18_U12-1035］。バリデーションの結果は，真度，精度及び安定性における許容基準を満たしていた。QC 試料は，3 種類の測定法すべてに関して，室温で少なくとも 6 時間，3 回の凍結／融解サイクル及び-20°C で 12 週間まで安定であった。サル血漿中のトロンビン時間（TT）測定法のバリデーションを試みたが，低濃度のダビガトラン標準試料の結果が許容基準を満たさなかったため，サル試験では TT アッセイを使用しなかった。

バリデートした測定法は，表 2.5.2: 1 に示す試験におけるイダルシズマブ併用及び非併用時のサル血漿中抗凝固活性の測定に使用した。

表 2.5.2: 1　　サル血漿中抗凝固活性を測定した試験

Short study title	GLP compliance	Study number	Report number
Escalating dose exploratory study	Non-GLP	11R090	CTD 4.2.3.2-01_U12-3326
PK/PD study	Non-GLP	dm-12-1103	CTD 4.2.2.2-05_U13-3539
2-dose toxicity study	GLP	11R149	CTD 4.2.3.2-03_U12-3328
2-dose toxicity study, renal focus	GLP	12R169	CTD 4.2.3.2-04_U13-3538
2-week toxicity study	GLP	13R093	CTD 4.2.3.2-05_n00230533

2.5.3　　サル血漿中血栓形成促進活性を評価するための D-ダイマー及び F1+2 測定

D-ダイマーはプラスミンによるフィブリン塊の分解に関するバイオマーカーであり，血栓形成の間接的マーカーとなる。プロトロンビンフラグメント 1+2（F1+2）はプロトロンビンの切断による生成物であり，トロンビン生成に関する探索的バイオマーカーとして使用されている。市販

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

の ELISA 法を用いて血漿中の D-ダイマー及び F1+2 を測定することで，アカゲザル血漿中のイダルシズマブによる血栓形成促進作用を測定した。

2.5.3.1 D-ダイマー測定

サル（アカゲ）血漿中の D-ダイマーを測定するための Asserachrom® D-ダイマーサンドイッチ ELISA 法について，QC 試料の調製に水ではなく血漿を使用したことを除いて，メーカーの手順に従って限定的妥当性を評価した［CTD 5.3.1.4-27_n00237426］。マウス抗ヒト D-ダイマーモノクローナル抗体及びペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ヒト D-ダイマー抗体をそれぞれコーティング試薬及び検出試薬として使用した。この分析法はヒト血漿（クエン酸及び EDTA 処理）用の分析法として既に限定的妥当性の評価が行われており，今回はサル血漿中（クエン酸処理）の D-ダイマー分析における限定的妥当性を評価した。その際，低，中及び高濃度 QC 試料として，それぞれ濃度 125，376 及び 751 ng/mL FEU（フィブリノーゲン換算量）の D-ダイマーを添加した個別血漿及びプール血漿試料を用いた。血栓形成作用に対するイダルシズマブの中和効果について，D-ダイマーをバイオマーカーとして検討した。バイオマーカーアッセイであることから，この D-ダイマー分析のバリデーションは，薬物動態解析に必要な対象物質定量で実施されるバリデーションより広めの許容範囲を設定した。実試料測定では，QC 試料を用いて真度及び精度をモニターし，精度及び真度の許容基準を満たした測定で得られた結果のみ採用した。

本 ELISA 法で確立された測定可能範囲は，ヒト試料中で 63.4～1014 ng/mL FEU であった。低，中及び高濃度 QC 試料は，精度及び真度に関する許容基準を満たしており，1/168 まで希釈しても影響は認められなかった。D-ダイマーは，ヒト血漿中で 4 回の凍結／融解サイクル，室温で 4 時間，2～8°C で 7 日間，-20 ± 10°C 及び-70 ± 10°C の凍結保存下で少なくとも 1 カ月間にわたり安定であった。

本 ELISA 法について，クエン酸処理した血漿に濃度 125，376 及び 751 ng/mL FEU の D-ダイマーを添加したサルの個別血漿及びプール血漿試料を用いて，限定的妥当性を評価した。本法は，3 濃度の QC 試料の大部分で真度及び精度の許容基準を満たしていたが，例外として，低濃度 QC 試料の精度は 33%CV であり，許容基準である 25%以下を超えていた。

結論として，Asserachrom® D-ダイマーELISA 法は精度に若干問題があったものの，イダルシズマブの血栓形成作用に対する中和効果を評価するためのバイオマーカーアッセイとして，目的にかなうと考えられた。

本 ELISA 法を，サルを用いた GLP 適用試験のバイオマーカーアッセイに使用した［CTD 4.2.3.2-05_n00230533，試験番号 13R093］。実試料測定時には精度及び真度の許容基準を満たした測定で得られた結果のみ採用し，QC 試料の真度及び精度の許容基準は以下のように設定した。すなわち，検量線用標準試料（確立された測定可能範囲 63.4～1014 ng/mL FEU 内）の場合，少なくともその 75%が表示濃度の 80～120%（LLOQ の場合は 75～125%）内であることとした。また，QC 試料の場合，少なくとも 3 分の 2（分析毎に低濃度，中濃度及び高濃度 QC 試料から構成され，二重測定した計 6 検体の QC 試料中 4 検体）がその標的濃度の 75～125%の範囲内であり，精度（%CV）が 20%以下であることとした。さらに，各濃度の QC 試料の少なくとも半数が真度

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

に関する許容基準を満たしていなければならないこととした。もし QC 試料が許容基準を満たしていなかった場合，その測定から得られた結果は無効であり，それらすべての試料を再測定する必要がある。さらに，各試料を二重測定した値の%CV は 20%以下でなければならず，もしそうでない場合，測定結果は無効であり，当該試料を再測定する必要がある。

2.5.3.2 F1+2 測定

クエン酸処理したサル（アカゲ）血漿中の F1+2 を測定するための市販の F1+2 サンドイッチ ELISA 法について，限定的妥当性を評価した［CTD 4.2.2.1-20_n00237010］。測定可能範囲 0.8～9.5 ng/mL の F1+2 について検討したが，本法で限定的妥当性が確認されたのは 1.8～9.5 ng/mL の範囲であった。

日内及び日間の精度及び真度に加えて，希釈直線性，特異性，最大 4 回までの凍結／融解サイクル，室温並びに 2～8°C での短期安定性及び長期安定性について評価した。この F1+2 サンドイッチ ELISA 法は，製造元が提供する操作法に一部修正を加えて実施した。例えば，代替マトリックスとして，20%ヒト血漿を含む試料希釈液を用いて検量線用標準試料を調製した。QC 試料及びバリデーション試料は，サルのブランク血漿に F1+2 を添加して調製した。

検量線を作成するため，F1+2 濃度範囲 0.2～10 ng/mL の計 8 濃度（0 ng/mL を含まず）の検量線用標準試料を用いた。QC 試料の調製にはクエン酸添加サル血漿を用い，低濃度 QC，中濃度 QC 及び高濃度 QC 試料はそれぞれ最終濃度 1.8, 3.5 及び 7.0 ng/mL となるよう F1+2 を添加した。定量下限 QC（LLQC）及び定量上限 QC（ULQC）試料も同様に調製し，それぞれ最終濃度 0.8 及び 9.5 ng/mL となるよう F1+2 を添加した。

精度及び真度を評価するため，3 日間の測定それぞれで，8 濃度の検量線用標準試料を用いて，2 つの独立した検量線を作成するとともに，2 セットの低濃度 QC，中濃度 QC 及び高濃度 QC 試料について評価した。

3 濃度の QC 試料，ULQC 試料及び LLQC 試料の日内及び日間真度及び精度を表 2.5.3.2: 1 に示す。

表 2.5.3.2: 1 サル血漿を用いた F1+2 分析法の日内及び日間の真度及び精度

QC	Concentration (ng/mL)	Within-day		Between-day	
		Accuracy (%)	Precision (%CV)	Accuracy (%)	Precision (%CV)
ULQC	9.5	76.8 - 87.8	13.6	82.5	20.4
High QC	7.0	84.1 - 95.7	16.3	91.7	21.6
Medium QC	3.5	74.6 - 108.6	15.8	96.4	25.7
Low QC	1.8	94.4 - 114.6	31.4	107.5	33.2
LLQC	0.8	103.1 - 183.9	44.1	140.2	58.5

各 QC 試料において，トータルエラーが 30%（ULQC 及び LLQC 試料は 40%）以内という許容基準が推奨されている［CTD 4.3-21_R14-4039］。ULQC は定量上限であるので，トータルエラーが 40%以内の濃度を許容基準に設定することも可能と考えられる。限定的妥当性評価の結果から，LLQC 試料（0.8 ng/mL）の真度及び精度は許容基準を満たさなかったので，定量下限に設定しな

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

かった。ULQC，高濃度 QC 及び中濃度 QC 試料のトータルエラーは許容基準範囲内であったが，低濃度 QC（1.8 ng/mL）のトータルエラーは 41.1%であり，LLOQ に関する許容基準範囲からわずかだけ外れた。したがって，トータルエラーの結果に基づいて，1.8 ng/mL の低濃度 QC を定量下限とした。

限定的妥当性評価の結果から，希釈倍率 10 倍までの希釈直線性及び雌雄サル血漿における特異性（7.0 ng/mL 及び 1.8 ng/mL で検討）が確認された。サル血漿中 F1+2 は少なくとも 4 回の凍結／融解サイクル，2～8°C で 7 日間，-20± 10°C 及び-70～-85°C の凍結保存下で 1 カ月間にわたり安定であった。

要約すると，サル血漿中の F1+2 を測定するための市販の ELISA 法は，真度及び精度の点で若干不正確であったものの，イダルシズマブの血栓形成作用を評価するためのバイオマーカーの測定法としては妥当と考えられた。バイオマーカーアッセイであることから，この F1+2 分析のバリデーションは，薬物動態解析に必要な対象物質定量で実施されるバリデーションより広めの許容範囲を設定した。しかし，本法の性能が限られていることを考慮して，結果について慎重に解釈する必要がある。

限定的妥当性を評価済みのこの F1+2 用サンドイッチ ELISA 法を，サル血漿中のバイオマーカーアッセイ法として使用した［CTD 4.2.3.2-05_n00230533，試験番号 13R093］。実試料測定時には精度及び真度の許容基準を満たした測定で得られた結果のみ採用し，QC 試料の真度及び精度の許容基準は以下のように設定した。すなわち，検量線用標準試料（確立された作業範囲内）の場合，少なくともその 75%が標的濃度の 80～120%（LLOQ の場合は 75～125%）内であることとした。また，QC 試料の場合，少なくとも 3 分の 2（分析毎に低濃度，中濃度及び高濃度 QC から構成され，二重測定した計 6 検体の QC 試料中 4 検体）がその標的濃度の 75～125%（低濃度 QC の場合は 70～130%）の範囲内であり，精度（%CV）が 25%以下（低濃度 QC の場合は 30%以下）であることとした。さらに，各濃度の QC 試料の少なくとも 50%が真度に関する許容基準を満たしていなければならないこととした。もし，QC 試料が許容基準を満たしていなかった場合，その測定で得られた結果は無効であり，すべての試料を再測定する必要がある。さらに，各試料の二重測定値の%CV は 20%以下でなければならず，もしそうでない場合，当該試料の結果は無効であり，当該試料を再測定する必要がある。

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

3. 吸収，薬物動態及び薬力学

イダルシズマブは静脈内投与用のタンパク製剤であるため，その生物学的利用率は 100%である。

ラット及びサルにおいて，ダビガトランの前投与あり又はなしでイダルシズマブを静脈内投与したときのイダルシズマブの薬物動態，並びにダビガトランの薬物動態及び薬力学に対するイダルシズマブの影響を検討した。また，イダルシズマブとダビガトランの間の PK/PD 相互作用についても検討した。

ダビガトラン抗凝固活性に対するイダルシズマブの中和効果及びダビガトラン存在下の外傷誘発性出血に対するイダルシズマブの中和効果を検討したラット及びブタの *in vivo* 薬理試験については，薬理試験の概要文［CTD 2.6.2_2.4 項］に記載する。さらに，ラット及びサルにイダルシズマブを単回及び反復投与したときのトキシコキネティクス及び免疫原性，並びにサルにおける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に対するイダルシズマブの中和効果の結果については，毒性試験の概要文に記載する［CTD 2.6.6_2~3 項］。

サルの PK/PD データを用いて，イダルシズマブとダビガトランの間の薬物動態学的相互作用を記述する予備的な semi-mechanistic モデルを開発し，バリデーションを行った。本モデルを応用して，動物及びヒトにダビガトラン及びイダルシズマブを様々な用法用量で投与したときの総ダビガトラン（未抱合体+抱合体）及び活性型ダビガトラン（イダルシズマブ非結合型）の血漿中濃度－時間推移をシミュレートした。

3.1 ラットにおけるイダルシズマブ及びダビガトラン単独又は併用投与後の薬物動態

ラットにおけるイダルシズマブの薬物動態（ダビガトラン前投与あり又はなし）及びダビガトランの薬物動態に及ぼすイダルシズマブの影響について検討した［CTD 4.2.2.2-01_U12-3083］。3 群の雄ラット（Crl:WI(Han)）にそれぞれダビガトランを 0.2 mg/kg 静脈内投与（ダビガトラン単独群），イダルシズマブを 20 mg/kg 単独静脈内投与（イダルシズマブ単独群），ダビガトランを 0.2 mg/kg 静脈内投与に続いて 15 分後にイダルシズマブを 20 mg/kg 静脈内投与（ダビガトラン及びイダルシズマブ併用群）した。ダビガトラン単独群及びイダルシズマブ単独群では，連続サンプリングにより血液を採取し，1 群あたり 3 例のラットを使用した。ダビガトラン及びイダルシズマブ併用群では，コンポジットサンプリングにより血液を採取し，同一動物で両分析対象物質を定量するのに十分な血漿を得るために 6 例のラットを使用した。イダルシズマブの血漿中濃度は ELISA 法を用いて，ダビガトランの血漿中濃度は LC-MS/MS 法を用いて測定した。ラットにおけるイダルシズマブ及びダビガトランの血漿中濃度－時間推移を図 3.1: 1 に示す。

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

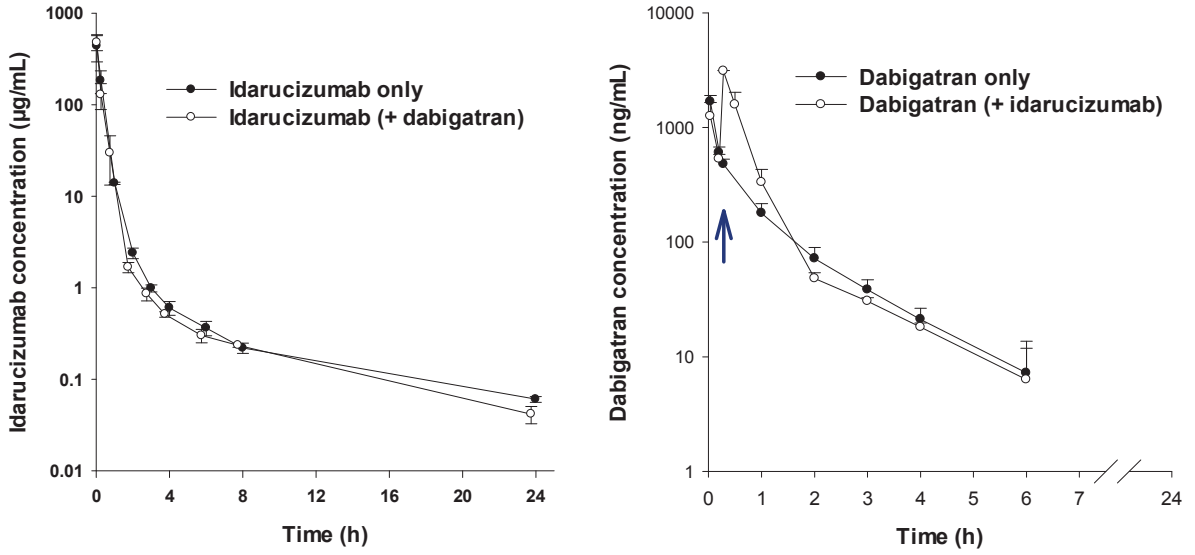


図 3.1: 1 ラットにイダルシズマブ（20 mg/kg）及びダビガトラン（0.2 mg/kg）を単独又は併用静脈内投与したときのイダルシズマブ（左）及びダビガトラン（右）の血漿中濃度－時間推移（平均値±SD，n=3）

注：右図の矢印はダビガトラン投与 15 分後のイダルシズマブ投与を示す。

血漿中イダルシズマブ濃度は，投与後初期の急速な消失相とその後の比較的緩徐な終末相を有する二相性を示し，その推移はダビガトラン投与による影響を受けなかった。

ダビガトラン単独群における血漿中ダビガトラン濃度は二相性を示した。ダビガトラン及びイダルシズマブ併用群ではイダルシズマブ投与直後に血漿中ダビガトラン濃度が急速かつ大幅に上昇した。この血漿中ダビガトラン濃度の上昇は，血漿中でイダルシズマブがダビガトランに速やかに結合してイダルシズマブ－ダビガトラン複合体が生成し，それをうけて組織から血漿へのダビガトランの再分布が起こったためと考えられた。このことは，ラットを用いた薬力学試験［薬理試験の概要文，CTD 2.6.2_2.4.1 項］及びサルを用いた PK/PD 試験（3.2~3.3 項）の結果からも支持される。すなわち，これらの試験において，体内に存在する総ダビガトラン量と等モル以上のイダルシズマブを静脈内投与したとき，投与直後にすべてのダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体がイダルシズマブとの結合により抗凝固活性が不活化された。上記のような再分布現象は，抗ジゴキシン Fab 投与直後の組織から血漿へのジゴキシンの再分布など，特異的 Fab 存在下で他の抗原についても報告されている［CTD 4.3-08_R12-4112］。ダビガトラン及び総ダビガトラン濃度推移に及ぼすイダルシズマブの同様の影響は，サル（3.2~3.3 項），ブタ［薬理試験の概要文，CTD 2.6.2_2.4.2 項］及びヒト［臨床薬理試験の概要文，CTD 2.7.2］においても認められている。

ラットにおけるイダルシズマブ及びダビガトランの薬物動態パラメータを表 3.1: 1 に示す。

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

表 3.1: 1 ラットにイダルシズマブ及びダビガトランを単独又は併用静脈内投与したときの薬物動態パラメータ

PK Parameter	Idarucizumab		Dabigatran	
	Alone [a]	with dabigatran [b]	Alone [a]	with idarucizumab [b]
Dose (mg/kg)	20	20	0.2	0.2
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	3730 ± 875	2990	787 ± 128	1620
$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	178000 ± 41800	143000	371 ± 60.4	765
CL (mL/min/kg)	1.95 ± 0.494	2.33	9.16 ± 1.59	4.36
V_{ss} (L/kg)	0.0688 ± 0.0291	0.0771	0.561 ± 0.0780	0.180
$t_{1/2}$ (h) [c]	6.68 ± 0.493	6.34	1.40 ± 0.447	1.36
MRT (h)	0.570 ± 0.0943	0.550	1.03 ± 0.191	0.688
$t_{1/2,\alpha}$ (h) [d]	0.241 ± 0.0202	0.198	Not determined	Not determined
$t_{1/2,\beta}$ (h) [d]	5.81 ± 0.481	5.15	Not determined	Not determined

[a] 平均値± SD，n=3。1 つの分析対象物質（イダルシズマブ又はダビガトラン）のみを定量する場合，連続サンプリングにより採血した。
[b] コンポジットサンプリングから得られた平均濃度（各時点 n=3）に基づいて算出したパラメータであるため，SD は算出していない。2 つの分析対象物質（イダルシズマブ及びダビガトラン）を定量する場合，十分な血漿を得るために，コンポジットサンプリングにより採血した。
[c] 終末相の消失半減期はノンコンパートメント解析により算出した。
[d] 血漿中イダルシズマブ濃度の二相性推移の特徴を明らかにするため，コンパートメント解析により，初期相（α）及び終末相（β）の消失半減期も算出した。

ダビガトラン前投与の有無により，ラットにおけるイダルシズマブの薬物動態パラメータ及び血漿中濃度－時間推移に顕著な差は認められなかったことから，イダルシズマブ－ダビガトラン複合体とイダルシズマブの薬物動態は本質的に同等であることが示唆された。定常状態における分布容積（V_{ss}）は小さく，血漿容積をわずかに上回る程度であったことから，イダルシズマブの血管外コンパートメントへの分布は限られていることが示された。また，イダルシズマブの平均滞留時間（MRT）は短く，速やかに消失することが示された。

ダビガトラン及びイダルシズマブ併用群のダビガトランの全身クリアランス（CL；4.36 mL/min/kg）は，ダビガトラン単独群の CL（9.16 mL/min/kg）に比べて低かった。併用群の低い CL は，イダルシズマブに結合したダビガトランの CL が低いためと考えられ，イダルシズマブの低い CL がイダルシズマブに結合したダビガトランの CL に反映していると推察された。また，ダビガトラン及びイダルシズマブ併用群のダビガトランの V_{ss}（0.180 L/kg）は，ダビガトラン単独群の V_{ss}（0.561 L/kg）に比べて小さかった。これは，血漿中でイダルシズマブがダビガトランに速やかに結合することにより，ダビガトランが組織から血漿へ再分布したことと一致する。ダビガトラン及びイダルシズマブを併用投与したとき，イダルシズマブに結合したダビガトランの薬物動態はイダルシズマブの薬物動態によって制御された。

3.2 サルにおけるイダルシズマブの薬物動態，並びにダビガトランの薬物動態及び PK/PD に及ぼすイダルシズマブの影響

サル（アカゲ）におけるイダルシズマブ，ダビガトラン及び総ダビガトラン（ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の合計）の薬物動態及び尿中排泄，並びにイダルシズマブの安全性及

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

び薬力学について検討するため，探索的用量漸増試験を実施した［CTD 4.2.3.2-01_U12-3326，試験番号 11R090］。尿中排泄の結果については 6 項，上記試験の用量設定の結果については毒性試験の概要文に記載する［CTD 2.6.6_3.2.2 項］。サルにおいてダビガトランのグルクロン酸抱合体が多量に存在しており［3.2.3 項，表 3.2.3: 1］，それらはダビガトランと同程度の抗凝固作用及びイダルシズマブ結合親和性を有することから［CTD 4.2.1.1-12_n00232054 及び CTD 2.6.2_2.2.1 項］，すべてのサル試験においてダビガトラン濃度に加えて総ダビガトラン濃度も測定した。

3.2.1 試験デザイン

サルを用いた探索的用量漸増試験の試験デザインを表 3.2.1: 1 に示す。雌雄各 1 例／群からなる 3 投与群を設けた。投与群 1 のサルには溶媒のみを経口及び静脈内持続投与した。投与群 2 のサルには溶媒を経口投与し，4，18 及び 32 日目にそれぞれ 30，90 及び 175 mg/kg のイダルシズマブを静脈内持続投与した。投与群 3 のサルには，1～4，15～18 及び 29～32 日目にダビガトランエテキシラート（ダビガトランのプロドラッグ）12 mg/kg/日を経口投与し，4，18 及び 32 日目のダビガトランエテキシラート経口投与 1.5 時間後に，それぞれ 30，90 及び 175 mg/kg のイダルシズマブを静脈内持続投与した。

表 3.2.1: 1 サルを用いた探索的用量漸増試験の試験デザイン

Group	Dabigatran etexilate, PO		Idarucizumab, IV		No. of monkeys	
	Day	Dose [a] (mg/kg/day)	Day	Dose [b] (mg/kg)	Male	Female
1	1-4 15-18 29-32	0 (vehicle) 0 (vehicle) 0 (vehicle)	4 18 32	0 (vehicle) 0 (vehicle) 0 (vehicle)	1	1
2	1-4 15-18 29-32	0 (vehicle) 0 (vehicle) 0 (vehicle)	4 18 32	30 90 175	1	1
3	1-4 15-18 29-32	12 12 12	4 18 32	30 90 175	1	1

[a] 1～4，15～18 及び 29～32 日目にダビガトランエテキシラート又は溶媒を 1 日 1 回経口投与した。
[b] 4，18 及び 32 日目のダビガトランエテキシラート経口投与 1.5 時間後にイダルシズマブ又は溶媒を静脈内持続投与した。

イダルシズマブ，ダビガトラン及び総ダビガトランの血漿中濃度を測定するために採血し，イダルシズマブの血漿中濃度は ELISA 法を用いて，ダビガトラン及び総ダビガトランの血漿中濃度は LC-MS/MS 法を用いて測定した。抗凝固活性は，得られた血液試料を用いて測定した。24 時間にわたり尿試料を採取し，ダビガトランエテキシラートの前投与あり又はなしでのイダルシズマブの尿中排泄，及び総ダビガトランの尿中排泄に及ぼすイダルシズマブの影響について検討した。

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

3.2.2 サルにおけるイダルシズマブの薬物動態

ダビガトランエテキシラートの前経口投与あり又はなしで，サル（n=2）にイダルシズマブを静脈内投与したとき，イダルシズマブは投与後初期の急速な消失相とその後の比較的緩徐な終末相を有する二相性の血漿中濃度－時間推移を示した（図 3.2.2: 1）。

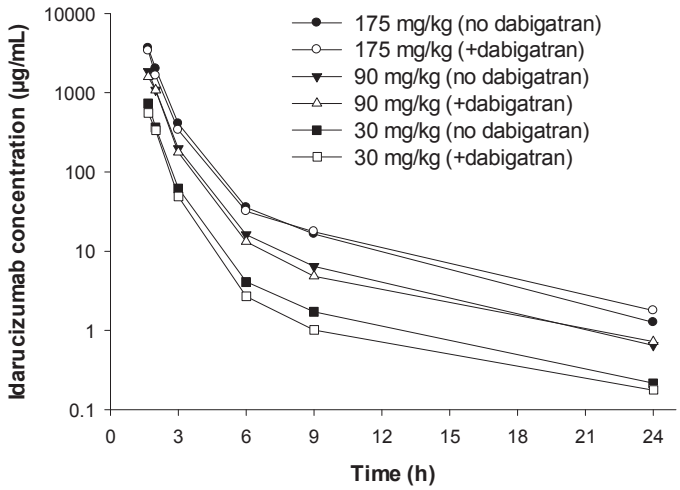


図 3.2.2: 1 サルにダビガトランエテキシラートの前経口投与あり又はなしでイダルシズマブを静脈内投与したときの血漿中濃度－時間推移（平均値，n=2）

イダルシズマブの曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$）は用量に比例して増加した（表 3.2.2: 1）。

表 3.2.2: 1 サルにダビガトランエテキシラートの前経口投与あり又はなしでイダルシズマブを静脈内投与したときのイダルシズマブの C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$（平均値, n=2）

Exposure	Presence of dabigatran	30 mg/kg	90 mg/kg	175 mg/kg
C_{max} (nM)	No	15400	38950	76700
	Yes	11550	33200	70750
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	No	12200	35500	69900
	Yes	10010	32650	60500

イダルシズマブの薬物動態パラメータ（CL，V_{ss}，MRT 及び $t_{1/2}$）は 3 用量すべてでほぼ同等であり，性差は認められなかった。したがって，3 用量すべてのイダルシズマブの薬物動態パラメータを統合した結果（n=6）を表 3.2.2: 2 に示す。イダルシズマブの V_{ss} は小さく，血漿容積をわずかに上回る程度であった。イダルシズマブの薬物動態パラメータ及び血漿中濃度－時間推移はダビガトランエテキシラートの前投与による影響を受けなかったことから，イダルシズマブ－ダビガトラン複合体及びイダルシズマブの分布及び排泄動態はほぼ同等であることが示唆された。イダルシズマブの血漿中濃度－時間推移の初期相の半減期は短く，終末相の半減期は中等度であった。MRT が短かったことは，速やかな消失を示している。

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

表 3.2.2: 2 サルにダビガトランエテキシラートの前経口投与あり又はなしでイダルシズマブを静脈内投与したときのイダルシズマブの薬物動態パラメータ [a]

PK Parameters	Idarucizumab (alone)		Idarucizumab (with dabigatran etexilate)	
	Mean	SD	Mean	SD
CL (mL/min/kg)	0.873	0.0464	1.01	0.114
V_{ss} (L/kg)	0.0576	0.00692	0.0671	0.0110
MRT (h)	1.11	0.165	1.12	0.251
$t_{1/2,\alpha}$ (h) [b]	0.394	0.0399	0.420	0.0458
$t_{1/2,\beta}$ (h) [b]	4.26	0.439	4.92	0.632

[a] 3 用量のイダルシズマブ投与群（2 例／群）から得られたデータすべてを併せて平均した（n=6）。
[b] イダルシズマブの二相性推移の特徴を明らかにするため，コンパートメント解析により初期相（α）及び終末相（β）の半減期を算出した。

3.2.3 イダルシズマブを投与したサルにおけるダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態

採血量の制限のためダビガトランエテキシラート単独群のダビガトラン及び総ダビガトランの血漿中濃度は本試験では検討しなかったが，別の PK/PD 試験で検討した（3.3.3 項）。サルにダビガトランエテキシラート及びイダルシズマブを併用した際のダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態パラメータを表 3.2.3: 1 に示す。ダビガトラン及び総ダビガトランの曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$）に一貫した性差は認められなかったため，雌雄の結果を統合した薬物動態パラメータを示す。

表 3.2.3: 1 サルにダビガトランエテキシラート及びイダルシズマブ（3 用量）を併用投与したときのダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態パラメータ（平均値，n=2，雌雄各 1 例の結果を統合）

Analyte	Dabigatran			Sum Dabigatran		
Day [a]	Day 4	Day 18	Day 32	Day 4	Day 18	Day 32
Idarucizumab Dose (mg/kg)	30	90	175	30	90	175
C_{max} (nM)	945	1500	1280	2710	3450	4380
$AUC_{0\text{-}24}$ (nM•h)	2120	4550	5010	8420	12900	13900

[a] 3 つの投与期の間に 2 週間のウォッシュアウト期間を設けて同じサルを使用し，すべてのサルにダビガトランエテキシラートを 12 mg/kg/日の用量で経口投与した。

総ダビガトランの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24}$ はダビガトランに比べて約 2～4 倍高かったことから，血漿中にグルクロン酸抱合体が多く存在していることが示唆された。イダルシズマブの用量を 30 mg/kg から 90 mg/kg に増加したとき，ダビガトランの $AUC_{0\text{-}24}$ は約 2 倍増加し，総ダビガトランの $AUC_{0\text{-}24}$ は約 1.5 倍増加した。しかし，イダルシズマブの用量を 90 mg/kg から 175 mg/kg に増加しても，ダビガトラン及び総ダビガトランの濃度がさらに上昇することはなかった。このことから，12 mg/kg のダビガトランエテキシラート経口投与後のダビガトラン及び総ダビガトランの曝露量に及ぼすイダルシズマブの影響は，90 mg/kg のイダルシズマブ静脈内投与によりほぼ最大となることが示唆された。

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

3.2.4 サルにおけるダビガトランの抗凝固活性に対するイダルシズマブの中和効果

サルにおける総ダビガトランの抗凝固活性に及ぼすイダルシズマブの中和効果について， dTT を測定することにより評価した。結果を図 3.2.4: 1 に示す。

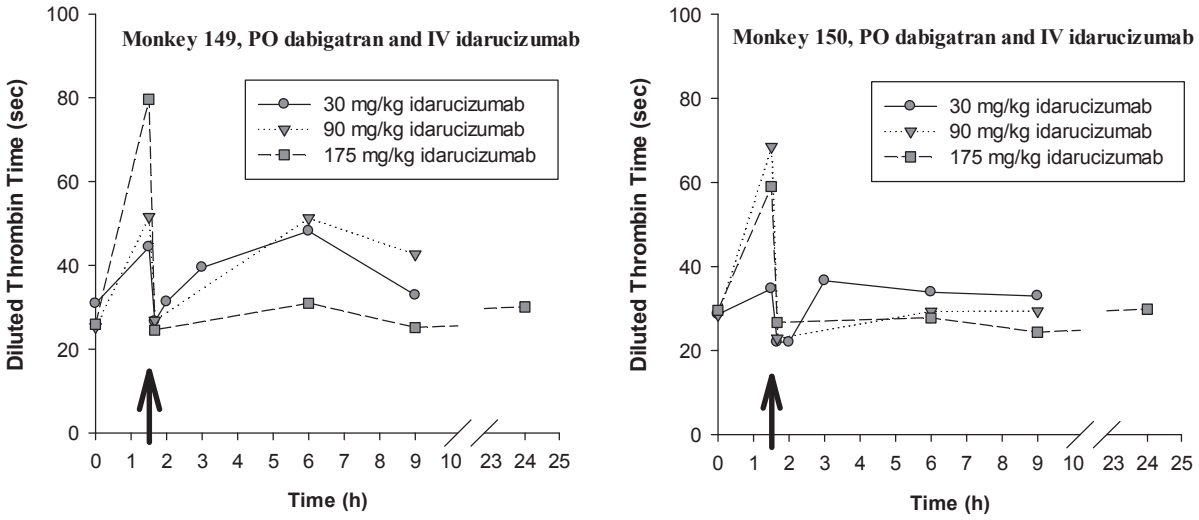


図 3.2.4: 1 ダビガトランエテキシラート経口投与及びイダルシズマブ静脈内投与したサルの血漿における希釈トロンビン時間

注： 矢印はダビガトランエテキシラート投与 1.5 時間後のイダルシズマブ投与を示す。採血量に制限があったため，30 及び 90 mg/kg 投与後 24 時間の試料は採取しなかった。

サルにダビガトランエテキシラートを 12 mg/kg 経口投与した 1.5 時間後（イダルシズマブ投与直前）に血漿中の dTT は上昇した。3 用量すべてにおいて，イダルシズマブの 10 分間静脈内持続投与終了時までに，dTT はベースライン値に回復した。すなわち，ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体による抗凝固活性はイダルシズマブ投与直後に完全に中和されると考えられた。イダルシズマブ 175 mg/kg 投与群では，いずれのサルにおいても，投与 24 時間後まで抗凝固活性の完全な中和効果が維持された。これより低い用量のイダルシズマブでは，30 mg/kg 投与群ではサル 2 例，90 mg/kg 投与群ではサル 1 例で 3 時間後に抗凝固活性が再出現し，抗凝固活性に対するイダルシズマブの持続的中和効果は用量に依存することが確認された。

サルにおける総ダビガトラン及びイダルシズマブの血漿中濃度－時間推移を図 3.2.4: 2 に示す。30 mg/kg 投与群で 2 例及び 90 mg/kg 投与群で 1 例に抗凝固活性が再出現したことは(図 3.2.4: 1)，血漿中でイダルシズマブに比べて過剰量の総ダビガトランが存在していたことと一致していた（図 3.2.4: 2）。高用量投与群（175 mg/kg）で認められた抗凝固活性に対するイダルシズマブの完全な中和効果は，血漿中のイダルシズマブ濃度が総ダビガトラン濃度に比べて高い場合に，投与 24 時間後まで維持された。したがって，血漿中の抗凝固活性は，総ダビガトラン濃度とイダルシズマブ濃度の差と相関すると考えられた。

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

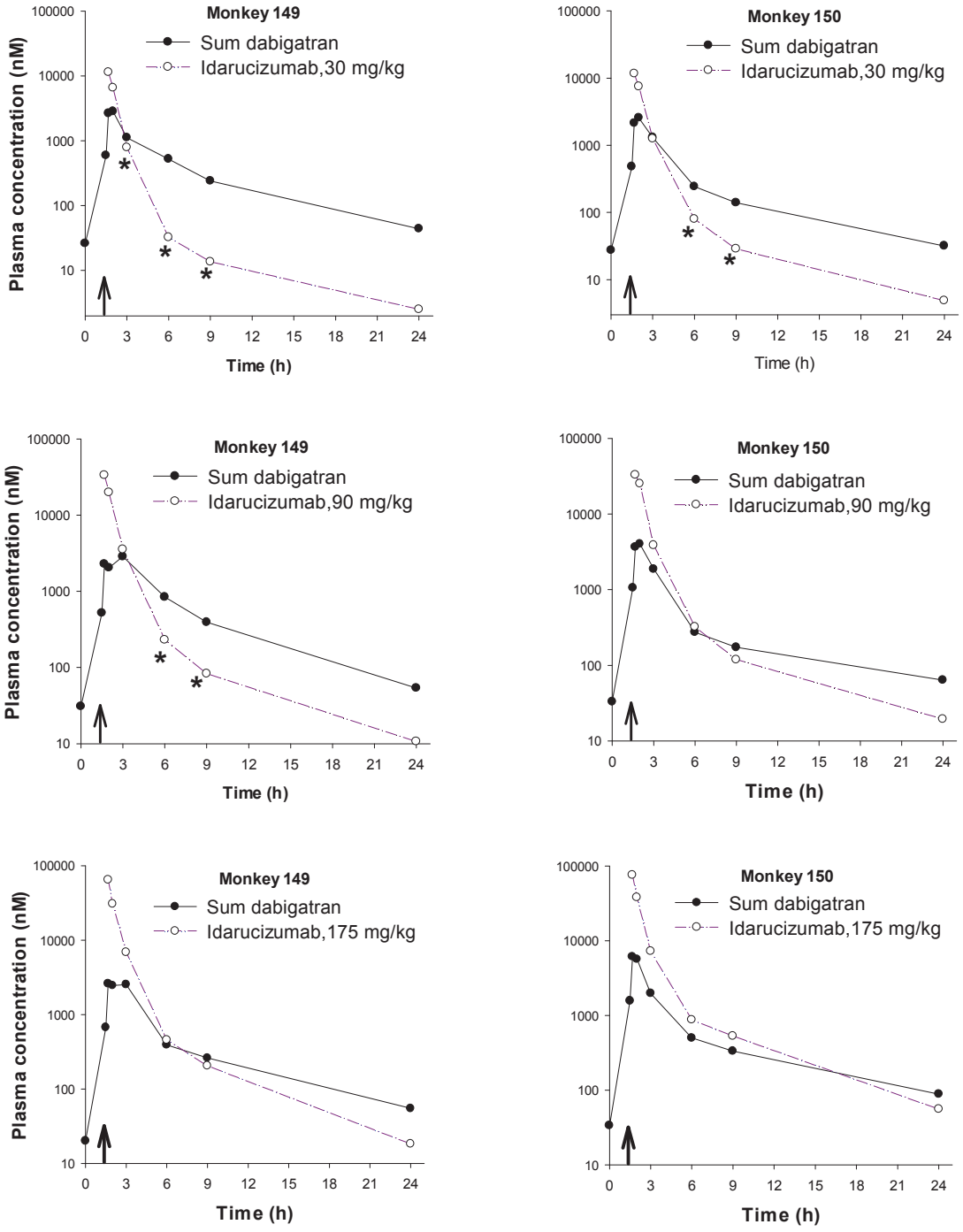


図 3.2.4: 2　　サル血漿中総ダビガトラン及びイダルシズマブ濃度の比較

注： 矢印はダビガトランエテキシラート投与 1.5 時間後のイダルシズマブ投与を示す。
* はダビガトラン濃度に対してイダルシズマブ濃度が不十分であることを示す。

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

3.3 サルにダビガトランエテキシラートを前経口投与した後にイダルシズマブを単回及び反復投与する PK/PD 試験

サル（アカゲ）に様々な用法用量でイダルシズマブを投与したときの総ダビガトランの抗凝固活性に対する中和効果を検討するための PK/PD 試験を実施した［試験番号 DDB0210; 動物試験部分の報告書：CTD 4.2.2.2-04_U12-3849 及び PK/PD 部分の報告書：CTD 4.2.2.2-05_U13-3539］。

3.3.1 試験デザイン

試験デザインを表 3.3.1: 1 に示す。雄サル 8 例を 2 つの投与群（各群 4 例）に割付け，3 つの投与期（1～4，8～11 及び 30～33 日目）にダビガトランエテキシラート 12 mg/kg/日を 1 日 1 回 4 日間経口投与した。また，4 日目のダビガトランエテキシラート投与 2.33 時間後にイダルシズマブを 1 回静脈内持続投与（30 又は 60 mg/kg），11 日目のダビガトランエテキシラート投与 1.5 及び 3 時間後にイダルシズマブを 2 回静脈内持続投与（30 + 30 又は 60 + 60 mg/kg），33 日目のダビガトランエテキシラート投与 1.5 時間後にイダルシズマブを 1 回静脈内持続投与（30 又は 60 mg/kg）した。投与群 1 には 30 mg/kg，投与群 2 には 60 mg/kg のイダルシズマブを 10 分間で静脈内持続投与した。

表 3.3.1: 1 サルを用いた PK/PD 試験の試験デザイン（n=4/群）

Dose phase	Day	Group	Dose route	Test substance	Dose level (mg/kg)
1	1 – 4	1	PO	Dabigatran etexilate	12
	1 – 4	2	PO	Dabigatran etexilate	12
	4	1	IV [a]	Idarucizumab	30
	4	2	IV [a]	Idarucizumab	60
2	8 – 11	1	PO	Dabigatran etexilate	12
	8 – 11	2	PO	Dabigatran etexilate	12
	11	1	IV [b]	Idarucizumab	30 + 30
	11	2	IV [b]	Idarucizumab	60 + 60
3	30 – 33	1	PO	Dabigatran etexilate	12
	30 – 33	2	PO	Dabigatran etexilate	12
	33	1	IV [c]	Idarucizumab	30
	33	2	IV [c]	Idarucizumab	60

[a] 4 日目の 4 回目のダビガトランエテキシラート経口投与 2.33 時間後にイダルシズマブを 10 分間静脈内持続投与した。
[b] 11 日目の 4 回目のダビガトランエテキシラート経口投与 1.5 及び 3 時間後にイダルシズマブをそれぞれ 10 分間静脈内持続投与した。
[c] 33 日目の 4 回目のダビガトランエテキシラート経口投与 1.5 時間後にイダルシズマブを 10 分間静脈内持続投与した。

第 3 投与期の 33 日目のサル 1 例でイダルシズマブ静脈内持続投与中に過敏症が認められ，試験終了前に安楽死させた。試料採取が不十分であったため，このサルにおける PK/PD データは得られなかったが，過敏症に関する安全性評価については毒性試験の概要文に記載する［CTD 2.6.6_3.2.1 項及び CTD 2.6.6_9.2 項］。

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

3.3.2 サルにおけるイダルシズマブの薬物動態

ダビガトランエテキシラートを前経口投与したサルにイダルシズマブを 1 回又は 2 回静脈内持続投与したときのイダルシズマブの血漿中濃度－時間推移を図 3.3.2: 1 に示す。

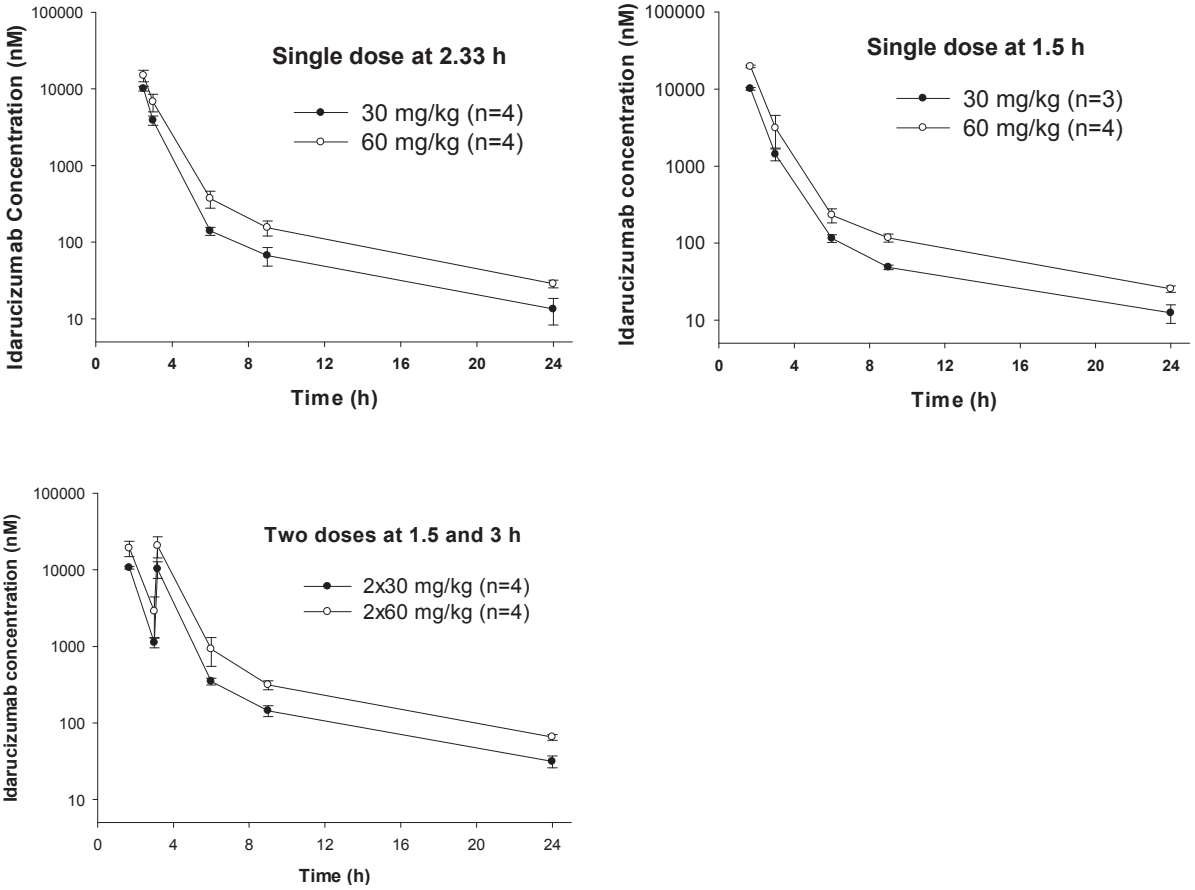


図 3.3.2: 1 ダビガトランエテキシラートを前経口投与したサルにイダルシズマブを 1 回又は 2 回静脈内持続投与したときのイダルシズマブの血漿中濃度－時間推移（平均値±SD）

ダビガトランエテキシラートを前経口投与したサルにイダルシズマブを 1 回又は 2 回静脈内持続投与したときのイダルシズマブの薬物動態パラメータを表 3.3.2: 1 に示す。

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

表 3.3.2: 1　ダビガトランエテキシラートを前経口投与したサルにイダルシズマブを 1 回又は 2 回静脈内持続投与したときのイダルシズマブの薬物動態パラメータ [a]

PK Parameter	Dose (mg/kg)	Day 4 single dose at 2.33 h	Day 11 two doses at 1.5 & 3 h	Day 33 single dose at 1.5 h	Overall Mean ± SD
C_{max} (nM)	30	10100 ± 746	11300 ± 520	10100 ± 395	Not applicable
	60	15000 ± 2560	21200 ± 5390	19700 ± 705	
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	30	11400 ± 820	27100 ± 3610	11600 ± 305	Not applicable
	60	26100 ± 5320	54200 ± 13600	23700 ± 3360	
CL (mL/min/kg)	30	0.919 ± 0.0670	0.784 ± 0.118	0.902 ± 0.0241	0.902 ± 0.177
	60	1.09 ± 0.231	0.822 ± 0.266	0.895 ± 0.112	
V_{ss} (L/kg)	30	0.0739 ± 0.0167	0.0592 ± 0.0181	0.0719 ± 0.0103	0.0763 ± 0.0265
	60	0.107 ± 0.0323	0.0712 ± 0.0411	0.0740 ± 0.00866	
$t_{1/2}$ (h)	30	5.59 ± 0.717	5.62 ± 0.457	6.15 ± 0.890	5.64 ± 0.585
	60	5.29 ± 0.348	5.32 ± 0.552	6.01 ± 0.252	
MRT (h)	30	1.34 ± 0.286	1.24 ± 0.186	1.33 ± 0.187	1.38 ± 0.227
	60	1.61 ± 0.195	1.37 ± 0.298	1.38 ± 0.0899	

[a] 平均値 ± SD（n=4）；ただし，サル 1 例を安楽死させたため，33 日目の 30 mg/kg 投与群は n=3 である。

イダルシズマブの $AUC_{0-\infty}$は用量にほぼ比例して増加した。イダルシズマブの CL は 3 つの投与期及び全用量を通して同様であった。V_{ss} は小さく（0.0763 L/kg），血漿容積をわずかに上回る程度であった。終末相半減期は平均 5.64 時間であり，MRT は 1.38 時間と短かった。これらの薬物動態パラメータは，サルを用いた探索的用量漸増試験（3.2 項）の結果と同様であった。

過敏症が認められたサルを含めて，サル 8 例中 6 例で 30 日目（第 3 投与期前）に血漿中に抗イダルシズマブ抗体が検出された。イダルシズマブの曝露量及び有効性は抗イダルシズマブ抗体が存在しても影響を受けなかったが，これは抗イダルシズマブ抗体濃度に比べてイダルシズマブ濃度がはるかに高いためであると考えられた。イダルシズマブ定量法の LLOQ は 50 ng/mL であり，イダルシズマブの平均 C_{max} は 30 mg/kg 投与群の 10100 nM（483000 ng/mL）から，2×60 mg/kg 投与群の 21200 nM（1010000 ng/mL）の範囲であった（表 3.3.2: 1）。一方，抗イダルシズマブ抗体検出法の検出下限は陽性対照で 0.29 ng/mL であり，陽性対照の値と比較した 30 日目の低いシグナルから，抗イダルシズマブ抗体濃度は数 ng/mL 程度と推察された。したがって，抗イダルシズマブ抗体がイダルシズマブ濃度に比べてはるかに低いと予想されることから，イダルシズマブの薬物動態及び有効性に影響しなかったと考えられた。

3.3.3　サルにおけるダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態に及ぼすイダルシズマブの影響

サルにダビガトランエテキシラートを経口投与したときのダビガトラン及び総ダビガトランの薬物動態に及ぼすイダルシズマブの影響をそれぞれ表 3.3.3: 1 及び表 3.3.3: 2 に示す。

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

表 3.3.3: 1 サルにおけるダビガトランの薬物動態パラメータ：イダルシズマブ投与の影響 [a]

PK Parameter	Idarucizumab Dose (mg/kg)	Descriptive statistics	Day 3	Day 4	Day 11	Day 33
			No idarucizumab	single idarucizumab dose at 2.33 h	two idarucizumab doses at 1.5 & 3 h	single idarucizumab dose at 1.5 h
C_{max} (nM)	30	Mean	120	476	701	513
		SD	122	275	637	478
		%CV	102	57.8	90.9	93.2
	60	Mean	245	1320	1150	2500
		SD	294	709	1030	2490
		%CV	120	53.6	89.6	99.8
AUC_{0-24} (nM•h)	30	Mean	535	1740	2100	1710
		SD	478	777	1280	1410
		%CV	89.3	44.7	61.1	82.5
	60	Mean	1030	4650	4430	6200
		SD	1060	2260	4190	6410
		%CV	102	48.6	94.4	103

[a] 平均値（n=4）；ただし，サル 1 例を安楽死させたため，33 日目の 30 mg/kg 投与群は n=3 である。

表 3.3.3: 2 サルにおける総ダビガトランの薬物動態パラメータ：イダルシズマブ投与の影響 [a]

PK Parameter	Idarucizumab Dose (mg/kg)	Descriptive statistics	Day 3	Day 4	Day 11	Day 33
			No idarucizumab	single idarucizumab dose at 2.33 h	two idarucizumab doses at 1.5 & 3 h	single idarucizumab dose at 1.5 h
C_{max} (nM)	30	Mean	672	2120	2570	1690
		SD	693	1360	2470	1640
		%CV	103	64.1	96.2	96.9
	60	Mean	934	4730	4010	6700
		SD	963	2540	2920	5390
		%CV	103	53.8	72.9	80.5
AUC_{0-24} (nM•h)	30	Mean	4220	6860	5810	4880
		SD	3540	3790	4150	4250
		%CV	83.9	55.2	71.4	87.1
	60	Mean	6510	15900	11400	17000
		SD	6010	8000	9520	15600
		%CV	92.4	50.3	83.2	91.8

[a] 平均値（n=4）；ただし，サル 1 例を安楽死させたため，33 日目の 30 mg/kg 投与群は n=3 である。

3，4，11 及び 33 日目の総ダビガトランの C_{max} 及び AUC_{0-24} 値はダビガトランに比べて一貫して高く（約 3～8 倍），血漿中にダビガトランのグルクロン酸抱合体が多く存在していることが示された。ダビガトランの C_{max} 及び AUC_{0-24} は，イダルシズマブ併用群（4，11 及び 33 日目）の方が非併用群（3 日目）に比べて高く（最大 10 倍），総ダビガトランの C_{max} 及び AUC_{0-24} もイダルシズマブ併用群（4，11 及び 33 日目）の方が非併用群（3 日目）に比べて高かった（最大 7 倍）。サルでみられたこの曝露量の違いは，ラットの結果と同様であった（3.1 項）。すなわち，イダル

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

シズマブとの併用によってイダルシズマブ非結合型のダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の血漿中濃度が低下したため，平衡状態の変化－つまり組織から血漿へのダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の再分布が起こったと考えられた。これらの結果から，ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の動態は，一度イダルシズマブに結合すると，ダビガトラン－イダルシズマブ複合体及びダビガトラングルクロン酸抱合体－イダルシズマブ複合体の形でイダルシズマブによって制御されることが示唆された。

3.3.4 サルにおけるイダルシズマブによる抗凝固作用の中和効果

サルにおける経口投与後のダビガトラン及び総ダビガトランの曝露量のばらつきは大きかったが（%CV：45～120%），これはダビガトランエテキシラートのバイオアベイラビリティが約 5%と低かったことが原因のひとつと考えられた。なお，バイオアベイラビリティは，経口投与後（表 3.3.3: 2，イダルシズマブ非併用時の 3 日目）と静脈内投与後［CTD 4.2.2.2-02_U01-1761］の用量で補正した総ダビガトランの AUC の比から算出した。経口投与時の動物個体間の変動が大きかったため，イダルシズマブ投与前（3 日目）の総ダビガトラン曝露量は，3 日目まで全く同じ処理を行ったにもかかわらず，投与群 1 のサルに比べて投与群 2 のサルの方が高かった。これらの結果から，総ダビガトランの抗凝固活性を同程度に中和するためには，投与群 1 に比べて投与群 2 では，より高用量のイダルシズマブが必要であることが示された。これと一致して，投与群 1（総ダビガトラン曝露量が低いサルに対してイダルシズマブを 30 mg/kg 投与）と投与群 2（総ダビガトラン曝露量が高いサルに対してイダルシズマブを 60 mg/kg 投与）の間で中和効果に明らかな差は認められなかった。

総ダビガトラン曝露量が比較的低いサルにおいて，1 又は 2 回のイダルシズマブ投与で全試験期間を通して総ダビガトランの抗凝固活性が完全に中和され，各測定時点での血漿中イダルシズマブ濃度は血漿中総ダビガトラン濃度と同等以上であった。

総ダビガトラン曝露量が高いサルでは，イダルシズマブ単回投与後に抗凝固活性が一時的に再出現した。しかし，イダルシズマブを 2 回投与（ダビガトランエテキシラートの経口投与後 1.5 及び 3 時間後に投与）することにより，全試験期間を通して抗凝固活性の完全な中和効果が維持された。中和効果の例として，サル 217 の結果を図 3.3.4: 1 に示す。サル 217 では，総ダビガトラン曝露量が検討した個体中でほぼ最高値を示した。抗凝固活性が再出現した期間では血漿中イダルシズマブ濃度は血漿中総ダビガトラン濃度に比べて低かったが，完全な中和効果が認められた期間では血漿中イダルシズマブ濃度は血漿中総ダビガトラン濃度と同等以上であった。これらの結果から，イダルシズマブの中和効果と，イダルシズマブと総ダビガトラン間の血漿中濃度差の間に相関が認められることが示された。

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

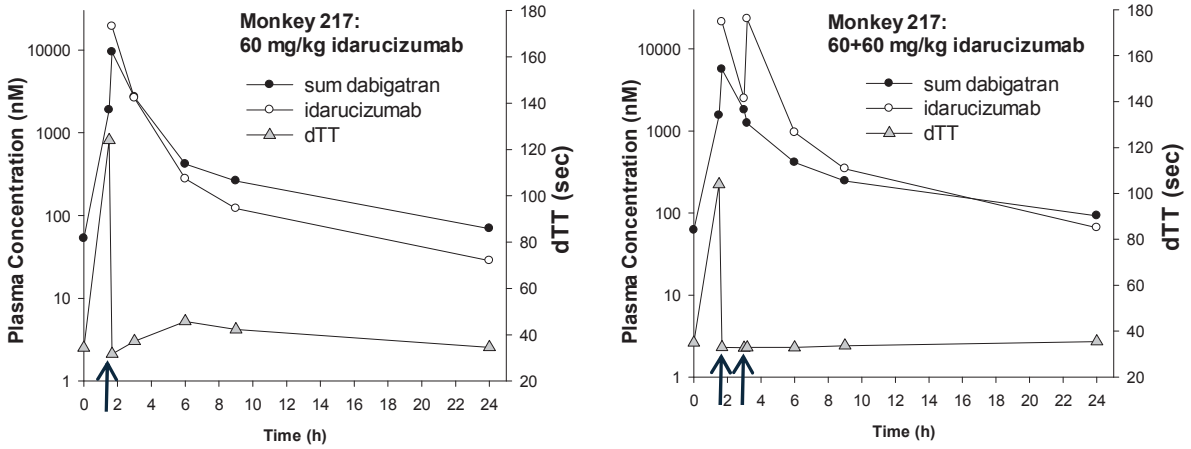


図 3.3.4: 1 ダビガトランエテキシラートを前経口投与したサル 217 にイダルシズマブを単回投与したときの抗凝固活性の一時的な再出現及び 2 回投与したときの抗凝固活性の完全中和の維持

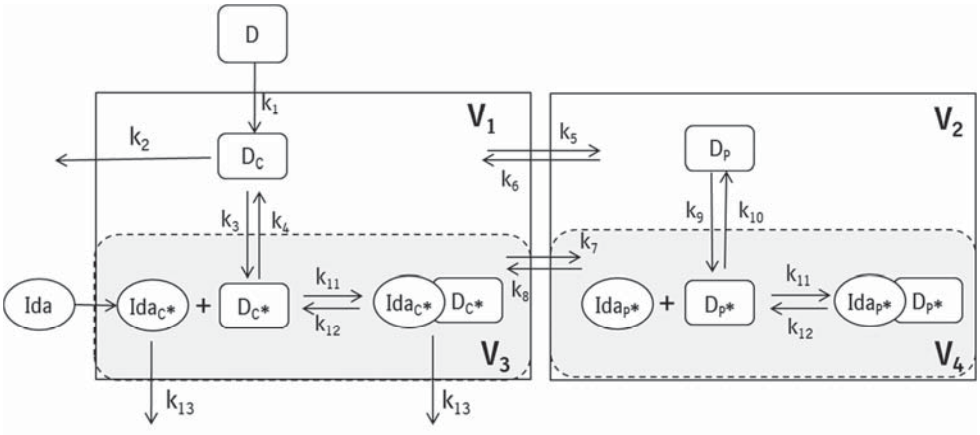
注：矢印はイダルシズマブ投与を示す。

3.4 イダルシズマブとダビガトラン間の相互作用を記述するモデルの開発

イダルシズマブの有効性の予測及び用法用量の選択に利用するため，サルの PK/PD データに基づいて，イダルシズマブとダビガトランの間の相互作用を記述する semi-mechanistic モデルを開発し，バリデーションを行った［CTD 4.2.2.2-06_n00234295］。本モデルを用いて，健康被験者及び外傷を有する麻酔下のブタにイダルシズマブとダビガトランエテキシラートを併用投与したときの総ダビガトラン及び活性型（イダルシズマブ非結合型）ダビガトランの血漿中濃度－時間推移をシミュレートした。本モデルの構造を図 3.4: 1 に示す。相互作用を記述する母集団薬物動態モデルについては，臨床薬理試験の概要文［CTD 2.7.2］に記載する。

本モデルでは，2 コンパートメントモデルを用いて総ダビガトランの薬物動態を記述し，別の 2 コンパートメントモデルを用いてイダルシズマブ及び総ダビガトラン－イダルシズマブ複合体の薬物動態を記述した。本モデルは，イダルシズマブと総ダビガトラン－イダルシズマブ複合体の分布及び排泄動態が同様であるという仮定，すなわち，イダルシズマブに結合した総ダビガトランの薬物動態はイダルシズマブの薬物動態と同様であるという仮定に基づいて設計した。イダルシズマブに結合していない活性型ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体は総ダビガトラン及びイダルシズマブのコンパートメント間で速やかに分布し，イダルシズマブに結合したダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体は複合体の形でイダルシズマブコンパートメント内に留まるように，総ダビガトランとイダルシズマブのコンパートメントを結合させた。

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



Parameter	Description
V_1	Central compartment (dabigatran)
V_2	Periphery compartment (dabigatran)
V_3	Central compartment (idarucizumab) Central binding compartment (dabigatran-idarucizumab complex)
V_4	Periphery compartment (idarucizumab) Periphery binding compartment (dabigatran-idarucizumab complex)
D	Dabigatran dose
D_C	Dabigatran in central compartment
D_{C*}	Dabigatran in central binding compartment
D_P	Dabigatran in periphery compartment
D_{P*}	Dabigatran in periphery binding compartment
Ida	Idarucizumab dose
Ida_{C*}	Idarucizumab in central binding compartment
Ida_{P*}	Idarucizumab in periphery binding compartment
$Ida_{C*}D_{C*}$	Dabigatran-idarucizumab complex in central binding compartment
$Ida_{P*}D_{P*}$	Dabigatran-idarucizumab complex in periphery binding compartment

図 3.4: 1　　ダビガトランとイダルシズマブの相互作用に関するモデル

サルを用いた 2 試験の結果（試験デザイン及びそのデータは 3.2~3.3 項参照）を用いて，モデルの開発及びバリデーションを行った。総ダビガトラン及びイダルシズマブに使用したパラメータは，ダビガトランエテキシラート及びイダルシズマブを別々に投与したときの総ダビガトラン及びイダルシズマブの血漿中濃度の測定値を用いたコンパートメント解析により推定した。このモデルを用いて，サルにおいて，イダルシズマブ投与量依存的に血漿中活性型ダビガトラン濃度が低下し，血漿中総ダビガトラン濃度が上昇することを再現することができた。また，このモデルを用いて，イダルシズマブ投与量が体内に存在する総ダビガトラン量（モル単位）に比べて少ない場合，総ダビガトランが末梢コンパートメントから中心結合コンパートメントへと再分布することにより，血漿中に活性型ダビガトランが一過性に再出現することも示された。

イダルシズマブのヒト初回投与試験の試験デザインを計画するため，Dedrick plot 法を用いた種間スケーリングにより，サルにおけるイダルシズマブの薬物動態データからヒト薬物動態パラメータを予測した［CTD 4.2.2.2-07_U12-3374］。さらに，予測したヒト薬物動態パラメータをバリデートしたモデルに用いて，健康被験者における活性型ダビガトラン濃度の低下に及ぼすイダル

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

シズマブの効果をシミュレートした。本モデルにより，健康被験者にダビガトランエテキシラートを 220 mg の用量で 1 日 2 回投与した場合，持続的に活性型ダビガトラン濃度を 40 nM 未満（臨床で問題となる抗凝固活性が認められない濃度）に低下させるために必要なイダルシズマブ有効用量は，2000 mg と推定された。また，本モデルにより，2000 mg より低用量（1000 mg）のイダルシズマブを投与した場合，血漿中に活性型ダビガトラン（約 100 nM）が一過性に再出現することも推定できた。ダビガトランエテキシラートの 220 mg 1 日 2 回投与に加えて，イダルシズマブを 1000，2000 又は 4000 mg の用量で投与（CTD 5.3.4.1-01_U13-1773）したときの活性型（イダルシズマブ非結合型）ダビガトラン（例として図 3.4: 2 参照）及び総（未抱合体及び抱合体）ダビガトランの血漿中濃度－時間推移のシミュレーションは，それぞれの実測値とほぼ一致していた。なお，ダビガトランの血漿タンパク結合率は低い（ヒトで約 29%）ことから，活性型ダビガトランと血漿タンパク非結合型の総ダビガトランの間の濃度差は小さいと考えられる。以上の結果から，このモデルは，サル及びヒトにおけるイダルシズマブと総ダビガトランの間の相互作用を記述するのに適切であると考えられた。

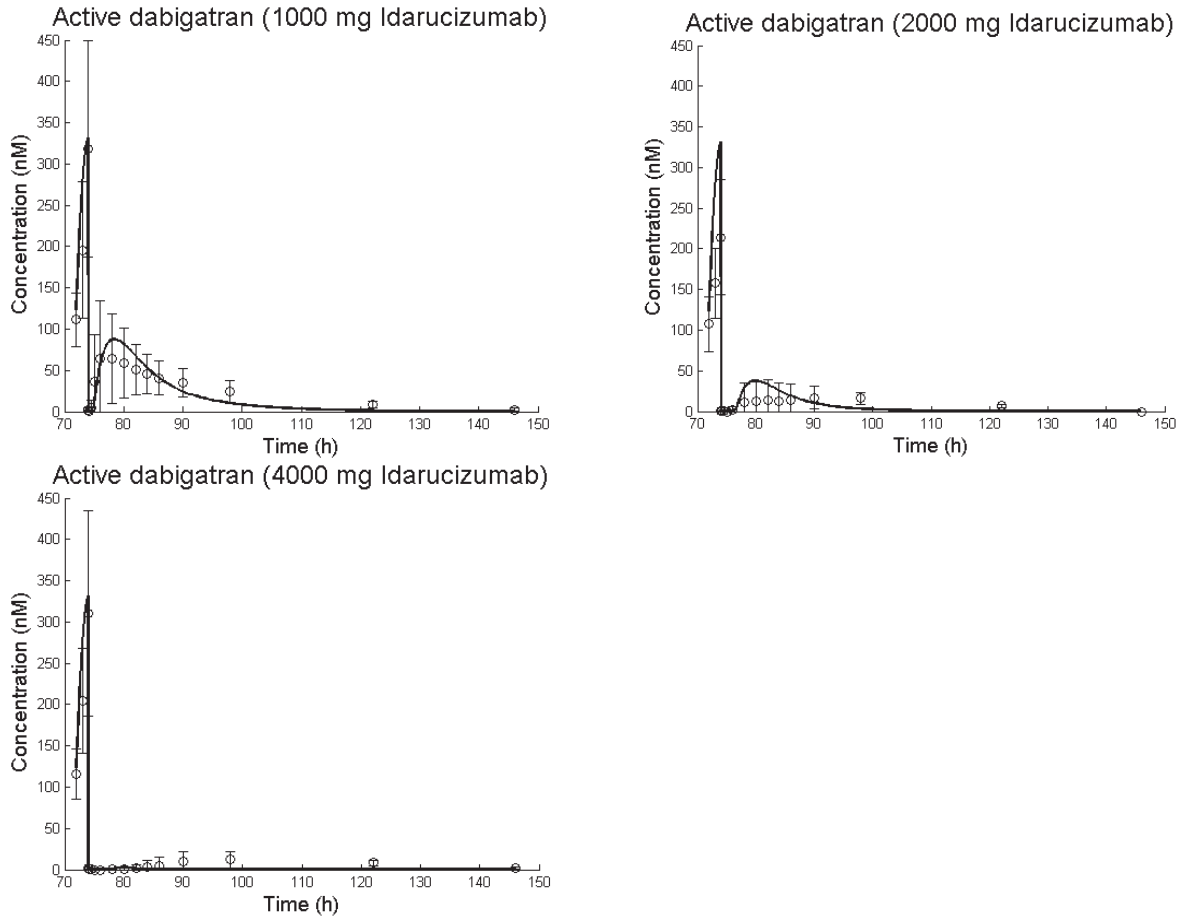


図 3.4: 2　ヒトにおけるイダルシズマブによる用量依存的な活性型ダビガトラン濃度低下のシミュレーション（線）及び非結合型総ダビガトラン濃度の実測値（○）の比較（平均値±SD，n=9）

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

本モデルを用いて，イダルシズマブとダビガトラン間の相互作用を説明できるかどうかをさらに検討するため，外傷を有する麻酔下のブタを用いた試験から得られたイダルシズマブ及び総ダビガトランの薬物動態データをこのモデルにあてはめた［CTD 4.2.1.1-11_n00231240，CTD 4.2.1.1-10_n00238140 及び CTD 2.6.2_2.4.2 項参照］。様々な用法用量でイダルシズマブを投与したときにシミュレートされた活性型ダビガトラン（例として図 3.4: 3 参照）及び総ダビガトランの血漿中濃度は，外傷を有する麻酔下のブタから得られた実測値とほぼ一致していた。このシミュレーションの結果から，外傷を有する麻酔下のブタにおいて，ダビガトラン抗凝固活性に対するイダルシズマブの中和効果に及ぼす外傷及び麻酔の影響はわずかであることが示唆された。さらに，外傷を有する麻酔下の患者に本モデルを応用することの妥当性も示唆された。

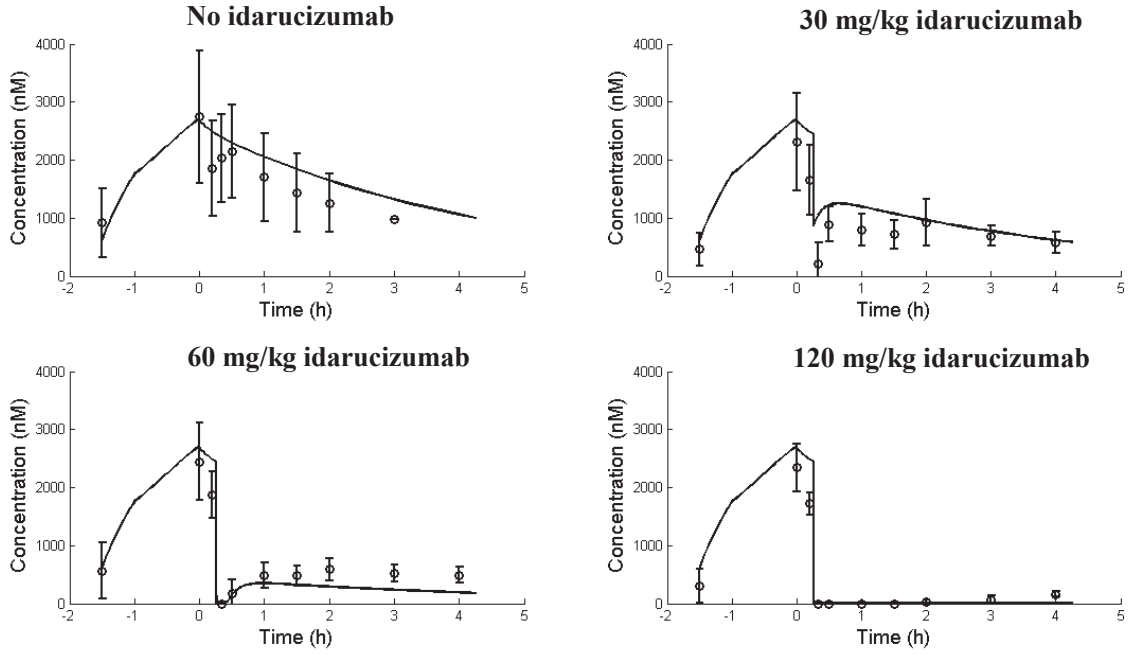


図 3.4: 3 外傷を有する麻酔下のブタにおけるイダルシズマブによる用量依存的な活性型ダビガトラン濃度低下のシミュレーション（線）及び活性型ダビガトラン濃度の実測値（○）の比較（平均値±SD，n=6/群）

3.5 反復投与後のトキシコキネティクス

ラット（Crl:WI(Han)）及びサル（アカゲ）を用いた単回投与及び反復投与毒性試験の一環として，イダルシズマブのトキシコキネティクス（TK）及び免疫原性を検討した。詳細な TK データは毒性試験の概要文［CTD 2.6.6］及び毒性試験の概要表［CTD 2.6.7_3 項］に記載する。

イダルシズマブの用量，反復投与，性別，ダビガトランエテキシラート前投与及び免疫原性がイダルシズマブの TK プロファイルに及ぼす影響について検討した。イダルシズマブの曝露量は用量にほぼ比例して増加し，ラットに 1 日 1 回 4 週間（ダビガトラン非存在下），サルに 1 日 1 回 2 週間（ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の存在下及び非存在下）反復投与しても変

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

化は認められなかった。イダルシズマブの曝露量に性差は認められなかった。サルにダビガトランエテキシラートを前投与してもイダルシズマブの曝露量に影響は認められなかった。

ラット（4 週間）及びサル（2 週間）にイダルシズマブを反復投与したとき，抗イダルシズマブ抗体が検出されたが，その存在はラット及びサルのイダルシズマブ曝露量，並びにサルのイダルシズマブ有効性に影響を及ぼさなかった。

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

4. 分布

イダルシズマブの組織分布試験は実施しなかった。

イダルシズマブはヒト化抗ダビガトラン IgG 抗体の Fab であり，ダビガトランに特異的に結合するよう設計されているので，組織への特異的な結合はないと予想された。このことは組織交差反応性試験で確認されており，検討したラット，サル及びヒト組織でイダルシズマブ特異的な染色は認められなかった［CTD 4.2.3.7.7-01_U12-3331 及び CTD 2.6.6_8.1 項］。ラット及びサルにおけるイダルシズマブの定常状態における分布容積（V_{ss}）は血漿量をわずかに上回る程度と小さく（3 項），血管腔以外へのイダルシズマブの分布は限られていることが示唆された。さらに，イダルシズマブは速やかに消失し（3 項及び 6 項），ラットで 4 週間［CTD 4.2.3.2-02_U12-3327］，サルで 2 週間［CTD 4.2.3.2-05_n00230533，CTD 2.6.7_3 項］にわたり 1 日 1 回反復投与しても蓄積はみられなかった（3.5 項）。これらの結果から，イダルシズマブの組織分布は限定的であり，さらに，ヒトでイダルシズマブを反復投与することは想定されないので，イダルシズマブの詳細な組織分布試験を実施する必要はないと考えられた。

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

5. 代謝

抗体フラグメントであるイダルシズマブはバイオテクノロジー応用医薬品であるため，ICH S6（R1）に従って，代謝試験は実施しなかった。他のタンパク質医薬品と同様，イダルシズマブは異化作用によるアミノ酸への分解及び尿中への直接排泄により消失すると予想された。ラット及びサルにイダルシズマブを投与したときの尿中未変化体排泄率は約 10～20%に過ぎず（6 項），残りのイダルシズマブ（80～90%）は異化によって消失したと推定された。このことは，マウス［CTD 4.3-17_R14-1440，CTD 4.3-16_R14-1439］及びヒト［CTD 4.3-15_R14-1438］に静脈内投与した放射性標識抗体フラグメント（Fab 等）は，主に腎臓に取り込まれた後，腎臓内で異化を受けると報告した文献と一致している。

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

6. 排泄

イダルシズマブを静脈内投与したときのイダルシズマブの尿中排泄を，ラットではダビガトランの前投与あり又はなしで，サルではダビガトランエテキシラートの前投与あり又はなしで検討した。さらに，ラットにダビガトランを静脈内投与したときのダビガトランの尿中排泄に及ぼすイダルシズマブの影響，及びサルにダビガトランエテキシラートを経口投与したときの総ダビガトランの尿中排泄に及ぼすイダルシズマブの影響についても検討した。ラットで生成するダビガトラングルクロン酸抱合体は無視できる程度であることから［CTD 4.2.2.2-03_U04-1627］，ラットの尿では非抱合型ダビガトラン濃度のみを測定した（2.2.1 項）。サルの尿中には多量のダビガトラングルクロン酸抱合体が存在するが，試料採取及び試料処理の過程で部分的にダビガトランへと加水分解されるため，尿中の非抱合型ダビガトラン濃度が過大評価されてしまう可能性がある。したがって，サルの尿では総ダビガトラン（非抱合型及び抱合型）濃度を測定した（2.2.5 項）。

6.1 ラットにおけるイダルシズマブ及びダビガトランを単独又は併用投与したときの尿中排泄

ラットにおけるイダルシズマブの尿中排泄（ダビガトランの前投与あり又はなし）及びダビガトランの尿中排泄に及ぼすイダルシズマブの影響について検討した［CTD 4.2.2.2-01_U12-3083］。3 群の雄ラット（Crl:WI(Han) 各群 3 例）にそれぞれダビガトラン 0.2 mg/kg 静脈内投与，イダルシズマブ 20 mg/kg 静脈内投与又はダビガトラン 0.2 mg/kg 静脈内投与に続いて 15 分後にイダルシズマブ 20 mg/kg 静脈内投与した。投与後 48 時間まで尿試料を採取した。単独及び併用投与におけるイダルシズマブ及びダビガトランの尿中排泄率を表 6.1: 1 に示す。

表 6.1: 1 ラットにイダルシズマブ及びダビガトランを単独又は併用投与したときの尿中排泄率（平均値±SD, n=3）

Interval (h)	Idarucizumab urinary excretion (%dose)		Dabigatran urinary excretion (%dose)	
	Alone	With dabigatran	Alone	With idarucizumab
0-8	13.2 ± 6.08	16.0 ± 5.04	50.9 ± 29.2	42.5 ± 11.2
8-24	1.12 ± 0.76	4.18 ± 3.17	5.99 ± 1.39	15.1 ± 8.87
24-48	0.25 ± 0.38	0.57 ± 0.85	0.39 ± 0.37	1.70 ± 1.22
0-48 (total)	14.5 ± 6.91	20.8 ± 6.68	57.2 ± 30.6	59.3 ± 17.1

ダビガトラン前投与あり又はなしでのイダルシズマブの尿中排泄率はそれぞれ 20.8%及び 14.5%であり，投与したイダルシズマブの大部分は異化作用を介して消失することが示された。ダビガトランの前投与ありとなしの間でのラット尿中イダルシズマブ排泄率の差は，各 SD 値からばらつきの範囲内と考えられた。尿中に排泄されたイダルシズマブの大部分は，最初の試料採取時間（0～8 時間）に排泄された。

静脈内投与したダビガトランの大部分は尿中に回収された。イダルシズマブとの併用群（59.3%）及び非併用群（57.2%）の間でダビガトランの尿中排泄率に差は認められなかった。しかし，併用群ではダビガトランの尿中排泄がやや遅延する傾向が認められた。ラットにおけるイダルシズマ

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

ブの CL はダビガトランと比べて低いので（3.1 項），この排泄遅延はイダルシズマブに結合したダビガトランの排泄動態がイダルシズマブの動態によって制御されたことを反映していると考えられた。

6.2 サルにおけるイダルシズマブの尿中排泄及びダビガトランとの相互作用

イダルシズマブの尿中排泄及び総ダビガトラン尿中排泄に及ぼすイダルシズマブの影響について，サル（アカゲ）を用いたイダルシズマブの探索的用量漸増試験の一環として検討した［CTD 4.2.3.2-01_U12-3326］。試験デザイン，薬物動態及び PK/PD の結果は 3.2 項に示す。投与後 24 時間までの尿試料を採取し，ダビガトランエテキシラートの前投与あり又はなしでのイダルシズマブの尿中排泄，並びに総ダビガトランの尿中排泄に対するイダルシズマブの影響について検討した。

投与したイダルシズマブは平均して約 10%が尿中に回収された。ダビガトランの前投与あり（11.1%）となし（8.77%）の間でイダルシズマブの尿中排泄率に明白な差は認められなかった。

イダルシズマブの投与あり又はなしでのダビガトランエテキシラート経口投与後の総ダビガトランの尿中排泄率を表 6.2: 1 に示す。総ダビガトランの尿中排泄率に明白な性差は認められず，したがって，雌雄サルのデータを平均した。投与したダビガトランエテキシラートの少量（1.70～1.99%，ダビガトラン当量）がサル尿中に総ダビガトランとして回収された。このことは，サルにおけるダビガトランエテキシラートの経口バイオアベイラビリティが低い（約 5%）ことと一致している（3.3.4 項）。イダルシズマブを投与しても，サルの尿中に排泄されるダビガトランの割合は変化しなかった。

表 6.2: 1 イダルシズマブの投与あり又はなしでの総ダビガトランの尿中排泄率（平均値，サル 2 例）

Idarucizumab dose (mg/kg)	0	30	90
Interval (h)	Day 3	Day 4	Day 18
0-1.5	0.00	0.10	0.16
1.5-4	0.74	0.13	0.48
4-8	0.22	0.46	0.25
8-24	0.74	1.10	1.11
0-24 (Total)	1.70	1.79	1.99

6.3 サルにおけるイダルシズマブ及びダビガトランの尿中排泄

サル（アカゲ）を用いた PK/PD 試験の一環として，イダルシズマブの尿中排泄及び総ダビガトランの尿中排泄に対するイダルシズマブの影響について検討した［CTD 4.2.2.2-04_U12-3849，CTD 4.2.2.2-05_U13-3539］。試験デザイン，薬物動態，PK/PD 及び免疫原性評価の結果は 3.3 項に示す。投与後 48 時間までの尿試料を採取した。

異なる用法（ダビガトランエテキシレート投与 2.33 時間後に単回投与，1.5 時間後に単回投与，1.5 時間後及び 3 時間後に 2 回投与）及び用量（30 mg/kg 及び 60 mg/kg）を通して，イダルシズマブの尿中排泄率に明確な差は認められなかったため，尿中排泄率データを統合して表 6.3: 1 に示

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

す。尿中排泄率の個体間変動は大きかったが，投与したイダルシズマブは平均して約 10%が尿中に排泄された。尿中に排泄されたイダルシズマブの大部分は，最初の試料採取時間（0～8 時間）に回収された。

表 6.3: 1 サルにおけるイダルシズマブの尿中排泄率（平均値 ± SD, n=23 [a]）

Interval (h)	Idarucizumab urinary excretion (%dose)	
	Mean	SD
0-8	8.33	5.85
8-24	1.18	1.19
24-32	0.17	0.21
32-48	0.25	0.25
0-48 (Total)	9.93	6.46

[a] 各用法用量でそれぞれサル 4 例。ただし，1 例を最終投与期に安楽死させた。

総ダビガトランの尿中排泄率を表 6.3: 2 に示す。ダビガトランエテキシラートを定常状態に達するまで 1 日 1 回投与したことから，ダビガトランエテキシラートの投与間隔である投与後 24 時間までの尿中排泄率を計算した。3 日目はイダルシズマブ非併用下での総ダビガトランの尿中排泄率を示し，4，11 及び 33 日目は様々な用法用量でイダルシズマブを併用投与したときの総ダビガトランの尿中排泄率を示す。

表 6.3: 2 サルにおける総ダビガトランの尿中排泄率に及ぼすイダルシズマブの影響

Dabigatran/ Idarucizumab Dose (mg/kg)	Sum dabigatran (%Dose, Mean ± SD, n=4/group)			
	No idarucizumab (Day 3)	Single idarucizumab dose at 2.33 h (Day 4)	Two idarucizumab doses at 1.5 and 3 h (Day 11)	Single idarucizumab dose at 1.5 h (Day 33)
12 / 30	1.38 ± 1.29	1.40 ± 1.06	1.03 ± 0.91	0.639 ± 0.475 [a]
12 / 60	1.47 ± 1.18	1.83 ± 0.72	1.83 ± 1.34	2.41 ± 2.46
Combined	1.43 ± 1.15	1.56 ± 1.31		

[a] 1 例を安楽死させたため n=3/group

経口投与したダビガトランエテキシラートの少量（イダルシズマブ非併用時 1.43%，イダルシズマブ併用時 1.56%）が尿中に総ダビガトランとして回収された。このことは，サルにおけるダビガトランエテキシラートの経口バイオアベイラビリティが低い（約 5%）ことと一致している（3.3.4 項）。また，サル尿中総ダビガトラン排泄率に及ぼすイダルシズマブの影響を示唆するような一貫した傾向は認められなかった。

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

7. 薬物動態学的薬物相互作用

動物種を用いたイダルシズマブの薬物動態学的薬物相互作用試験は，ダビガトラン及びダビガトランエテキシラート以外は実施しなかった。イダルシズマブは異物（ダビガトラン）を標的とする抗体フラグメントであり，サイトカイン又はサイトカインモジュレーターではないことから，イダルシズマブの薬物動態学的薬物相互作用試験の実施は，薬物相互作用試験に関する FDA ドラフトガイダンス（薬物－治療用タンパク質の相互作用の項）に準拠した。イダルシズマブとダビガトランの間の薬物動態学的相互作用について，以下で概説する。

ラット及びサルにおいて，イダルシズマブの血漿中濃度－時間推移，薬物動態パラメータ及び尿中排泄率はダビガトラン静脈内投与又はダビガトランエテキシラート経口投与による影響を受けず（3 項及び 6 項），イダルシズマブ－ダビガトラン複合体及びイダルシズマブ－ダビガトラングルクロン酸抱合体複合体の分布及び排泄動態はイダルシズマブと同様であることが示された。

イダルシズマブは高い親和性かつ特異的にダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体に結合し，それらの抗凝固活性を中和することを意図してデザインされているため，ダビガトランの薬物動態及び薬力学に及ぼすイダルシズマブの影響が予想された。イダルシズマブは用量依存的に血漿中の非結合型ダビガトラン及び総ダビガトラン濃度を低下させる一方，非結合型ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の組織－血漿間の平衡状態が変化するため，（結合型及び非結合型両者を含む）ダビガトラン及び総ダビガトランの血漿中濃度を上昇させたと推測される（3 項）。この再分布現象は，抗ジゴキシン Fab 投与直後に組織から血漿へのジゴキシンの再分布が生じるなど，他の抗原についても報告されている［CTD 4.3-08_R12-4112］。ダビガトラン及びイダルシズマブを投与したすべての動物種において，同様の結果が認められている［CTD 2.6.2］。サル，ブタ及びヒトにおけるイダルシズマブと総ダビガトランの間の薬物動態学的相互作用メカニズムは semi-mechanistic モデルを用いてシミュレートした（3.4 項）。

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

8. その他の薬物動態試験

中等度腎機能障害モデルである 5/6 腎摘出ラットを用いて，イダルシズマブの薬物動態及び尿中排泄，並びにイダルシズマブ併用及び非併用時のダビガトランの PK/PD に及ぼす腎機能障害の影響について検討した。

8.1 ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの薬物動態及び尿中排泄に及ぼす腎機能障害の影響

5/6 腎摘出ラット（Crl:WI(Han)）を用いて，イダルシズマブ及びダビガトランの薬物動態及び尿中排泄に及ぼす腎機能障害の影響について検討した［CTD 4.2.2.7-01_U13-3340］。血清中のクレアチニン及び尿素濃度より, 5/6 腎摘出ラットの腎機能は偽処置ラットに比べて約 50%低下していた。

試験デザインを表 8.1: 1 に示す。本試験では合計 10 群のラット（雄 4 例／群）を使用し，このうち 5 群を偽処置ラット，5 群を 5/6 腎摘出ラットとした。ラットに 0.2 mg/kg のダビガトラン，20 mg/kg のイダルシズマブ又は 10 mg/kg のインドキシル硫酸を静脈内投与した。なお，インドキシル硫酸は腎臓を介して排泄される陽性対照であり，腎臓を介して排泄される化合物の薬物動態に及ぼす腎機能障害の影響を評価するのに本腎摘出ラットモデルが適切であるかどうかを検討するために使用した。6 群のラットから経時的に血漿試料を採取し，ダビガトラン，イダルシズマブ及びインドキシル硫酸の薬物動態について，偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラットの間で比較した。さらに，4 群のラットから投与後 48 時間までの尿試料を採取し，ダビガトラン及びイダルシズマブの尿中排泄について，偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラットの間で比較した。

表 8.1: 1 ラットを用いたイダルシズマブ及びダビガトランの薬物動態及び尿中排泄に及ぼす腎機能障害の影響の試験デザイン（各群 4 例）

Test article, dose	Group	Study	No. & sex	Rats	Samples
Dabigatran, 0.2 mg/kg	1	PK	4 M	sham-operated	Plasma
	2	Urine	4 M		Urine
	3	PK	4 M	5/6 nephrectomized	Plasma
	4	Urine	4 M		Urine
Idarucizumab, 20 mg/kg	5	PK	4 M	sham-operated	Plasma
	6	Urine	4 M		Urine
	7	PK	4 M	5/6 nephrectomized	Plasma
	8	Urine	4 M		Urine
Indoxyl sulphate [a], 10 mg/kg	9	PK	4 M	sham-operated	Plasma
	10	PK	4 M	5/6 nephrectomized	Plasma

[a] 腎臓を介して排泄される陽性対照。

陽性対照であるインドキシル硫酸の腎クリアランスは，偽処置ラットに比べて 5/6 腎摘出ラットの方が 37%低く，腎機能の低下が認められたことから，腎排泄型薬物の薬物動態に及ぼす腎機能障害の影響を検討する動物モデルとして，5/6 腎摘出ラットは適切であると考えられた。

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

偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの血漿中濃度－時間推移（平均値±SD）を図 8.1: 1 に示す。

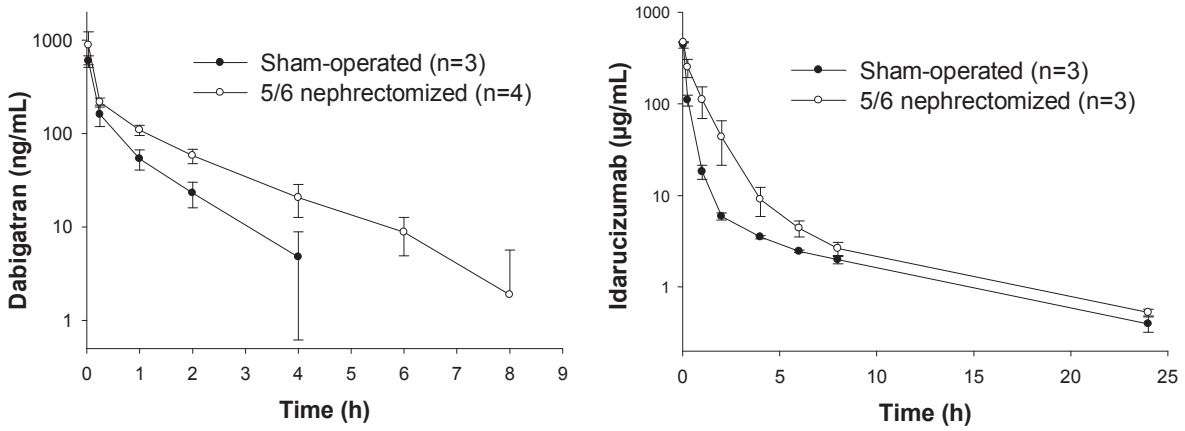


図 8.1: 1　偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラットに静脈内投与したときのダビガトラン（左）及びイダルシズマブ（右）の血漿中濃度－時間推移

偽処置ラットと 5/6 腎摘出ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの薬物動態パラメータを表 8.1: 2 に示す。

表 8.1: 2　偽処置及び 5/6 腎摘出ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの薬物動態パラメータ

PK Parameter	Dabigatran		Idarucizumab	
	Sham-operated (Mean ± SD, n=3) [a]	5/6 nephrectomized (Mean ± SD, n=4)	Sham-operated (Mean± SD, n=3) [a]	5/6 nephrectomized (Mean ± SD, n=3) [a]
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	539 ± 120	1020 ± 145	3700 ± 209	8580 ± 1890
CL (mL/min/kg)	13.6 ± 3.27	7.04 ± 1.09	1.89 ± 0.109	0.838 ± 0.168
V_{ss} (L/kg)	0.590 ± 0.107	0.591 ± 0.192	0.287 ± 0.0153	0.103 ± 0.0225
Terminal $t_{1/2}$ (h)	0.851 ± 0.225	1.40 ± 0.256	6.58 ± 0.514	6.29 ± 0.351

[a] 投与量の一部が静脈外に投与されたため，ラット 1 例を平均値から除外した。

偽処置ラットと比べて，5/6 腎摘出ラットにおける血漿中のダビガトラン及びイダルシズマブの CL はそれぞれ 48%及び 56%低下したことから，ダビガトラン及びイダルシズマブのいずれも，その消失に腎臓が重要な役割を果たしていることが示された。偽処置ラットと比べて 5/6 腎摘出ラットでは，血漿中ダビガトランの終末相半減期が長くなったことから，終末相が消失の律速段階であることが示唆された。一方，血漿中イダルシズマブの初期相半減期は 5/6 腎摘出ラットで長く，終末相半減期は同程度であったことから，初期相が消失の律速段階であることが示唆された。

ダビガトランの尿中排泄率は，偽処置ラットの 45.1%から 5/6 腎摘出ラットでは 32.1%に低下し，これは 5/6 腎摘出ラットにおける腎機能低下及びダビガトランの腎クリアランス低下を示す結果であった。

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

イダルシズマブ自身の尿中排泄は主要な消失経路ではなく，偽処置ラットでは 15.8 ± 3.21%，5/6 腎摘出ラットでは 12.6 ± 3.54%であった。5/6 腎摘出ラットでイダルシズマブのクリアランスが 56%低下したことは，尿細管上皮でのイダルシズマブの再取込み及び異化作用，並びに尿中への未変化体の直接排泄を含むすべての腎クリアランスの律速段階である糸球体濾過速度が低下したことを示してと考えられた。腎機能障害ラットにおいて糸球体濾過速度が低下した結果，腎クリアランスの両部分（異化作用及び尿中排泄）が低下したが，両部分の相対的寄与率に変化はなく，主に腎臓での異化作用がイダルシズマブのクリアランスに寄与していたと推察される。このことは，低分子量タンパク質の腎臓からの消失に関する文献報告と一致している［CTD 4.3-09_R13-0058］。すなわち，分子量が 60 kDa 未満のタンパク質の消失において，腎臓は排泄経路としてではなく，むしろタンパク質の主な異化作用部位として働いていると報告されている。

8.2 ラットにおけるダビガトラン及びイダルシズマブの PK/PD に及ぼす腎機能障害の影響

イダルシズマブ及びダビガトランの PK/PD に及ぼす腎機能障害の影響について，5/6 腎摘出ラットモデルを用いて検討した［CTD 4.2.2.7-02_U13-3577］。試験デザインを表 8.2: 1 に示す。イダルシズマブ及びダビガトランは，ラット（Crl:WI(Han)）の外側尾静脈から静脈内投与した。偽処置ラット，5/6 腎摘出ラット及び無処置ラット（コンポジットサンプリング）にダビガトランを 0.4 mg/kg で投与した。偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラットにはダビガトラン投与 5 分後にイダルシズマブを 0，20 又は 40 mg/kg 投与する 3 アーム（8 例/群）を設けた。さらに，無処置ラットにはダビガトラン投与 5 分後にイダルシズマブを 40 mg/kg 投与した。その後，ダビガトラン及びイダルシズマブの血漿中濃度及び抗凝固活性を測定した。

表 8.2: 1 イダルシズマブ及びダビガトランの PK/PD に及ぼす腎機能障害の影響の試験デザイン（各群 8 例）

Group	Rats	Dose (mg/kg)	
		Dabigatran	Idarucizumab [a]
1	sham-operated	0.4	none
2	5/6 nephrectomized	0.4	none
3	sham-operated	0.4	20
4	5/6 nephrectomized	0.4	20
5	sham-operated	0.4	40
6	5/6 nephrectomized	0.4	40
7	Normal	0.4	40

[a] ダビガトラン投与 5 分後にイダルシズマブを投与した。

ダビガトラン及びイダルシズマブを単独投与した試験の結果（8.1 項）と同様に，5/6 腎摘出群におけるダビガトラン及びイダルシズマブの血漿中濃度は，偽処置群又は無処置群と比べていずれも高かった。ダビガトラン投与 2 分後（イダルシズマブ投与前）の全例及びイダルシズマブ非

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

併用群のダビガトラン投与 7 及び 30 分後において，ダビガトランの抗凝固活性が認められた。無処置群，偽処置群及び 5/6 腎摘出群にイダルシズマブを 20 又は 40 mg/kg 投与したとき，ダビガトランの抗凝固活性が完全に中和された（図 8.2: 1）。

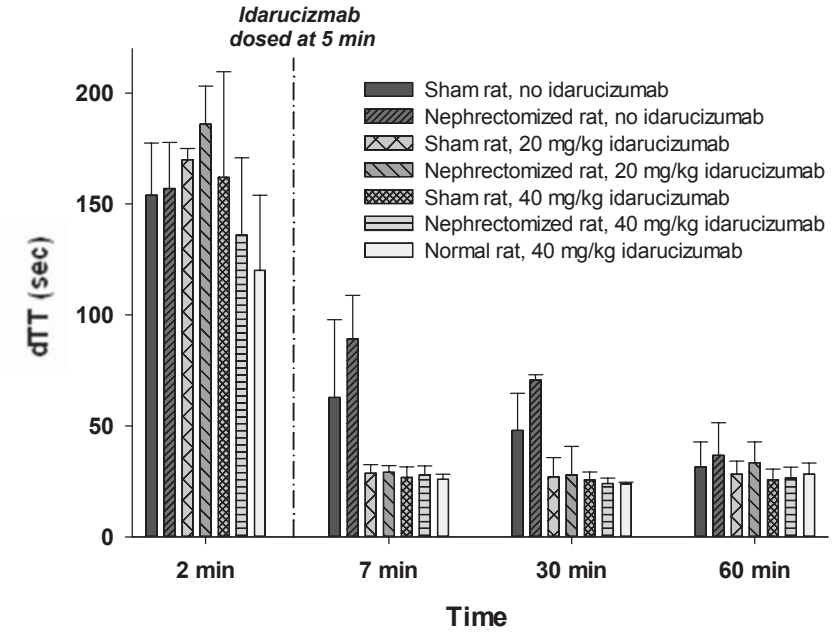


図 8.2: 1 無処置ラット，偽処置ラット及び 5/6 腎摘出ラットにおけるイダルシズマブ投与時及び非投与時のダビガトランの抗凝固作用（dTT により評価；ダビガトラン投与 5 分後にイダルシズマブ投与）

これらの結果は，これらのラットにイダルシズマブを投与した後の血漿中イダルシズマブ濃度（モル単位）がダビガトラン濃度と同程度又はこれを上回っていたという事実と一致する。無処置ラット又は偽処置ラットと比べて，腎機能障害ラットではダビガトラン濃度が上昇したが，これに匹敵するイダルシズマブ濃度の上昇が認められたことから，無処置群，偽処置群及び 5/6 腎摘出群のいずれにおいても，イダルシズマブ投与によってダビガトランの抗凝固活性は完全に中和された。

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

9. 考察及び結論

ラット及びサルにおいて，イダルシズマブは短い初期半減期及び中等度の終末相半減期を有する二相性の血漿中濃度－時間推移を示した。イダルシズマブの曝露量は用量にほぼ比例して増加し，全身クリアランス（CL）は全用量及び全投与期を通して大きな違いはなかった。イダルシズマブの定常状態における分布容積（V_{ss}）は小さく，血漿容積をわずかに上回る程度であったことから，血管外コンパートメントへの分布は限られていることが示された。

ラット及びサルにおけるイダルシズマブの平均滞留時間（MRT）は短く，それぞれ約 0.6 時間及び 1.1～1.4 時間であった。これは，静脈内投与したイダルシズマブが主に血漿中濃度－時間推移の初期相で速やかに消失したことと一致していた。投与したイダルシズマブの約 10～20%が尿中に直接排泄され，残り（80～90%）は異化作用によって消失すると推定された。

一般に分子量が 60 kDa 未満のタンパク質の場合，腎臓での異化作用を介した腎排泄が CL に大きく寄与すると報告されている［CTD 4.3-09_R13-0058］。イダルシズマブは分子量 47.8 kDa の Fab であり，主に腎臓を介して消失すると考えられる。対照ラットと比べて 5/6 腎摘出ラットでイダルシズマブの CL が 56%低下した結果からも，イダルシズマブの腎臓を介した消失が裏付けられた。同様の報告として，末期腎不全患者において抗ジゴキシン Fab の CL が約 75%低下したことから［CTD 4.3-08_R12-4112］，抗ジゴキシン Fab の CL に対して腎臓を介した消失が大きな役割を担っていることが示されている。5/6 腎摘出ラットでイダルシズマブの CL が大きく低下したことは，尿細管上皮でのイダルシズマブの再取込み及び異化作用，並びに尿中への未変化体の直接排泄を含むすべての腎クリアランスの律速段階である糸球体濾過速度が低下したことを示すと考えられた。腎機能障害ラットにおいて糸球体濾過速度が低下した結果，腎クリアランスの両部分（腎臓での異化作用及び尿中排泄）が低下したが，イダルシズマブの消失における両部分の相対的寄与率に変化はなく，主に腎臓での異化作用がイダルシズマブの CL に寄与していたと考えられる。

薬物動態学的相互作用に関して，ラット及びサルにおけるイダルシズマブの血漿中濃度－時間推移，薬物動態パラメータ及び尿中排泄率は，ダビガトラン投与の影響を受けなかったことから，イダルシズマブ－ダビガトラン（そのグルクロン酸抱合体を含む）複合体の分布及び排泄動態はイダルシズマブと同様であることが示された。一方，イダルシズマブは活性を有する非結合型ダビガトランの血漿中濃度を用量依存的に低下させるが，イダルシズマブ非結合型ダビガトラン濃度が低下することで，組織から血漿へのダビガトランの再分布が起こる結果，ダビガトラン及び総ダビガトランの血漿中濃度を上昇させた。このような再分布現象は，抗ジゴキシン Fab の投与直後に組織から血漿へのジゴキシンの再分布が生じるなど，他の抗原についても報告されている［CTD 4.3-08_R12-4112］。これらの結果から，ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の分布及び排泄動態は，一度イダルシズマブに結合した後はイダルシズマブ－ダビガトラン複合体及びイダルシズマブ－ダビガトラングルクロン酸抱合体複合体の形で，イダルシズマブによって制御されることが示された。しかし，イダルシズマブはラット及びサルにおけるダビガトラン及び総ダビガトランの尿中排泄率を変化させなかったことから，イダルシズマブに結合したダビガトランも速やかに排泄されることが示唆された。

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

サルの PK/PD データを用いて，イダルシズマブと総ダビガトランの間の相互作用を表す semi-mechanistic モデルを開発し，バリデーションを行った。このモデルは，イダルシズマブと総ダビガトランーイダルシズマブ複合体の分布及び排泄動態が同じである仮定，すなわち，イダルシズマブに結合したダビガトラン（そのグルクロン酸抱合体を含む）の薬物動態はイダルシズマブの薬物動態と同じであるという仮定に基づいて設計した。本モデルを用いて，ヒト初回投与試験における PK/PD を予測し，イダルシズマブの有効量を推定することができた。また，本モデルにより，外傷を有する麻酔下のブタ血漿中における活性を有する非結合型ダビガトラン濃度がイダルシズマブの用量依存的に減少すること及び血漿中総ダビガトラン濃度が上昇することを再現することができた。これらの結果から，本モデルのデザイン及び仮定は，動物及びヒトにおけるイダルシズマブと総ダビガトランの間の相互作用を適切に反映していることが示された。

要約すると，イダルシズマブの曝露量は用量に比例して増加した。イダルシズマブは抗凝固活性を有するダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体に速やかに結合することで，これらの抗凝固活性を用量依存的に中和した。血漿中イダルシズマブは速やかに消失し，投与量の約 10～20%が尿中に排泄され，残りは主に腎臓の異化作用によって消失すると推定された。イダルシズマブの分布及び排泄動態はダビガトランの存在に影響されなかったが，ダビガトラン及びそのグルクロン酸抱合体の分布及び排泄動態は一度イダルシズマブに結合するとイダルシズマブによって制御された。

Boehringer Ingelheim

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：	2.6.5 薬物動態試験概要表
文書作成日：	25 November 2015

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

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

目　次

目　次 2
1.　薬物動態試験の概要 3
2.　分析方法及びバリデーション試験 7
3A.　薬物動態試験：単回投与後の吸収 8
3B.　薬物動態試験：単回投与後の吸収 10
3C.　薬物動態試験：単回投与後の吸収 16
4.　薬物動態試験：反復投与後の吸収 28
5.　薬物動態試験：臓器分布 29
6.　薬物動態試験：血漿タンパク結合 30
7.　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 31
8.　薬物動態試験：その他の分布試験 32
9.　薬物動態試験：*In Vivo* での代謝 33
10.　薬物動態試験：*In Vitro* での代謝 34
11.　薬物動態試験：推定代謝経路 35
12.　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 36
13A.　薬物動態試験：排泄 37
13B.　薬物動態試験：排泄 39
13C.　薬物動態試験：排泄 42
14.　薬物動態試験：胆汁中への排泄 46
15.　薬物動態試験：薬物相互作用試験 47
16A.　薬物動態試験：その他 48
16B.　薬物動態試験：その他 52

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬物動態試験の概要

Test Article: Idarucizumab

Type of study	Study category	GLP compliance	Test system	Method of administration	Testing facility	CTD number / Document number
Analytical methods and validation reports	Evaluation of potential dabigatran interference in ELISA assays used to quantify idarucizumab	No	rat plasma and urine, monkey plasma and urine	N/A	BI	CTD 4.2.2.1-01_ n00236666
	Method validation (quantification of idarucizumab using ELISA)	No	rat plasma	N/A	BI	CTD 4.2.2.1-02_ U12-3608
	Method validation (quantification of idarucizumab using ELISA)	No	monkey plasma	N/A	BI	CTD 4.2.2.1-03_ U12-3423
	Method validation (quantification of dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	rat plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-04_ U12-1251
	Method validation (quantification of dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	monkey plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-05_ U12-1327
	Method validation (quantification of dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	rat urine	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-08_ U12-1501
	Method validation (quantification of dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	monkey urine	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-09_ U12-1500
	Method validation (quantification of sum dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	monkey plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-06_ U12-1328
	Method validation (quantification of sum dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	monkey urine	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-10_ U12-1587
	Method validation (quantification of sum dabigatran in presence of idarucizumab)	Yes	pig plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-07_ U13-1328

Abbreviations: BI=Boehringer Ingelheim; ELISA=enzyme-linked immunosorbent assay; N/A=not applicable, sum dabigatran= the sum of dabigatran and its glucuronide metabolites.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬物動態試験の概要（続き）

Test Article: Idarucizumab

Type of study	Study category	GLP compliance	Test system	Method of administration	Testing facility	CTD number / Document number
Analytical methods and validation reports	Method validation (ECL method for anti-idarucizumab antibodies)	No	rat plasma	N/A	BI	CTD 4.2.2.1-11_ U13-3028
	Method validation (ECL method for anti-idarucizumab antibodies)	No	monkey plasma	N/A	BI	CTD 4.2.2.1-12_ U13-3029
	Method validation (ECL method for anti-idarucizumab antibodies)	No	monkey plasma	N/A	BI	CTD 4.2.2.1-14_ n00231001
	Evaluation of potential assay interference for anti-idarucizumab antibodies	No	monkey plasma	PO: dabigatran etexilate	BI	CTD 4.2.2.1-13_ U13-3027
	Evaluation of assay interference for anti-idarucizumab antibodies	No	monkey plasma	PO: dabigatran etexilate	BI	CTD 4.2.2.1-15_ n00234019
	Method validation (RIPA method for anti-dabigatran antibodies)	No	monkey plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-16_ n00237363
	Method validation (modified TT for neutralizing anti-dabigatran antibodies)	Yes	monkey plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-17_ n00233140
	Method validation (coagulation: dTT, aPTT, ECT)	No	rat plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-19_ U13-1409
	Method validation (coagulation: dTT, aPTT, TT, ECT)	No	monkey plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-18_ U12-1035
	Method validation (prothrombosis: F1+2)	Yes	monkey plasma	N/A	[redacted]	CTD 4.2.2.1-20_ n00237010

Abbreviations: aPTT= activated partial thromboplastin time; BI=Boehringer Ingelheim; dTT= diluted thrombin time; ECL= electrochemiluminescence; ECT= ecarin clotting time; F1+2=prothrombin fragment 1+2; N/A=not applicable; PO= per os (oral administration); RIPA= radio-immunoprecipitation assay; TT= thrombin time.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬物動態試験の概要（続き）

Test Article: Idarucizumab

Type of study	Study category	GLP compliance	Test system	Method of administration	Testing facility	CTD number / Document number
Absorption, PK/PD	PK and urinary excretion of idarucizumab and dabigatran, administered separately or together	No	Rat, Crl:WI(Han)	IV	BI	CTD 4.2.2.2-01_ U12-3083
	Exploratory PK/PD and urinary excretion with and without pretreatment of dabigatran etexilate	No	Monkey, rhesus	PO: dabigatran etexilate IV: idarucizumab	[redacted] UK	CTD 4.2.3.2-01_ U12-3326
	Idarucizumab PK/PD and urinary excretion with pretreatment of dabigatran etexilate	No	Monkey, rhesus	PO: dabigatran etexilate IV: idarucizumab	[redacted] UK	CTD 4.2.2.2-04_ U12-3849 CTD 4.2.2.2-05_ U13-3539
	Modelling of idarucizumab and dabigatran interaction	No	Data from studies in monkeys, pigs, and humans (Phase Ia)	PO: dabigatran etexilate IV: idarucizumab	BI	CTD 4.2.2.2-06_ n00234295
	Prediction of idarucizumab PK in humans	No	Data from a monkey study	IV: idarucizumab	BI	CTD 4.2.2.2-07_ U12-3374
Distribution	Not applicable					
Metabolism	Not applicable					
Excretion	Results of excretion studies are presented in reports CTD 4.2.2.2-01_U12-3083, CTD 4.2.2.3-01_U12-3326, CTD 4.2.2.2-04_U12-3849, and CTD 4.2.2.2-05_U13-3539, which are listed under Absorption, because urinary excretion was investigated together with these Absorption/PK studies.					
Pharmacokinetic drug interactions	Results of PK drug interaction studies are presented in reports CTD 4.2.2.2-01_U12-3083, CTD 4.2.2.3-01_U12-3326, CTD 4.2.2.2-04_U12-3849, CTD 4.2.2.2-05_U13-3539 and CTD 4.2.2.2-06_n00234295, which are listed under Absorption, because interactions between idarucizumab and dabigatran were investigated together with these Absorption/PK studies.					

Abbreviations: BI=Boehringer Ingelheim; PO= per os (oral administration); IV=intravenous; PK=pharmacokinetics; PD=pharmacodynamics.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1. 薬物動態試験の概要（続き）

Test Article: Idarucizumab

Type of study	Study category	GLP compliance	Test system	Method of administration	Testing facility	CTD number / Document number
Other pharmacokinetic studies	Effect of renal impairment on PK and urinary excretion of idarucizumab and dabigatran	No	Rat, Crl:WI(Han): sham-operated and 5/6 nephrectomized	IV	BI	CTD 4.2.2.7-01_ U13-3340
	Effect of renal impairment on PK/PD of idarucizumab and dabigatran	No	Rat, Crl:WI(Han): normal, sham-operated, and 5/6 nephrectomized	IV	BI	CTD 4.2.2.7-02_ U13-3577

Abbreviations: BI=Boehringer Ingelheim; IV=intravenous; PK=pharmacokinetics; PD=pharmacodynamics, 5/6 nephrectomized= animals with 5/6 kidneys removed.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 分析方法及びバリデーション試験

Bioanalytical assay methods and validation results are described in the Pharmacokinetic Written Summary [CTD 2.6.4_section 2].

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3A. 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Articles: Idarucizumab & dabigatran

Pharmacokinetics of idarucizumab and interaction with dabigatran in rats

CTD number: CTD 4.2.2.2-01

Study number.: dm-11-1095

Document number: U12-3083

Species	Rat
Strain	Crl:WI(Han)
Gender (M/F) / Number of animals	M / 12 (only rats used for PK study are listed *)
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Idarucizumab: 50 mM sodium acetate and 200 mM sorbitol solution, pH 5.5 Dabigatran: 16% DMSO, 12% 0.1 M HCl and 72% saline solution
Method of Administration	IV
Doses	20 mg/kg of idarucizumab, 0.2 mg/kg of dabigatran, 0.2 mg/kg dabigatran followed with 20 mg/kg of idarucizumab (15 min later)
Sample	Plasma and urine*
Analytes	Idarucizumab and dabigatran
Assays	ELISA (idarucizumab) and LC-MS/MS (dabigatran)

* Urine samples were collected from separate groups of rats with the same dosage regimens, and the results are presented in the Section 13.

Study design

Group [a]	End point	Number of rats	Test article	Dose (IV)	Samples	Analyte
1	PK	3 [b]	Idarucizumab	20 mg/kg	Plasma	Idarucizumab
5	PK	3 [b]	Dabigatran	0.2 mg/kg	Plasma	Dabigatran
6	PK	6 [c]	Dabigatran + idarucizumab	0.2 mg/kg + 20 mg/kg	Plasma	Idarucizumab, Dabigatran

[a] Groups 2 to 4 were used to study urinary excretion following the same dosage regimens, and the results are presented in the Section 13.

[b] Serial sampling for groups with only one analyte (dosed one test article only)

[c] Composite sampling with 5 or 6 plasma samples from each rat was designed due to blood volume limitation for analysis of both analytes (idarucizumab and dabigatran).

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3A. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U12-3083

PK parameters of idarucizumab and dabigatran in male rats when administered separately or together

PK Parameter	Idarucizumab		Dabigatran	
	Alone [a] (Mean ± SD, n=3)	With dabigatran [b] (Composite, n=6)	Alone [a] (Mean ± SD, n=3)	With idarucizumab [b] (Composite, n=6)
Dose (mg/kg)	20	20	0.2	0.2
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	3730 ± 875	2990	787 ± 128	1620
$AUC_{0-\infty}$ (ng•h/mL)	178000 ± 41800	143000	371 ± 60.4	765
CL (mL/min/kg)	1.95 ± 0.494	2.33	9.16 ± 1.59	4.36
V_{ss} (L/kg)	0.0688 ± 0.0291	0.0771	0.561 ± 0.0780	0.180
$t_{1/2}$ (h) [c]	6.68 ± 0.493	6.34	1.40 ± 0.447	1.36
MRT (h)	0.570 ± 0.0943	0.550	1.03 ± 0.191	0.688
$t_{1/2,\alpha}$ (h) [d]	0.241 ± 0.0202	0.198	Not determined	Not determined
$t_{1/2,\beta}$ (h) [d]	5.81 ± 0.481	5.15	Not determined	Not determined

[a] Serial sampling for groups with only one analyte (dosed one test article only)

[b] No SD because parameters were calculated based on composite mean concentration data (n=3 per time point). Composite sampling was designed due to blood volume limitation for analysis of both analytes (idarucizumab and dabigatran).

[c] Terminal phase half-live determined by non-compartmental analysis.

[d] Initial (α) and terminal (β) phase half-lives were also determined by compartmental analysis to characterize bi-phasic profile of idarucizumab.

Additional Information:

- Plasma concentration-time profiles of idarucizumab in rats were bi-phasic with a rapid initial decline phase, followed by a relatively slow terminal phase.
- There were no marked differences in idarucizumab concentration-time profiles or PK parameters between rats with and without dabigatran pre-treatment.
- There was a rapid and substantial increase in the plasma concentration of dabigatran immediately after idarucizumab dosing, indicating a redistribution of dabigatran from tissue to plasma due to rapid binding of idarucizumab to dabigatran in plasma. Terminal phase plasma concentrations of dabigatran were similar between rats with and without idarucizumab treatment.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3B. 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Articles: Idarucizumab & dabigatran etexilate

Three-phase exploratory PK/PD study of idarucizumab in monkeys with and without dabigatran etexilate pretreatment

CTD number: CTD 4.2.3.2-01

Study number: 11R090

Document number: U12-3326

Note: it was a combined study of exploratory PK/PD and dose range finding. See toxicology section for results of dose range finding for this study.

Species	Monkey
Strain	Rhesus
Gender (M/F) / Number of animals	1 male and 1 female assigned to each of three groups
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Dabigatran etexilate: 0.5% hydroxylethylcellulose Idarucizumab: 50 mM sodium acetate and 200 mM sorbitol at a pH of 5.5
Method of Administration	PO (dabigatran etexilate) and 10-min IV infusion (idarucizumab)
Doses	Group 1: vehicles only Group 2: IV dose of idarucizumab at 30, 90 and 175 mg/kg on Days 4, 18 and 32, respectively. Group 3: PO dose of dabigatran etexilate at 12 mg/kg/day once daily for four days followed by an IV dose of idarucizumab at 30, 90 and 175 mg/kg at 1.5 h after the 4th dabigatran etexilate dose on Days 4, 18 and 32, respectively.
Sample	K_3-EDTA plasma samples (idarucizumab, dabigatran, sum dabigatran and anti-idarucizumab antibodies) Citrated plasma samples (coagulation analysis) Urine *
Analytes	Idarucizumab, dabigatran, sum dabigatran**, anticoagulant activity, anti-idarucizumab antibodies
Assays	ELISA (idarucizumab), LC-MS/MS (dabigatran and sum dabigatran), diluted thrombin time (dTT) (anticoagulant activity) and ECL (anti-idarucizumab antibodies)

* Urine samples were collected from the same monkeys, and results are presented in the Section 13.

** Sum dabigatran: the sum of dabigatran and its glucuronide metabolites, which was determined after complete hydrolysis of glucuronides.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3B. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U12-3326

Study design

Group	Dabigatran etexilate, PO		Idarucizumab, IV		No. of monkeys	
	Day	Dose [a] (mg/kg/day)	Day	Dose [b] (mg/kg)	Male	Female
1	1-4 15-18 29-32	0 (vehicle) 0 (vehicle) 0 (vehicle)	4 18 32	0 (vehicle) 0 (vehicle) 0 (vehicle)	1	1
2	1-4 15-18 29-32	0 (vehicle) 0 (vehicle) 0 (vehicle)	4 18 32	30 90 175	1	1
3	1-4 15-18 29-32	12 12 12	4 18 32	30 90 175	1	1

[a] The dabigatran etexilate PO dose (or PO vehicle) was administered once daily on Days 1-4, 15-18 and 29-32.

[b] The idarucizumab IV dose (or IV vehicle) was administered on Days 4, 18 and 32 at 1.5 h after PO dosing of dabigatran etexilate.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3B. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U12-3326

Mean (n=2) idarucizumab C_{max} and $AUC_{0-\infty}$ in Rhesus monkeys with and without pretreatment with dabigatran etexilate

Idarucizumab exposure	Presence of dabigatran	30 mg/kg	90 mg/kg	175 mg/kg
C_{max} (nM)	No	15400	38950	76700
	Yes	11550	33200	70750
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	No	12200	35500	69900
	Yes	10010	32650	60500

PK parameters of idarucizumab administered alone or with dabigatran etexilate in monkeys

PK parameters	Idarucizumab alone (n=6) [a] (without dabigatran)		Idarucizumab (n=6) [a] (with dabigatran etexilate pretreatment)	
	Mean	SD	Mean	SD
CL (mL/min/kg)	0.873	0.0464	1.01	0.114
V_{ss} (L/kg)	0.0576	0.00692	0.0671	0.0110
MRT (h)	1.11	0.165	1.12	0.251
$t_{1/2,\alpha}$ (h) [b]	0.394	0.0399	0.420	0.0458
$t_{1/2,\beta}$ (h) [b]	4.26	0.439	4.92	0.632

[a] Results were combined from 1 male monkey and 1 female monkey at three dose levels of idarucizumab (30, 90 and 175 mg/kg) on three phases.

[b] Initial (α) and terminal (β) phase half-lives were determined by compartmental analysis to characterize bi-phasic profile of idarucizumab.

Additional Information:

- Plasma concentration-time profiles of idarucizumab in monkeys were bi-phasic with a rapid initial decline phase, followed by a relatively slower terminal phase.
- Idarucizumab exposure increased in a dose proportional manner, and PK parameters (such as CL and Vss) were similar across dose levels and between male and female monkeys.
- There were no marked differences in idarucizumab PK parameters and plasma concentration-time profiles between monkeys with and without dabigatran etexilate pre-treatment.
- By the end of study, anti-idarucizumab antibodies were detected in one out of two monkeys treated with idarucizumab only and in both monkeys treated with dabigatran etexilate and idarucizumab. Idarucizumab exposure did not appear to be impacted by the presence of anti-idarucizumab antibodies.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3B. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U12-3326

PK parameters of dabigatran and sum dabigatran in monkeys after PO dosing of dabigatran etexilate and IV dosing of idarucizumab

Analyte		**Dabigatran**			**Sum dabigatran**		
Drug Day		**4**	**18**	**32**	**4**	**18**	**32**
Idarucizumab dose (mg/kg)		**30**	**90**	**175**	**30**	**90**	**175**
C_{max} (nM)	**Male**	1080	1660	1250	2840	2860	2610
	Female	810	1340	1300	2570	4030	6150
AUC_{0-24} (nM•h)	**Male**	2250	4900	4620	9350	14600	11900
	Female	1990	4200	5390	7490	11100	15800
t_{max} (h)	**Male**	2	3	3	2	3	1.67
	Female	2	2	2	2	2	1.67

Additional Information:

- The sum dabigatran exposure was substantially higher than those of dabigatran, demonstrating that there was a substantial contribution of glucuronides to the sum dabigatran exposure in monkeys.
- Immediately after IV dosing of idarucizumab, there was a substantial increase in plasma concentrations of sum dabigatran, indicating a redistribution of dabigatran and its glucuronides from tissue to plasma due to rapid binding of idarucizumab to dabigatran and its glucuronides in plasma.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3B. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Document number: U12-3326

PD parameter: diluted thrombin time (seconds), after PO dosing of dabigatran etexilate and IV dosing of idarucizumab to monkeys

Group	Dabigatran dose (mg/kg)	Drug Day	Idarucizumab dose (mg/kg)	Sex	Monkey ID	Pre-treatment	Pre-dose	1.5h	1.67h	2h	3h	6h	9h	24h
1	0	4	0	Male	145	29.1	28.1	28.0	27.4	27.5	28.0	27.8	28.4	
				Female	146	28.1	23.4	26.4	26.4	25.0	29.2	25.2	27.7	
		18	0	Male	145		28.1	25.9	25.5			28.3	28.0	
				Female	146		28.5	24.3	28.4			25.6	28.8	
		32	0	Male	145		27.1	26.6	28.2			29.0	27.3	28.3
				Female	146		24.3	28.3	28.1			26.4	24.1	24.4
2	0	4	30	Male	147	29.1	29.2	26.0	27.0	25.9	24.5	24.3	30.2	
				Female	148	28.0	29.1	25.8	20.3	28.3	30.0	25.6	25.3	
		18	90	Male	147		26.7	26.9	24.8			24.0	25.8	
				Female	148		23.3	24.2	24.2			28.4	22.6	
		32	175	Male	147		22.8	25.7	29.8			25.7	26.9	30.3
				Female	148		21.6	23.7	24.0			25.6	27.2	25.5
3	12	4	30	Male	149	31.7	30.9	44.4	26.6	31.3	39.5	48.2	32.9	
				Female	150	31.0	28.6	34.7	22.0	22.0	36.6	33.9	33.0	
		18	90	Male	149		25.3	51.6	26.9			51.3	42.7	
				Female	150		28.5	68.5	22.9			29.3	29.4	
		32	175	Male	149		26.0	79.7	24.6			31.0	25.2	30.1
				Female	150		29.6	59.1	26.7			27.8	24.4	29.9

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3B. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U12-3326

PK/PD of idarucizumab in monkeys with and without dabigatran etexilate pretreatment

Additional Information:

- In monkeys without dabigatran treatment (Groups 1 and 2), the diluted thrombin time remained at the baseline at all time points.
- In monkeys receiving oral dabigatran and escalating doses of idarucizumab (Group 3), the diluted thrombin time increased at 90 min after oral dosing of 12 mg/kg of dabigatran etexilate (before idarucizumab dosing), and returned to baseline at 100 min, which was at the end of the 10-min infusion of idarucizumab, suggesting complete neutralization of anticoagulant effect of dabigatran immediately after idarucizumab dosing at all three dose levels. At 175 mg/kg dose, the neutralization effect of idarucizumab was maintained up to 24 h after dosing. At lower doses, there was a trend for reappearance of anticoagulant effect starting at 3 h after dosing for both monkeys at 30 mg/kg and for one monkey at 90 mg/kg.
- The nearly complete neutralization was observed when idarucizumab concentration was in excess or the concentration difference between sum dabigatran and idarucizumab was small (<100 nM). The reappearance of anticoagulant effect at a few time points at the low and the mid dose was directly correlated with notable excess sum dabigatran concentration as compared to idarucizumab concentration with a concentration difference generally $\geq$100 nM.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3C. 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Articles: Idarucizumab & dabigatran etexilate
CTD number: CTD 4.2.2.2-05 and CTD 4.2.2.2-04
Study number: dm-12-1103 and DDB0210
Document number: U13-3539 and U12-3849

PK/PD study of idarucizumab in monkeys pretreated with dabigatran etexilate

Species	Monkey
Strain	Rhesus
Gender (M/F) / Number of animals	M / 8 (n=4 per group)
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Dabigatran etexilate: 0.5% hydroxyethylcellulose Idarucizumab: 50 mM sodium acetate and 220 mM sorbitol and 0.02% polysorbate 20 at pH 5.5
Method of Administration	PO (dabigatran etexilate) and 10-min IV infusion (idarucizumab)
Doses	PO doses of dabigatran etexilate (12 mg/kg/day) once daily for four days at each of three phases (Days 1 to 4, 8 to 11 and 30 to 33), IV dose(s) of idarucizumab (30 mg/kg for Group 1 and 60 mg/kg for Group 2) once, twice and once after 4th day of dabigatran dosing on Days 4, 11 and 33, respectively.
Sample	K_3-EDTA plasma samples (idarucizumab, dabigatran, sum dabigatran and anti-idarucizumab antibodies) Citrated plasma samples (coagulation analysis) Urine *
Analytes	Idarucizumab, dabigatran, sum dabigatran**, anticoagulant activity, anti-idarucizumab antibodies
Assays	ELISA (idarucizumab), LC-MS/MS (dabigatran and sum dabigatran), dTT, aPTT, ECT (anticoagulant activity) and ECL (anti-idarucizumab antibodies)

* Urine samples were collected from the same groups, and results are presented in the Section 13.
** Sum dabigatran: the sum of dabigatran and its glucuronide metabolites, which was determined after complete hydrolysis of glucuronides.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3C. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U13-3539

Study design

Phase	Day	Group	Number/Sex	Dose route	Test substance	Dose level (mg/kg)
1	1 – 4	1	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	1 – 4	2	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	4	1	4 M	IV [a]	Idarucizumab	30
	4	2	4 M	IV [a]	Idarucizumab	60
2	8 – 11	1	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	8 – 11	2	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	11	1	4 M	IV [b]	Idarucizumab	30 + 30
	11	2	4 M	IV [b]	Idarucizumab	60 + 60
3	30 – 33	1	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	30 – 33	2	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	33	1	4 M	IV [c]	Idarucizumab	30
	33	2	4 M	IV [c]	Idarucizumab	60

[a] A 10-min IV infusion of idarucizumab at 2.33 h after receiving the 4th oral administration of dabigatran etexilate on Day 4.

[b] Two 10-min IV infusions of idarucizumab at 1.5 and 3 h after receiving the 4th oral administration of dabigatran etexilate on Day 11.

[c] A 10-min IV infusion of idarucizumab at 1.5 h after receiving the 4th oral administration of dabigatran etexilate on Day 33.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3C. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U13-3539

PK parameters of idarucizumab in monkeys (n=4/group) pretreated with dabigatran etexilate

PK parameter	Dose (mg/kg)	Descriptive statistics	Single dose at 2.33 h (Day 4)	Two doses at 1.5 and 3 h (Day 11)	Single dose at 1.5 h (Day 33) [a]	Overall mean and SD
C_{max} (nM)	30	Mean	10100	11300	10100	
		SD	746	520	395	
	60	Mean	15000	21200	19700	
		SD	2560	5390	705	
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	30	Mean	11400	27100	11600	Not applicable
		SD	820	3610	305	
	60	Mean	26100	54200	23700	
		SD	5320	13600	3360	
CL (mL/min/kg)	30	Mean	0.919	0.784	0.902	
		SD	0.0670	0.118	0.0241	
	60	Mean	1.09	0.822	0.895	0.902
		SD	0.231	0.266	0.112	0.177
V_{ss} (L/kg)	30	Mean	0.0739	0.0592	0.0719	
		SD	0.0167	0.0181	0.0103	
	60	Mean	0.107	0.0712	0.0740	0.0763
		SD	0.0323	0.0411	0.00866	0.0265
$t_{1/2}$ (h)	30	Mean	5.59	5.62	6.15	
		SD	0.717	0.457	0.890	
	60	Mean	5.29	5.32	6.01	5.64
		SD	0.348	0.552	0.252	0.585
MRT (h)	30	Mean	1.34	1.24	1.33	
		SD	0.286	0.186	0.187	
	60	Mean	1.61	1.37	1.38	1.38
		SD	0.195	0.298	0.0899	0.227

[a] n=3 for 30 mg/kg dose group on Day 33, due to early termination of one monkey.

Additional Information: Idarucizumab exposure increased in a dose proportional manner, and was similar between anti-idarucizumab antibody positive and negative monkeys on Day 33.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3C. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U13-3539

PK parameters of dabigatran in monkeys (n=4/group) receiving oral dabigatran etexilate with and without IV idarucizumab treatment

PK parameter	Idarucizumab dose (mg/kg)	Descriptive statistics	Day 3	Day 4	Day 11	Day 33 [a]
			No idarucizumab	Single idarucizumab dose at 2.33h	Two idarucizumab doses at 1.5 and 3 h	Single idarucizumab dose at 1.5 h
C_{max} (nM)	30	Mean	120	476	701	513
		SD	122	275	637	478
		%CV	102	57.8	90.9	93.2
	60	Mean	245	1320	1150	2500
		SD	294	709	1030	2490
		%CV	120	53.6	89.6	99.8
AUC_{0-24} (nM•h)	30	Mean	535	1740	2100	1710
		SD	478	777	1280	1410
		%CV	89.3	44.7	61.1	82.5
	60	Mean	1030	4650	4430	6200
		SD	1060	2260	4190	6410
		%CV	102	48.6	94.4	103
t_{max} (h)	30	Median	3.75	2.5	2.34	1.67
		Range	1.5-6	2.5-3	1.67-6	1.67-6
	60	Median	2.25	3	1.67	1.67
		Range	1.5-6	2.5-3	1.67-3	1.67-1.67

[a] n=3 for 30 mg/kg dose group on Day 33, due to early termination of one monkey.

Additional Information: The average dabigatran C_{max} and AUC_{0-24} values were higher (up to 10-fold) with idarucizumab treatment (on Days 4, 11 and 33) than without idarucizumab treatment (Day 3). These results are consistent with redistribution of dabigatran from tissue to plasma due to binding of idarucizumab to dabigatran in plasma.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3C. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U13-3539

PK parameters of sum dabigatran in monkeys (n=4/group) receiving oral dabigatran etexilate with and without IV idarucizumab treatment

PK parameter	Idarucizumab dose (mg/kg)	Descriptive statistics	Day 3	Day 4	Day 11	Day 33 [a]
			No idarucizumab	Single idarucizumab dose at 2.33h	Two idarucizumab doses at 1.5 and 3 h	Single idarucizumab dose at 1.5 h
C_{max} (nM)	30	Mean	672	2120	2570	1690
		SD	693	1360	2470	1640
		%CV	103	64.1	96.2	96.9
	60	Mean	934	4730	4010	6700
		SD	963	2540	2920	5390
		%CV	103	53.8	72.9	80.5
AUC_{0-24} (nM•h)	30	Mean	4220	6860	5810	4880
		SD	3540	3790	4150	4250
		%CV	83.9	55.2	71.4	87.1
	60	Mean	6510	15900	11400	17,000
		SD	6010	8000	9520	15600
		%CV	92.4	50.3	83.2	91.8
t_{max} (h)	30	Median	3.75	2.5	1.67	1.67
		Range	1.5-6	2.5-2.5	1.67-3	1.67-1.67
	60	Median	2.25	2.5	1.67	1.67
		Range	1.5-6	2.5-3	1.67-1.67	1.67-1.67

[a] n=3 for 30 mg/kg dose group on Day 33, due to early termination of one monkey.

Additional Information:
The average sum dabigatran C_{max} and AUC_{0-24} values were higher (up to 7-fold) with idarucizumab treatment (on Days 4, 11 and 33) than without idarucizumab treatment (Day 3). These results are consistent with redistribution of dabigatran and its glucuronides from tissue to plasma due to binding of idarucizumab to dabigatran and its glucuronides in plasma.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PD parameters in monkeys receiving oral dabigatran etexilate with and without IV idarucizumab treatment: diluted thrombin time (seconds)

Day	Idarucizumab treatment	Time (h)	Group 1 (n=4) (0 or 30 mg/kg idarucizumab)			Group 2 (n=4) (0 or 60 mg/kg idarucizumab)		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
Pre	**None**	**0.0**	32.4	0.556	1.72	33.0	0.551	1.67
3	**None**	**1.5**	65.5	36.1	55.1	79.7	47.7	59.8
		3	56.4	26.3	46.5	71.9	38.4	53.4
		6	44.3	8.43	19.0	53.1	17.0	32.0
		9	38.6	3.64	9.44	44.0	10.3	23.5
4	**Single dose at 2.33 h**	**0.0**	33.2	0.545	1.64	33.7	1.57	4.66
		1.5	59.0	20.7	35.1	97.0	27.3	28.2
		2.5	31.8	0.510	1.60	33.7	2.10	6.22
		3	31.6	0.562	1.78	32.4	0.532	1.64
		6	34.2	1.77	5.18	36.4	3.42	9.39
		9	35.7	2.47	6.92	37.8	3.40	9.00
		24	33.2	0.783	2.36	34.4	1.27	3.70

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PD parameters in monkeys receiving oral dabigatran etexilate with 1 or 2 doses of IV idarucizumab treatment: diluted thrombin time (seconds)

Day	Idarucizumab treatment	Time (h)	Group 1 (n=4 [a]) (30 mg/kg idarucizumab)			Group 2 (n=4) (60 mg/kg idarucizumab)		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
11	Two doses at 1.5 and 3 h	**0.0**	33.3	0.640	1.92	34.9	2.81	8.06
		1.5	59.4	26.8	45.1	87.4	49.8	57.0
		1.67	31.8	0.719	2.26	32.6	0.443	1.36
		3	32.5	1.62	4.99	32.1	0.727	2.27
		3.17	31.4	0.635	2.03	32.2	0.457	1.42
		6	32.4	1.19	3.67	32.4	0.330	1.02
		9	33.7	1.58	4.67	34.2	2.67	7.79
		24	32.1	0.74	2.31	35.3	2.80	7.93
33	Single dose at 1.5 h	**0.0**	32.9	0.781	2.37	33.9	0.424	1.25
		1.5	61.3	28.1	45.9	109	59.6	54.7
		1.67	32.0	0.208	0.650	31.7	1.19	3.76
		3	31.2	3.23	10.3	50.6	33.1	65.5
		6	32.2	3.35	10.4	48.4	20.2	41.8
		9	36.1	2.63	7.28	45.9	15.8	34.4
		24	33.0	0.321	0.975	35.1	2.08	5.93

[a] n=3 on Day 33, due to early termination of one monkey.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PD parameters in monkeys receiving oral dabigatran etexilate with and without IV idarucizumab treatment: activated partial thromboplastin time (seconds)

Day	Idarucizumab treatment	Time (h)	Group 1 (n=4) (0 or 30 mg/kg idarucizumab)			Group 2 (n=4) (0 or 60 mg/kg idarucizumab)		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
Pre	None	0.0	20.2	2.70	13.4	28.8	18.3	63.6
3	None	1.5	35.7	15.6	43.8	49.9	33.2	66.7
		3	33.6	12.4	36.9	46.9	26.6	56.8
		6	27.2	2.82	10.4	36.5	13.9	37.9
		9	25.8	4.09	15.9	30.0	8.38	27.9
4	Single dose at 2.33 h	0.0	19.9	1.85	9.32	20.4	3.62	17.7
		1.5	33.8	9.42	27.9	52.0	18.4	35.5
		2.5	19.6	2.04	10.4	19.4	2.81	14.5
		3	19.1	2.05	10.7	19.1	3.06	16.0
		6	24.0	4.40	18.3	23.8	4.91	20.7
		9	21.9	3.16	14.4	23.4	5.31	22.8
		24	19.7	1.62	8.21	22.1	4.82	21.8

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PD parameters in monkeys receiving oral dabigatran etexilate with 1 or 2 doses of IV idarucizumab treatment: activated partial thromboplastin time (seconds)

Day	Idarucizumab treatment	Time (h)	Group 1 (n=4 [a]) (30 mg/kg idarucizumab)			Group 2 (n=4) (60 mg/kg idarucizumab)		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
11	Two doses at 1.5 and 3 h	**0.0**	20.9	1.91	9.16	22.3	5.76	25.8
		1.5	34.3	11.9	34.6	50.2	27.3	54.4
		1.67	19.7	2.06	10.5	20.5	3.26	15.9
		3	19.9	3.11	15.6	20.4	2.90	14.3
		3.17	19.7	2.26	11.5	20.6	3.96	19.2
		6	18.7	1.71	9.13	19.8	2.74	13.8
		9	21.8	2.84	13.0	22.9	4.84	21.2
		24	20.0	2.37	11.8	23.3	5.74	24.7
33	Single dose at 1.5 h	**0.0**	23.1	2.10	9.09	23.3	1.72	7.40
		1.5	35.9	11.4	31.7	59.3	26.2	44.3
		1.67	20.9	3.58	17.1	21.1	0.263	1.24
		3	21.7	1.57	7.24	29.6	14.5	48.9
		6	25.4	4.71	18.6	31.4	10.3	32.9
		9	25.8	6.38	24.7	29.7	6.12	20.6
		24	21.3	1.90	8.95	23.5	1.68	7.17

[a] n=3 on Day 33, due to early termination of one monkey.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PD parameters in monkeys receiving oral dabigatran etexilate with and without IV idarucizumab treatment:

Ecarin clotting time (seconds)

Day	Idarucizumab treatment	Time (h)	Group 1 (n=4) (0 or 30 mg/kg idarucizumab)			Group 2 (n=4) (0 or 60 mg/kg idarucizumab)		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
Pre	None	0.0	48.1	1.18	2.44	46.5	0.991	2.13
3	None	1.5	114	69.6	61.0	138	92.9	67.3
		3	101	54.8	54.3	129	81.7	63.5
		6	77.6	19.6	25.2	92.8	31.7	34.2
		9	65.7	10.9	16.6	71.8	20.8	29.0
4	Single dose at 2.33 h	0.0	52.1	2.08	4.00	52.4	2.25	4.30
		1.5	114	46.9	41.0	185	45.9	24.8
		2.5	47.3	1.35	2.84	47.7	3.73	7.82
		3	48.9	1.64	3.35	47.7	2.19	4.61
		6	54.6	7.29	13.4	57.4	6.09	10.6
		9	57.9	7.36	12.7	62.3	6.52	10.5
		24	52.6	2.22	4.23	52.9	1.82	3.44

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PD parameters in rhesus monkeys receiving oral dabigatran etexilate with or 2 doses of IV idarucizumab treatment:

Ecarin clotting time (seconds)

Day	Idarucizumab treatment	Time (h)	Group 1 (n=4 [a]) (30 mg/kg idarucizumab)			Group 2 (n=4) (60 mg/kg idarucizumab)		
			Mean	SD	%CV	Mean	SD	%CV
11	Two doses at 1.5 and 3 h	**0.0**	54.4	3.92	7.21	55.5	6.75	12.2
		1.5	120	65.0	54.2	155	85.2	54.9
		1.67	50.9	2.93	5.75	47.1	0.577	1.23
		3	56.6	7.22	12.7	47.0	2.615	5.56
		3.17	49.4	2.36	4.79	48.2	3.76	7.80
		6	49.4	3.16	6.39	48.7	3.68	7.56
		9	50.8	2.62	5.16	52.4	7.74	14.8
		24	53.4	4.78	8.95	53.3	3.34	6.27
33	Single dose at 1.5 h	**0.0**	52.2	1.96	3.75	50.3	5.45	10.8
		1.5	98.4	45.5	46.2	173	110	63.9
		1.67	48.6	2.23	4.59	45.5	1.07	2.35
		3	52.0	5.4	10.3	79.6	61.3	77.0
		6	59.9	9.36	15.6	80.3	42.1	52.4
		9	59.7	7.55	12.6	77.1	31.9	41.3
		24	50.2	0.850	1.69	51.6	5.89	11.4

[a] n=3 on Day 33, due to early termination of one monkey.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3C. 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） **Document number:** U13-3539

Additional Information: PD effect

The variability of dabigatran and sum dabigatran exposure in monkeys was high (%CV ranged from 45% to 120%). For monkeys with relatively low exposure of sum dabigatran, complete reversal of the anticoagulant activity of dabigatran and its glucuronides over the whole study period was achieved with either one or two doses of idarucizumab (30 or 60 mg/kg), and corresponding plasma concentrations of idarucizumab were similar to or higher than those of sum dabigatran.

For monkeys with higher exposure of sum dabigatran, partial recurrence of the anticoagulant activity at 3 to 9 h post dabigatran dose was observed with a single dose of idarucizumab, but complete reversal of the anticoagulant activity over the whole study period was demonstrated with two doses of idarucizumab administered 1.5 h apart. During the period of recurrence of anticoagulant activity, plasma concentrations of idarucizumab were lower than those of sum dabigatran, while at timepoints during complete reversal, concentrations of idarucizumab were similar or higher than those of sum dabigatran. These results indicate that there was a direct correlation between the reversal effect of idarucizumab and the relative concentration of idarucizumab and sum dabigatran.

The results demonstrated that a potential recurrence of anticoagulant activity due to an insufficient idarucizumab dose can be overcome by a second dose of idarucizumab.

Additional Information: immunogenicity of idarucizumab in monkeys

A validated drug-bridging assay with electrochemiluminescence (ECL) detection (method # BBM-12-1002) was used to screen for anti-idarucizumab antibodies (ADA) [CTD 4.2.2.1-12_U13-3029]. Dabigatran etexilate treatment caused interference in this assay (a false positive response), but this interference was washed out about 2 weeks after dabigatran etexilate treatment [CTD 4.2.2.1-13_U13-3027]. Therefore, ADA results measured on Day 4 (after dabigatran etexilate treatment but before idarucizumab dosing) are not reliable, but the ADA results measured on Day 30 (19 days after last dabigatran etexilate treatment) are reliable.

At predose on Day 30, 6 out of 8 monkeys (3 out of 4 from each dose group) were ADA positive. These monkeys received one IV dose of idarucizumab on Day 4 and two IV doses of idarucizumab on Day 11. These are considered true ADA positives, because the ADA interference should have been washed out by 19 days after the last dabigatran etexilate dosing.

There was no difference in idarucizumab exposure and PD effect on Day 33 between ADA positive and negative monkeys and between Day 33 (third dose) and Day 4 (first dose) for each individual ADA positive monkey. These results suggest that idarucizumab exposure and its reversal effect were not impacted by the presence of ADA.

Additional Information: adverse effect in monkeys

There were no adverse signs observed during the study except for one monkey during the third phase of an idarucizumab infusion. On Day 33, Monkey 205 appeared to be normal after oral dosing of dabigatran etexilate, but collapsed during the third phase of an idarucizumab infusion, which started at 1.5 h after last oral dosing of dabigatran etexilate. The dosing of idarucizumab was stopped for this monkey. The condition of the monkey improved following treatment with oxygen and intravenous fluids, but the monkey never fully recovered. Therefore, the monkey was humanely sacrificed at approximately 3.5 h after idarucizumab dosing [CTD 4.2.2.2-04_U12-3849, CTD 4.2.2.2-05_U13-3539].

Anti-idarucizumab antibodies (ADA) were detected by Day 30 in 6 out of 8 monkeys, including the monkey (Monkey 205) with a reaction [CTD 4.2.2.2-05_U13-3539], which is not unexpected as it is a humanized antibody fragment. The response in Monkey 205 on Day 33 is suggestive of a hypersensitivity reaction related to anti-idarucizumab antibodies. The frequency of an ADA response against a humanized protein in a monkey is not considered predictive of the frequency of an ADA response in humans. Additional assessment of this finding is described in Toxicology Written Summary [CTD 2.6.6_Section 3.2.1, CTD 2.6.6_Section 9.2].

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4. 薬物動態試験：反復投与後の吸収

Test Article: Idarucizumab & dabigatran etexilate

Refer to Toxicology Tabulated Summary, CTD 2.6.7_Section 3 for tabulated results of toxicokinetics.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5. 薬物動態試験：臓器分布

Test Article: Idarucizumab

No organ distribution study was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6. 薬物動態試験：血漿タンパク結合

Test Article: Idarucizumab

No plasma protein binding study was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7. 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Test Article: Idarucizumab

No study was conducted in pregnant or nursing animals for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8. 薬物動態試験：その他の分布試験

Test Article: Idarucizumab

No other distribution study was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9. 薬物動態試験：*In Vivo* での代謝

Test Article: Idarucizumab

No metabolism *in vivo* study was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10. 薬物動態試験：*In Vitro* での代謝

Test Article: idarucizumab

No metabolism *in vitro* study was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

11. 薬物動態試験：推定代謝経路

Test Article: idarucizumab

No metabolic pathway study was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12. 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

Test Article: idarucizumab

No study of induction/inhibition of drug metabolizing enzymes was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13A. 薬物動態試験：排泄

Test Articles: Idarucizumab and dabigatran
CTD number: CTD 4.2.2.2-01
Study number.: dm-11-1095
Document number: U12-3083

Urinary excretion of idarucizumab and interaction with dabigatran in rats

Species	Rat
Strain	Crl:WI(Han)
Gender (M/F) / Number of animals	Male / 9 (only rats used for urinary excretion study are listed *)
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Idarucizumab: 50 mM sodium acetate and 200 mM sorbitol solution, pH 5.5 Dabigatran: 16% DMSO, 12% 0.1 M HCl and 72% saline solution
Method of Administration	IV
Doses	20 mg/kg of idarucizumab, 0.2 mg/kg of dabigatran, 0.2 mg/kg dabigatran followed with 20 mg/kg of idarucizumab (15 min later)
Sample	Urine and plasma *
Analyte	Idarucizumab and dabigatran
Assay	ELISA (idarucizumab) and LC-MS/MS (dabigatran)

* Plasma samples were collected from separate groups of rats with the same dosage regimens, and the results are presented in the Section 3.

Study design

Group [a]	End point	Number of rats	Test article	Dose (IV)	Samples	Analyte
2	Urinary excretion	3	Idarucizumab	20 mg/kg	Urine	Idarucizumab
3	Urinary excretion	3	Dabigatran	0.2 mg/kg	Urine	Dabigatran
4	Urinary excretion	3	Dabigatran + idarucizumab	0.2 mg/kg + 20 mg/kg	Urine	Idarucizumab, Dabigatran

[a] Groups 1, 5 and 6 were used to study PK following the same dosage regimens, and the results are presented in the Section 3.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13A. 薬物動態試験：排泄（続き）

Document number: U12-3083

Urinary excretion (%dose, mean ± SD, n=3/group) of idarucizumab and dabigatran in rats when administered separately or together

Interval (h)	Idarucizumab urinary excretion		Dabigatran urinary excretion	
	Alone	With dabigatran	Alone	With idarucizumab
0-8	13.2 ± 6.08	16.0 ± 5.04	50.9 ± 29.2	42.5 ± 11.2
8-24	1.12 ± 0.76	4.18 ± 3.17	5.99 ± 1.39	15.1 ± 8.87
24-48	0.25 ± 0.38	0.57 ± 0.85	0.39 ± 0.37	1.70 ± 1.22
0-48 (total)	14.5 ± 6.91	20.8 ± 6.68	57.2 ± 30.6	59.3 ± 17.1

Additional Information:

- Only a small fraction of idarucizumab dose was excreted unchanged in urine, and it was not substantially impacted by dabigatran pretreatment.
- There was no difference in extent of urinary excretion of dabigatran between rats with and without idarucizumab treatment, though there was a trend for a slight delay of dabigatran excretion by idarucizumab in rats treated with idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13B. 薬物動態試験：排泄

Test Articles: Idarucizumab and dabigatran etexilate

Three-phase exploratory PK/PD study of idarucizumab in monkeys with and without dabigatran etexilate pretreatment

CTD number: CTD 4.2.3.2-01

Study number: 11R090

Document number: U12-3326

Species	Monkey
Strain	Rhesus
Gender (M/F) / Number of animals	1 male and 1 female assigned to each of three groups
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Dabigatran etexilate: 0.5% hydroxylethylcellulose Idarucizumab: 50 mM sodium acetate and 200 mM sorbitol at a pH of 5.5
Method of Administration	PO (dabigatran etexilate) and 10-min IV infusion (idarucizumab)
Doses	Group 1: vehicles only Group 2: IV dose of idarucizumab at 30, 90 and 175 mg/kg on Days 4, 18 and 32, respectively. Group 3: PO dose of dabigatran etexilate at 12 mg/kg/day once daily for four days followed by an IV dose of idarucizumab at 30, 90 and 175 mg/kg at 1.5 h after the 4th dabigatran dose on Days 4, 18 and 32, respectively
Sample	Urine and plasma*
Analytes	Idarucizumab and sum dabigatran**
Assays	ELISA (idarucizumab) and LC-MS/MS (sum dabigatran)

* Plasma samples were collected from the same monkeys, and results of PK/PD and immunogenicity are presented in Section 3.

** Sum dabigatran: the sum of dabigatran and its glucuronide metabolites, which was determined after complete hydrolysis of glucuronides.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13B. 薬物動態試験：排泄（続き） **Document number:** U12-3326

Percent of idarucizumab dose excreted in urine after intravenous dosing of idarucizumab to monkeys (with and without pretreatment of dabigatran etexilate)

Group (Dosing)	Idarucizumab dose	Monkey ID (Sex)	%Dose
2 (Idarucizumab alone)	30 mg/kg	147 (Male)	10.9
		148 (Female)	3.56
	90 mg/kg	147 (Male)	11.9
		148 (Female)	8.73
	Overall mean		8.77
	Overall SD		3.71
3 (Idarucizumab with dabigatran etexilate)	30 mg/kg	149 (Male)	8.49
		150 (Female)	2.44
	90 mg/kg	149 (Male)	0.48
		150 (Female)	32.8
	Overall mean		11.1
	Overall SD		14.9

Additional Information:
Only a small and variable fraction of idarucizumab dose was excreted unchanged in urine, and it was not substantially impacted by dabigatran etexilate pretreatment.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13B. 薬物動態試験：排泄（続き） **Document number:** U12-3326

Mean (n=2) percent of dabigatran dose excreted in urine as sum dabigatran after oral dosing to monkeys (with and without idarucizumab)

Idarucizumab dose (mg/kg)	**0**	**30**	**90**
Interval (h)	**Day 3**	**Day 4**	**Day 18**
0-1.5	0.00	0.10	0.16
1.5-4	0.74	0.13	0.48
4-8	0.22	0.46	0.25
8-24	0.74	1.10	1.11
0-24 (Total)	1.70	1.79	1.99

Additional Information:
Only a small fraction of dabigatran etexilate dose was excreted as dabigatran and its glucuronides in urine, and it was not substantially impacted by idarucizumab pretreatment.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13C. 薬物動態試験：排泄

Test Articles: Idarucizumab and dabigatran etexilate
CTD number: CTD 4.2.2.2-05 and CTD 4.2.2.2-04
Study number: dm-12-1103 and DDB0210
Document number: U13-3539 and U12-3849

PK/PD and urinary excretion study of idarucizumab in monkeys pretreated with dabigatran etexilate

Species	Monkey
Strain	Rhesus
Gender (M/F) / Number of animals	M / 8 (4 per group)
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Dabigatran etexilate: 0.5% hydroxyethylcellulose Idarucizumab: 50 mM sodium acetate and 220 mM sorbitol and 0.02% polysorbate 20 at pH 5.5
Method of Administration	PO (dabigatran etexilate) and 10-min IV infusion (idarucizumab)
Doses	Oral doses of dabigatran etexilate (12 mg/kg/day) once daily for four days at each of three phases (Days 1 to 4, 8 to 11 and 30 to 33), IV dose(s) of idarucizumab (30 mg/kg for Group 1 and 60 mg/kg for Group 2) once, twice and once after 4th day of dabigatran dosing on Days 4, 11 and 33, respectively
Sample	Urine and plasma *
Analytes	Idarucizumab and sum dabigatran **
Assays	ELISA (idarucizumab) and LC-MS/MS (sum dabigatran)

* Plasma samples were collected from the same monkeys, and results of PK/PD and immunogenicity are presented in Section 3.
** Sum dabigatran: the sum of dabigatran and its glucuronide metabolites, which was determined after complete hydrolysis of glucuronides.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13C. 薬物動態試験：排泄（続き） **Document number:** U13-3539

Study design

Phase	Day	Group	Number/Sex	Dose route	Test substance	Dose level (mg/kg)
1	1 – 4	1	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	1 – 4	2	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	4	1	4 M	IV [a]	idarucizumab	30
	4	2	4 M	IV [a]	idarucizumab	60
2	8 – 11	1	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	8 – 11	2	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	11	1	4 M	IV [b]	idarucizumab	30 + 30
	11	2	4 M	IV [b]	idarucizumab	60 + 60
3	30 – 33	1	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	30 – 33	2	4 M	PO	Dabigatran etexilate	12
	33	1	4 M	IV [c]	idarucizumab	30
	33	2	4 M	IV [c]	idarucizumab	60

[a] A 10-minIV infusion of idarucizumab at 2.33 h after receiving the 4th oral administration of dabigatran etexilate on Day 4.

[b] Two 10-min IV infusions of idarucizumab at 1.5 and 3 h after receiving the 4th oral administration of dabigatran etexilate on Day 11.

[c] A 10-min IV infusion of idarucizumab at 1.5 h after receiving the 4th oral administration of dabigatran etexilate on Day 33.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13C. 薬物動態試験：排泄（続き） **Document number:** U13-3539

Percent of idarucizumab dose excreted in urine after intravenous dosing of idarucizumab to monkeys pretreated with 12 mg/kg/day dabigatran etexilate

Interval (h)	Group 1: 30 mg/kg (n=4)						Group 2: 60 mg/kg (n=4)						All combined (n=23)	
	Day 4 (Single dose)		Day 11 (Two doses)		Day 33 [a] (Single dose)		Day 4 (Single dose)		Day 11 (Two doses)		Day 33 (Single dose)			
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
0-8	13.0	9.13	8.87	4.38	3.67	2.71	6.01	6.10	11.5	3.27	5.74	3.88	8.33	5.85
8-24	1.42	1.32	0.68	0.85	0.76	0.98	2.14	2.02	0.99	0.78	1.01	0.82	1.18	1.19
24-32	0.06	0.04	0.12	0.04	0.16	0.17	0.32	0.38	0.16	0.09	0.19	0.29	0.17	0.21
32-48	0.14	0.04	0.31	0.25	0.29	0.24	0.53	0.40	0.15	0.07	0.09	0.05	0.25	0.25
0-48 (Total)	14.6	10.21	9.98	5.21	4.89	4.02	9.00	7.25	12.8	3.29	7.04	4.72	9.93	6.46

[a] n=3 due to early termination of one monkey.

Additional Information:
Only a small fraction of idarucizumab dose was excreted unchanged in urine.
There was no apparent difference in the extent of urinary excretion of idarucizumab between the two dose levels.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13C. 薬物動態試験：排泄（続き） **Document number:** U13-3539

Percent of dabigatran dose excreted in urine over 24 h as sum dabigatran after oral dosing of dabigatran etexilate to monkeys (with and without idarucizumab treatment)

Dabigatran etexilate [a] / idarucizumab dose (mg/kg)	Monkey ID	Day 3	Day 4	Day 11	Day 33
		No idarucizumab	One idarucizumab dose at 2.33h	Two idarucizumab doses at 1.5 and 3 h	One idarucizumab dose at 1.5 h
12 / 30	**205**	2.790	2.856	2.103	- [b]
	207	0.133	0.320	0.322	0.247
	209	0.459	1.224	0.235	0.504
	211	2.152	1.182	1.474	1.167
	Mean	1.38	1.40	1.03	0.639
	SD	1.29	1.06	0.91	0.475
	%CV	93.2	75.9	88.0	74.2
12 / 60	**213**	0.287	1.231	0.391	1.236
	215	1.032	2.568	1.412	1.015
	217	3.085	2.316	1.928	1.303
	219	1.485	1.190	3.599	6.104
	Mean	1.47	1.83	1.83	2.41
	SD	1.18	0.72	1.34	2.46
	%CV	80.4	39.3	73.1	102
Overall mean		1.43	1.56		
Overall SD		1.15	1.33		
Overall %CV		80.3	84.9		

[a] The dose was based on the dabigatran etexilate free base. 12 mg/kg dabigatran etexilate was equivalent to 9.0 mg/kg of active component dabigatran, which was used for calculation.
[b] No data available due to early termination

Additional Information:
Only a small fraction of dabigatran etexilate dose was excreted as dabigatran and its glucuronides in urine, and it was not substantially impacted by idarucizumab pretreatment.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14. 薬物動態試験：胆汁中への排泄

Test Articles: Idarucizumab

No study of excretion into bile was conducted for idarucizumab.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15. 薬物動態試験：薬物相互作用試験

Test Articles: Idarucizumab and dabigatran/dabigatran etexilate

No PK drug interaction studies with compounds other than dabigatran were conducted for idarucizumab in nonclinical species. This is consistent with the FDA draft guidance on Drug Interaction Studies (Section Drug-Therapeutic Protein Interactions), as idarucizumab was designed as an antibody fragment specifically targeting a xenobiotic (dabigatran) and is not a cytokine or cytokine modulator. The PK interaction between idarucizumab and dabigatran were investigated in rats and monkeys as part of PK and urinary excretion studies, and the results are included in Section 3 and 13.

In rats and monkeys, plasma concentration-time profiles, PK parameters and urinary excretion of idarucizumab were not impacted by IV dabigatran or PO dabigatran etexilate treatment, indicating that the distribution and elimination kinetics of complexes of idarucizumab-dabigatran (including dabigatran glucuronides) are the same as that of idarucizumab itself.

On the other hand, idarucizumab was designed to specifically bind to dabigatran and its glucuronides with high affinity in order to reverse its anticoagulant activity. As such, an impact of idarucizumab on PK and PD of dabigatran was expected. Idarucizumab reduced the plasma concentrations of active dabigatran in a dose-dependent manner while increased plasma concentrations of total dabigatran and sum dabigatran due to a disruption of equilibrium of unbound dabigatran and its glucuronides between tissue and plasma by binding to idarucizumab in plasma. This redistribution phenomenon has also been documented for other antigens in the presence of specific Fabs, such as the redistribution of digoxin from tissue to plasma immediately after dosing with an anti-digoxin Fab [CTD 4.3-08_R12-4112]. Similar results were observed across all animal species following dabigatran and idarucizumab dosing (see also Pharmacology Written Summary, CTD 2.6.2). The PK interaction mechanism between idarucizumab and sum dabigatran in monkeys, pigs and humans were captured by a preliminary semi-mechanistic model [CTD 4.2.2.2-06_n00234295, CTD 2.6.4_Section 3.4].

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16A. 薬物動態試験：その他

Test Articles: Idarucizumab and dabigatran

PK and urinary excretion in 5/6 nephrectomized rats

CTD number: CTD 4.2.2.7-01

Study number: dm-12-1102

Document number: U13-3340

Species	Rat
Strain	Crl:WI(Han) (5/6 nephrectomized and sham-operated)
Gender (M/F) / Number of animals	Male / 40
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Idarucizumab: 50 mM sodium acetate, 220 mM sorbitol and 0.02% polysorbate 20, pH 5.5 Dabigatran: 16% DMSO, 12% 0.1 M HCl and 72% saline solution Indoxyl sulfate potassium salt: normal saline
Method of Administration	IV bolus injection via a lateral tail vein
Doses	Dabigatran (0.2 mg/kg), Idarucizumab (20 mg/kg), Indoxyl sulfate (10 mg/kg)
Sample	Plasma, urine
Analytes	Idarucizumab, dabigatran and indoxyl sulfate
Assays	ELISA (idarucizumab) and LC-MS/MS (dabigatran and indoxyl sulfate)

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Study design

Test article, dose	Group	Study	No. & sex	Rats	Samples
Dabigatran, 0.2 mg/kg	1	PK	4 M	sham-operated	Plasma
	2	Urine	4 M		Urine
	3	PK	4 M	5/6 nephrectomized	Plasma
	4	Urine	4 M		Urine
Idarucizumab, 20 mg/kg	5	PK	4 M	sham-operated	Plasma
	6	Urine	4 M		Urine
	7	PK	4 M	5/6 nephrectomized	Plasma
	8	Urine	4 M		Urine
Indoxyl sulfate, 10 mg/kg	9	PK	4 M	sham-operated	Plasma
	10	PK	4 M	5/6 nephrectomized	Plasma

Comparison of PK Parameters of idarucizumab between sham-operated and 5/6 nephrectomized rats

PK Parameter	Sham-operated (Mean ± SD, n=3) [a]	5/6 nephrectomized (Mean ± SD, n=3) [a]	Ratio [b]
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	3700 ± 209	8580 ± 1890	2.32 *
CL (mL/min/kg)	1.89 ± 0.109	0.838 ± 0.168	0.443 *
V_{ss} (L/kg)	0.287 ± 0.0153	0.103 ± 0.0225	0.359 *
Terminal $t_{1/2}$ (h)	6.58 ± 0.514	6.29 ± 0.351	0.956
MRT (h)	2.55 ± 0.260	2.04 ± 0.0687	0.800 *
% of dose in urine	15.8 ± 3.21	12.6 ± 3.54	0.795

[a] One rat was excluded from the mean because part of dose was not given into the vein.

[b] Ratio of values in 5/6 nephrectomized rats over sham-operated rats.

* P value <0.05 for one-tail T-test.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Comparison of PK Parameters of dabigatran between sham-operated and 5/6 nephrectomized rats

PK Parameter	Sham-operated (Mean ± SD, n=3) [a]	5/6 nephrectomized (Mean ± SD, n=4)	Ratio [b]
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	539 ± 120	1020 ± 145	1.89*
CL (mL/min/kg)	13.6 ± 3.27	7.04 ± 1.09	0.52*
V_{ss} (L/kg)	0.590 ± 0.107	0.591 ± 0.192	1.00
Terminal $t_{1/2}$ (h)	0.851 ± 0.225	1.40 ± 0.256	1.65*
MRT (h)	0.749 ± 0.205	1.41 ± 0.458	1.88*
% of dose in urine	45.1 ± 7.30	32.1 ± 2.91	0.711*

[a] One rat was excluded from the mean because part of dose was not given into the vein.[b] Ratio of values in 5/6 nephrectomized rats over sham-operated rats.
* P value <0.05 for one-tail T-test.

Comparison of urinary excretion of idarucizumab (%dose) between sham-operated and 5/6 nephrectomized rats

Interval (h)	Sham-operated (n=4)		5/6 nephrectomized (n=4)	
	Mean	SD	Mean	SD
0-8	15.3	3.33	12.0	3.67
8-24	0.44	0.20	0.49	0.22
24-48	0.06	0.03	0.05	0.06
Total: 0-48	15.8	3.21	12.6	3.54

Comparison of urinary excretion of dabigatran (%dose) between sham-operated and 5/6 nephrectomized rats

Interval (h)	Sham-operated (n=4)		5/6 nephrectomized (n=4)	
	Mean	SD	Mean	SD
0-8	39.9	6.64	29.8	3.23
8-24	5.08	3.08	2.30	0.43
24-48	0.18	0.36	0.00	0.00
Total: 0-48	45.1	7.30	32.1	2.91

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16A. 薬物動態試験：その他（続き） **Document number:** U13-3340

Additional Information:

Renal function of 5/6 nephrectomized rats was reduced by approximately 50% as compared to the sham-operated rats, based on the result of serum urea and creatinine concentrations.

The clearance of the renally excreted control test article, indoxyl sulphate, was 37% lower in 5/6 nephrectomized rats than in sham-operated rats, consistent with reduced renal function in 5/6 nephrectomized rats. These results indicate that the 5/6 nephrectomized rat is an appropriate animal model for studying the effects of moderate renal impairment.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16B. 薬物動態試験：その他

Test Articles: Idarucizumab and dabigatran

PK/PD in 5/6 nephrectomized rats

CTD number: CTD 4.2.2.7-02

Study number: dm-13-1030

Document number: U13-3577

Species	Rat
Strain	Crl:WI(Han) (5/6 nephrectomized, sham-operated and normal)
Gender (M/F) / Number of animals	Male / 56
Feeding condition	Not fasted
Vehicle/Formulation	Idarucizumab: 50 mM sodium acetate, 220 mM sorbitol and 0.02% polysorbate 20, pH 5.5 Dabigatran: 16% DMSO, 12% 0.1 M HCl and 72% saline solution
Method of Administration	IV bolus injection via a lateral tail vein
Doses	Dabigatran: 0.4 mg/kg Idarucizumab: 0, 20 and 40 mg/kg (administered 5 min after dabigatran dosing)
Sample	Plasma
Analytes	Idarucizumab, dabigatran and anticoagulant activity
Assays	ELISA (idarucizumab), LC-MS/MS (dabigatran) and Hemoclot® diluted thrombin time (dTT) for anticoagulant activity (pharmacodynamics)

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16B. 薬物動態試験：その他（続き）

Document number: U13-3577

Study design

Group	No. & sex*	Rats	Doses (mg/kg)	
			Dabigatran	Idarucizumab **
1	8 M	sham-operated	0.4	none
2	8 M	5/6 nephrectomized	0.4	none
3	8 M	sham-operated	0.4	20
4	8 M	5/6 nephrectomized	0.4	20
5	8 M	sham-operated	0.4	40
6	8 M	5/6 nephrectomized	0.4	40
7	8 M	Normal	0.4	40

* Composite design with blood samples taken for all 3 analytes at 8 time points up to 8 h after dosing with 4 samples from each rat.
** Idarucizumab was given 5 min after dabigatran dosing.

PK parameters of idarucizumab in sham-operated, normal and 5/6 nephrectomized rats with dabigatran pretreatment

PK Parameter	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7
Rat	Sham	5/6 NX [a]	Sham	5/6 NX [a]	Normal
Dabigatran dose (mg/kg)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Idarucizumab dose (mg/kg)	20	20	40	40	40
C_{max} (nM)	12500	12300	23600	22000	20500
t_{max} (h) [b]	0.117	0.117	0.117	0.117	0.117
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	3660	8940	7330	18200	6910
CL (mL/min/kg)	1.90	0.780	1.90	0.767	2.02

[a] 5/6 NX: 5/6 nephrectomized rat.
[b] Idarucizumab was administered at 5 min time point (after dabigatran dosing at time 0), and 0.117 h (7 min) was the first sampling time point after idarucizumab dosing.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

PK parameters of dabigatran in sham-operated, normal and 5/6 nephrectomized rats with and without idarucizumab

PK Parameter	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6	Group 7
Rat	Sham	5/6 NX [a]	Sham	5/6 NX [a]	Sham	5/6 NX [a]	Normal
Dabigatran dose (mg/kg)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Idarucizumab dose (mg/kg)	None	None	20	20	40	40	40
C_{max} (nM)	2540	3410	6740	7100	6220	8520	8690
t_{max} (h)	0.0333	0.0333	0.117 [b]	0.117 [b]	0.117 [b]	0.117 [b]	0.117 [b]
$AUC_{0-\infty}$ (nM•h)	1130	1950	2850	8510	3330	12500	3710
CL (mL/min/kg)	12.5	7.26	4.95	1.66	4.25	1.13	3.82
V_{ss} (L/kg)	0.699	0.636	0.172	0.106	0.196	0.0914	0.129
$t_{1/2}$ (h)	1.02	1.40	1.68	1.57	1.73	1.47	1.56
MRT (h)	0.934	1.46	0.579	1.06	0.770	1.35	0.565

[a] 5/6 NX: 5/6 nephrectomized rat.

[b] Idarucizumab was administered at 5 min time point (after dabigatran dosing at time 0), and 0.117 h (7 min) was the first sampling time point after idarucizumab dosing.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Reversal of dabigatran anticoagulant activity by idarucizumab in sham-operated, normal and 5/6 nephrectomized rats [a]

Group, Rat Condition, Treatment	Summary (n=4)	Diluted thrombin time (second)							
		2min	7min	30min	1h	2h	3h	5h	8h
G1, Sham, No idarucizumab	Mean	154	62.8	47.9	31.5	30.9	30.7	28.1	26.5
	SD	23.4	35.1	16.7	11.2	9.30	4.03	5.24	3.03
G2, 5/6 NX [b], No idarucizumab	Mean	157	89.1	70.5	36.7	43.6	37.7	27.0	25.1
	SD	20.7	19.8	2.49	14.7	4.06	0.506	5.57	4.18
G3, Sham, 20 mg/kg idarucizumab	Mean	170	28.6	27.0	28.2	33.8	30.1	25.9	30.0
	SD	5.10	3.91	8.64	5.87	1.42	5.08	4.61	3.54
G4, 5/6 NX [b], 20 mg/kg idarucizumab	Mean	186	29.0	27.8	33.3	36.1	30.3	30.2	27.9
	SD	17.1	3.10	12.9	9.43	3.69	9.06	6.45	6.23
G5, Sham, 40 mg/kg idarucizumab	Mean	162	26.7	25.6	25.7	26.3	20.7	32.2	28.3
	SD	47.6	4.77	3.61	4.84	7.03	0.320	6.50	5.21
G6, 5/6 NX [b], 40 mg/kg idarucizumab	Mean	136	27.9	23.9	26.4	26.6	30.2	31.2	32.1
	SD	34.8	4.05	2.62	5.01	3.90	6.81	6.40	0.750
G7, Normal, 40 mg/kg idarucizumab	Mean	120	25.8	23.8	28.1	21.9	28.9	28.5	29.1
	SD	33.9	2.42	0.737	5.13	12.2	3.71	3.98	1.08

[a] Idarucizumab was administered 5 min after dabigatran dosing.

[b] 5/6 NX: 5/6 nephrectomized rat.

Proprietary confidential information © 2015 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Additional Information:

Renal function of 5/6 nephrectomized rats was reduced by approximately 50% as compared to the sham-operated rats, based on the result of serum urea and creatinine concentrations.

Complete reversal of dabigatran's anticoagulant activity was achieved by either a dose of 20 or 40 mg/kg of idarucizumab in both sham-operated and 5/6 nephrectomized rats. These results are consistent with the fact that the plasma molar concentrations of idarucizumab were similar to or in excess of the dabigatran concentrations after idarucizumab dosing in those rats. When compared to normal or sham-operated rats, the increased dabigatran concentrations seen in renally impaired rats were matched by the increased idarucizumab concentrations, resulting in a complete reversal of dabigatran's anticoagulant activity by idarucizumab in normal, sham-operated and renally impaired rats.