サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.4 薬物動態試験の概要文

Total number of pages: 38

目　　次

略号と用語の定義 6

1　まとめ 8

2　分析法 10

2.1　マウス、ラット及びサル血清並びにウサギ及びサル血漿中遊離形 aflibercept の測定 10

2.2　ウサギ及びサル血漿における結合形 aflibercept の測定 10

2.3　ウサギ血清における ADA の検出 11

2.4　サル血清における ADA の検出 11

3　吸収 14

3.1　CD-1 マウスにおける IV 及び SC 投与後の遊離形 aflibercept の PK 評価 14

3.2　C57BL6 マウスにおける SC 投与後の遊離形及び結合形 aflibercept の PK 評価 15

3.3　Sprague Dawley ラットにおける IV 及び SC 投与後の遊離形 aflibercept の PK 評価 17

3.4　カニクイザルにおける IV 及び SC 投与後の aflibercept の PK 評価 20

3.5　Aflibercept の反復投与毒性試験における TK 評価 22

4　分布 24

4.1　ラットに IV 投与後の aflibercept の分布 24

5　代謝（動物種間の比較） 27

6　排泄 28

7　薬物動態学的薬物相互作用 30

8　その他の薬物動態試験 31

8.1　種々の担癌マウスモデルにおける PK／PD 評価 31

8.2　PK パラメータとシアル酸含有量との相関関係 33

9　免疫原性 35

10　考察及び結論 36

参 考 文 献 38

表　目　次

表 1 - 遊離形及び結合形 aflibercept 及び ADA の測定法の要約 13

表 2 - CD-1 マウスに 1 mg/kg の用量で単回 IV 及び SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD） 15

表 3 - 雄 C57BL6 マウスに SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD; n=6） 16

表 4 - ラットに 1 mg/kg の用量で単回 IV 及び SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD） 18

表 5 - ラットに 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD） 19

表 6 - サルに 5 mg/kg の用量で単回 IV 又は 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD） 20

表 7 - カニクイザルにおける遊離形 aflibercept 平均（標準偏差）TK パラメータ 22

表 8 - 2、5 及び 13 週目の投与前におけるカニクイザルの結合形 aflibercept 平均血漿濃度 23

表 9 - ラットに ^{125}I-aflibercept1 mg/kg を単回 IV 投与したときの遊離形 aflibercept 及び総放射能の平均血清中 PK パラメータ推定値 25

表 10 - ラットに ^{125}I-aflibercept1 mg/kg を単回 IV 投与したときの 投与後 5 分における組織内総放射能 .. 26

表 11 - サルを用いた毒性試験における結合形 aflibercept 濃度から推定した 結合形 aflibercept の消失半減期 28

表 12 - シャムオペラット及び腎摘出ラットに aflibercept1 mg/kg を 単回 IV 投与したときの、遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均値 ± SD） 29

図　目　次

図 1 - マウスに 1 mg/kg の用量で SC 又は IV 投与したときの血清中遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線（平均 ± SD） 15

図 2 - 雄 C57BL6 マウスに aflibercept を単回 SC 投与したときの血清中遊離形及び結合形 aflibercept 曝露量 17

図 3 - ラットに 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線（平均 ± SD） 19

図 4 - カニクイザルに 5 mg/kg の用量で IV 又は SC 投与したときの遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線 ... 21

図 5 - カニクイザルに 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で SC 投与したときの遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線 21

図 6 - 担癌 SCID マウスに aflibercept を 0.5、1、2.5、10 又は 25 mg/kg の用量で 1～2 週間、週 2 回 SC 投与したときの遊離形及び結合形 aflibercept の血清中濃度（A：マウス腫瘍、B ヒト腫瘍） 32

図 7 - 腫瘍容積、投与量並びに循環血中の遊離形及び結合形 aflibercept 濃度の関係 33

略号と用語の定義

4PL	4 パラメータロジスティック（4 parameter logistic curve fit）
ADA	抗薬物抗体（Anti-Drug Antibodies）
AUC	血漿中（又は血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma (or serum) concentration time curve calculated by the linear trapezoidal rule）
$AUC_{0-\infty}$	線形台形法及び無限大時間への外挿により算出した血漿中（又は血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma (or serum) concentration time curve calculated by the linear trapezoidal rule and extrapolated to infinity）
CL	血漿（又は血清）クリアランス Plasma (or serum) clearance
C_{last}	t_{last} 時点での濃度（Concentration corresponding to t_{last}）
C_{max}	最高血漿中（又は血清中）濃度（Maximum plasma (or serum) concentration observed）
CTAD	クエン酸ナトリウム・テオフィリン・アデノシン・ジピリダモール（Sodium citrate theophylline adenosine dipyridamole）
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）
F	絶対的バイオアベイラビリティ（Absolute bioavailability）
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice）
HPLC	高速液体クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography）
HRP	西洋ワサビペルオキシダーゼ（Horseradish Peroxidase）
IgG1	免疫グロブリン G1（Immunoglobulin G1）
IU	国際単位（International unit）
IV	静脈内（Intravenous）
LLOQ	定量下限（Lower limit of quantification）
MRT	平均滞留時間（Mean Residence Time）
OD	光学濃度（Optical Density）
PD	薬力学（Pharmacodynamic）
PK	薬物動態（Pharmacokinetic）
PQC	陽性品質管理（Positive Quality Control）
RF	リウマチ因子（rheumatoid factor）
QC	品質管理（Quality controls）
SC	皮下（Subcutaneous）
SCID	重症複合免疫不全（Severe combined immunodeficient）

SD	標準偏差（standard deviation）
t_{last}	測定可能（ゼロではない）な濃度の最終測定時点（Time of last measurable (non-zero) concentration）
t_{max}	最初の C_{max} 到達時間（First time to reach Cmax）
$t_{1/2}$	終末相半減期（Terminal half life）
VEGF	血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor）
VEGFR	VEGF 受容体（VEGF receptor）
VEGF Trap	Aflibercept、AVE0005
V_{ss}	定常状態での分布容積（Volume of distribution at steady-state）
V_z	分布容積（Volume of distribution）
Z 数	1 糖鎖あたりの平均シアル酸含量（Average sialic acid content per sugar chain）

1　まとめ

遊離形 aflibercept の非臨床薬物動態（PK）プロファイルは、薬理試験及び毒性試験で使用した動物種であるマウス（CD-1 及び C57BL6）、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルに単回静脈内（IV）及び皮下（SC）投与して検討した。検討した投与経路（IV 及び SC）は、予定臨床投与経路である IV を含む、非臨床薬理及び毒性試験において使用された投与方法を用いた。用量は、薬理及び毒性試験で使用された範囲で選択した。PK 及び分布試験データは、薬物動態試験概要表（[Module 2.6.5 表 2.6.5.1]）に要約している。

Aflibercept のトキシコキネティクスは、ピボタルな毒性試験において、血清中抗 aflibercept 抗体（抗薬物抗体［ADA］）濃度、並びに ADA が aflibercept のクリアランス及び安全性に及ぼす影響とともに評価した（[Module 2.6.6 3 項] 及び[Module 2.6.7 表 2.6.7.2]）。

遊離形（非結合形）aflibercept 及び不活性型である内因性 VEGF に結合した aflibercept（結合形 aflibercept）を測定する ELISA 法を開発し、バリデートした。Aflibercept の最大抗腫瘍効果は、内因性 VEGF の大部分が結合（不活性化）したとき（血清中結合形 aflibercept 濃度がプラトー状態）に得られた。

反復投与毒性試験における血清中 ADA 濃度を測定する ELISA 法も開発し、バリデートした。

マウス、ラット及びサルに IV 投与したとき、遊離形 aflibercept は複数コンパートメントの PK プロファイルを示した。クリアランスは遅く、終末相の消失半減期（$t_{1/2}$）は長く、定常状態での分布容積（V_{ss}）は中央コンパートメントの分布容積よりわずかに大きかった。Aflibercept の SC 投与時のバイオアベイラビリティはマウス（94%）及びサル（85%）で良好であり、ラット（33%）では中程度であった。マウス、ラット及びサルにおいて aflibercept を複数用量で SC 投与したとき、標的分子を介した PK の特徴である、明らかなクリアランスの飽和による非線形の PK プロファイルが認められた。これにより、高用量の aflibercept では遊離形 aflibercept の $t_{1/2}$ が遅延し、曝露量は用量比例性を上回って増加した。非線形の PK プロファイルは、aflibercept の全身クリアランスが飽和することを示唆しており、内因性 VEGF に遊離形 aflibercept が結合することにより、遊離形 aflibercept よりも $t_{1/2}$ が長い結合形 aflibercept が形成されるためと考えられる。また aflibercept は、蛋白質の分解による非飽和性の過程によっても消失すると考えられる。しかし、結合形 aflibercept のより長い見かけの $t_{1/2}$ は、内因性 VEGF の持続的な生成と関係する可能性がある。遊離形 aflibercept と VEGF との結合が飽和に達しない低い用量では、比較的早い遊離形 aflibercept のクリアランスに結合形 aflibercept の形成が加わることにより、遊離形 aflibercept の消失がより早くなると考えられる。

ヒト及びマウス腫瘍（B16F1 マウス黒色腫、A673 ヒト横紋筋肉腫及び MMT マウス乳癌）を皮下に移植した担癌 SCID マウスに、aflibercept を 0.5～25 mg/kg の用量で反復 SC 投与した。Aflibercept の用量依存的な抗腫瘍効果の増大は、十分量の血清中遊離形 aflibercept 濃度の存在下、血清中結合形 aflibercept 濃度がプラトーに近づくまで生じた。これらの条件は、2.5 mg/kg 以上の用量で aflibercept

を週 2 回 SC 投与したときに満たされ、すべての利用可能な内因性 VEGF が結合していることが示唆される。腫瘍を同種及び異種移植したマウスにおける結合形 aflibercept 濃度は、非担癌マウスで見られた濃度と大差はなかったことから、腫瘍移植マウスにおける腫瘍由来の VEGF は体内の総 VEGF 又は循環血中の VEGF のごく一部分にすぎないことが示唆される。

ラットに ^{125}I-aflibercept を IV 投与したときの組織内分布は、蛋白医薬品で予測されるように、組織内放射能は肝臓で最も高く、次いで血流量の多い組織で高いことが明らかになった。血清中及び組織内放射能の消失は速やかであり、投与後 7 日目でほぼ完全に消失した。

Aflibercept は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S6 ガイダンスに該当する融合蛋白質であるので、代謝試験は実施しなかった。遊離形 aflibercept は、標的分子を介した PK と一致する非線形の飽和性の PK を示す。動物における血清中遊離形及び結合形 aflibercept 濃度－時間推移から、遊離形 aflibercept は、比較的速やかな内因性 VEGF との飽和性かつ高親和性の特異的結合による消失と、非飽和性の蛋白質分解により緩徐な消失を示すことが示唆される。非飽和性の消失は結合形 aflibercept のクリアランスを示している。腎摘出ラット及びシャムオペ対照ラットに aflibercept を単回 IV 投与したとき、aflibercept の曝露量は同程度であり、ラットにおいて aflibercept はほとんど腎排泄されないことが確認された。

今回要約したいずれの試験においても、aflibercept の PK パラメータに性差は見られなかったため、パラメータはすべて雌雄を合算した平均で示している。

2　分析法

2.1　マウス、ラット及びサル血清並びにウサギ及びサル血漿中遊離形 aflibercept の測定

動物を用いた薬理、PK 及び毒性試験で得られたマウス（[Module 4.2.2.1-1: VGFT-AS-01006-SA-01V2]）、ラット（[Module 4.2.2.1-2: VGFT-AS-00020-SA-01V2]）及びサル（[Module 4.2.2.1-4: VGFT-AS-01010-SA-01V2]）の血清、並びにウサギ（[Module 4.2.2.1-3: VGFT-AV-06004-SA- 01V2]）及びサル（[Module 4.2.2.1-5: VGFT-AS-03033-SA-01V2]及び[Module 4.2.2.1-6: VGFT-AV-03033-PV01-SA-01V1]）の血漿中遊離形 aflibercept 濃度を測定する酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を開発し、バリデートした。

これらの測定法では、ヒト VEGF（hVEGF165）をコートした 96 穴マイクロプレートを用いて、血清又は血漿検体中、検量線用あるいは品質管理（QC）用試料中から aflibercept を捕捉する。捕捉された aflibercept は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）で標識したヤギ（マウス、ラット及びウサギ測定法）又はマウス（サル測定法）抗ヒト IgG Fc 領域特異的抗体を加えて検出される。最後に、ペルオキシダーゼに特異的な基質を添加し、遊離形 aflibercept 濃度に比例するシグナル強度を比色定量した。検量線用試料の光学濃度（OD）測定値から、対応する設定濃度に対して両対数回帰モデル（マウス、ラット及びサル）又は 4 パラメータロジスティック（4PL）回帰モデル（ウサギ）を用いて検量線を作成し、他のすべての試料（検体及び QC）の測定値から濃度を算出した。測定法のバリデーションは、真度、精度、直線性、感度、特異性、回収率及び頑健性について検討した。サル測定法は、その後改良され、真度、精度、直線性、選択性、頑健性及び分析対象物質安定性を評価するためにパーシャルバリデーションを実施した。この測定法では、元の比色定量による検出法からペルオキシダーゼに特異的なルミノール基質を用いた化学発光検出法に変更し、CTAD（クエン酸ナトリウム・テオフィリン・アデノシン・ジピリダモール）及び EDTA 両方のサル血漿でバリデートした。次いで、検量線用試料の相対発光量（RLU）から、対応する設定濃度に対して 4PL 回帰モデルを用いて検量線を作成し、他のすべての試料（検体及び QC）の測定値から濃度を算出した。検体の長期安定性（最初の測定法でのデータ）を含む関連するすべての分析性能パラメータを表 1に示す。

2.2　ウサギ及びサル血漿における結合形 aflibercept の測定

ウサギ血漿（EDTA）（[Module 4.2.2.1-7: VGFT-AV-06035-SA-01V3]）及びサル血漿（EDTA 及び CTAD）（[Module 4.2.2.1-8: VGFT-AV-04018-SA-01V1]）における VEGF との結合形 aflibercept 濃度は、バリデートした ELISA により測定した。この方法では、ウサギ及びサルの VEGF165 と結合するヤギ抗 hVEGF165 抗体をコートしたマイクロプレートを使用した。検量線用及び QC 用試料は、ウサギ及びサル VEGF165 との結合形 aflibercept を測定用マトリックス（20%ウサギ EDTA 血漿及び 20%サル CTAD 又は EDTA 血漿）を用いて様々な濃度に調製した。検量線用及び QC 用試料並びに検体を添加し、試料中の結合形 aflibercept はマイクロプレートに固定化した抗 hVEGF165 抗体によって捕捉した。次に、結合形

aflibercept をマウス抗ヒト VEGF 受容体 1（VEGFR1）モノクローナル抗体と結合させた後、Fc 領域に特異的な抗体であるペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウス IgG によって検出した。最後に、ペルオキシダーゼに特異的なルミノール基質を添加し、結合形 aflibercept 濃度に正比例する RLU のシグナル強度を定量した。検量線用試料の RLU 値から、対応する設定濃度に対して 4PL 回帰モデルを用いて検量線を作成し、他のすべての試料（検体及び QC）の RLU 値から濃度を算出した。測定法のバリデーションは、真度、精度、直線性、感度、特異性、回収率、安定性及び頑健性について検討した。検体の長期安定性を含む関連する分析性能パラメータを表 1に示す。

2.3　ウサギ血清における ADA の検出

ウサギ血清における ADA は、バリデートした ELISA（[Module 4.2.2.1-9: VGFT-AV-07019-SA-01V3]）を用いて検出した。この方法では、aflibercept をコートしたマイクロプレートを使用した。検量線用試料及び陽性品質管理（PQC）用試料として、測定用マトリックスを用いて様々な濃度のウサギ抗 aflibercept ポリクローナル抗体を調製した。検量線用及び QC 用試料並びに検体をマイクロプレートに添加し、試料中のウサギ ADA を、プレート表面に固定化した aflibercept によって捕捉した。ADA を HRP 標識したマウス抗ウサギ IgG (H+L) 抗体で検出した。最後に、ペルオキシダーゼに特異的な化学発光基質を添加し、試料中 ADA 濃度に正比例するシグナル強度を定量した。検量線用試料の RLU 測定値から、対応する設定濃度に対して 4PL 回帰モデルを用いて検量線を作成し、他のすべての試料（検体及び QC）の RLU 値から濃度を算出した。測定法のバリデーションは、真度、精度、直線性、感度、特異性、回収率及び頑健性について検討した。検体の長期安定性を含む関連する分析性能パラメータを表 1 に示す。

2.4　サル血清における ADA の検出

サル血清における ADA は、バリデートした ELISA（[Module 4.2.2.1-10: VGFT-AS-02042- SA-01V2]）を用いて検出した。この方法では、aflibercept をコートしたマイクロプレートを使用した。検量線用試料及び PQC 用試料として、測定用マトリックス（10%サル血清）を用いて様々な濃度のヒトリウマチ因子（hRF）を調製した。検量線用及び QC 用試料並びに検体をマイクロプレートに添加し、試料中の ADA を、プレート表面に固定化した aflibercept によって捕捉した。ADA をサル IgG に交差反応するペルオキシダーゼ標識マウス抗ヒト IgG F(ab)2 フラグメント特異的抗体で検出した。最後に、ペルオキシダーゼに特異的なテトラメチルベンジジン基質を添加し、ADA 又は hRF 濃度に正比例するシグナル強度を定量した。

国際単位（IU）に基づく濃度が異なる 7 つの hRF 検量線用試料から検量線を作成した。すべての OD 値からブランク値を減じ、検量線用試料の OD 値から、対応する設定濃度に対して 4PL 回帰モデルを用いて検量線を作成し、他のすべての試料（検体及び QC）の測定値から濃度を算出した。測定法のバリデーションは、真度、精度、直線性、感度、特異性、回収率及び頑健性について検討した。検体の長期安定性を含む関連するすべての分析性能パラメータを表 1に示す。

その後、サルにおける ADA 測定法を改良し（[Module 4.2.2.1-11: VGFT-AS-02042-PV01-SA-01V2]）、テトラメチルベンジジン基質をルミノール化学発光基質に変更した。改良した測定法のパーシャルバリデーションを実施し、真度、精度、感度及び選択性について検討した。最初の測定法と同様の手順でこの測定法による測定を実施した。検量線用及び QC 用試料は同一であるが、上記のように ADA 又は hRF の検出に用いる化学発光基質のみが異なっている。また、測定値からブランク値を減じることはせず、ブランク値をゼロ標準として使用し、検量線用試料の測定値から、対応する設定濃度に対して両対数回帰モデルを用いて検量線を作成し、他のすべての試料（検体及び QC）の測定値から濃度を算出した。測定法のバリデーションは、真度、精度、直線性、感度、特異性、回収率及び頑健性について検討した。関連する分析性能パラメータを表 1に示す。測定法の変更は一部であったため、長期安定性試験は実施せず、安定性は前の測定法で得られたものと同様とした（[Module 4.2.2.1-10: VGFT-AS-02042-SA-01V2]）。

表 1 - 遊離形及び結合形 aflibercept 及び ADA の測定法の要約

動物種	測定対象物	マトリックス	希釈係数	検量線用試料 (ng/mL)	QC サンプル (ng/mL)	実サンプルの LLOQ (ng/mL)	安定性（保存条件）	バリデーション [報告書番号] 記載箇所
マウス	遊離形 aflibercept	4% マウス血清	2 倍	20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125	12, 4, 0.8	12.5	測定せず	[Module 4.2.2.1-1] [表 2.6.5.2]
ラット	遊離形 aflibercept	4% ラット血清	2 倍	20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31	12, 4, 0.8	7.75	測定せず	[Module 4.2.2.1-2] 表 2.6.5.2
ウサギ	遊離形 aflibercept	1% ウサギ EDTA 血漿	2 倍	100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56	75, 20, 4.5	156	24 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-3] 表 2.6.5.2
ウサギ	結合形 aflibercept	20% ウサギ EDTA 血漿	1.5 倍	100, 66.7, 44.4, 29.6, 19.8,13.2, 8.8	75, 40, 25	44	26 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-7] 表 2.6.5.2
ウサギ	ADA	1% ウサギ血清	2 倍	400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25	300, 60, 12	625	24 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-9] 表 2.6.5.2
サル	遊離形 aflibercept	4% サル血清	1.5 倍	80, 53.3, 35.5, 23.7, 15.8, 10.5, 7.02	60, 40, 20	175.5	6 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-4] 表 2.6.5.2
サル	遊離形 aflibercept	4% サル CTAD 血漿	1.5 倍	80, 53.3, 35.5, 23.7, 15.8, 10.5, 7.02	60, 40, 20	263.25	15 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-5] 表 2.6.5.2
サル	遊離形 aflibercept	2% サル CTAD 又は EDTA 血漿	2 倍	200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13	160, 30, 9	156.5	24 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-6] 表 2.6.5.2
サル	結合形 aflibercept	20% サル CTAD 又は EDTA 血漿	2 倍	500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81	400, 80, 20	39.05	19 ヵ月(CTAD) 21 ヵ月(EDTA) (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-8] 表 2.6.5.2
サル	ADA	10% サル血清	1.6 倍	1500, 938, 586, 366, 228, 143, 89[a]	1350, 540, 270[a]	894.1[a]	12 ヵ月 (-70～-90°C)	[Module 4.2.2.1-10] 表 2.6.5.2
サル	ADA	10% サル血清	1.6 倍	1500, 938, 586, 366, 228, 143, 89[a]	1350, 540, 270[a]	894.1[a]	12 ヵ月 (-70～-90°C)[b]	[Module 4.2.2.1-11] 表 2.6.5.2

a　mIU/mL：*b*　追加試験は実施せず、VGFT-AS-02042-SA-01 に記載の測定法との類似性に基づいて安定性を推定した。

3　吸収

マウス、ラット及びサルにおいて IV 及び SC 投与したときの aflibercept の PK プロファイルを検討した。評価した PK パラメータのいずれにおいても性差は見られなかったことから、概要文における PK 試験のデータはすべて雌雄の合算値として報告している。薬物動態試験概要表（[Module 2.6.5 表 2.6.5.3]）では、これに対応する平均のデータを性別ごとに報告している。

マウス、ラット及びサルに IV 投与したとき、遊離形 aflibercept は複数コンパートメントの PK プロファイルを示した。クリアランスは遅く、$t_{1/2}$ は長く、V_{ss} は中央コンパートメントの容積よりもわずかに大きかった。ラット、マウス及びサルにおいて aflibercept を複数の用量で SC 投与したとき、標的分子を介したクリアランスを示唆する非線形の PK プロファイルが認められた。この PK プロファイルの特徴として、遊離形 aflibercept の $t_{1/2}$ が遅延し、高用量の aflibercept では用量比を上回る曝露量であった。Aflibercept の SC 投与時のバイオアベイラビリティはマウス（94%）及びサル（85%）では良好であり、ラット（33%）では中程度であった。結合形 aflibercept は循環血中の薬物形として大きな割合を占め、その相対百分率は aflibercept の用量が減少するとともに増加した。

3.1　CD-1 マウスにおける IV 及び SC 投与後の遊離形 aflibercept の PK 評価

雌雄 CD-1 マウスに 1 mg/kg の用量で単回 IV 及び SC 投与したときの遊離形 aflibercept のバイオアベイラビリティ及びノンコンパートメント解析による PK パラメータを算出し、性差についても検討した（[Module 4.2.2.2-1: VGFT-PK-01007-3]）。希釈していない血清における LLOQ が 12.5 ng/mL である ELISA を用いて、血清中遊離形 aflibercept 濃度を測定した（[Module 4.2.2.1-1: VGFT-AS-01006-SA-01V2]）。血液を投与前（0）、投与後 5 及び 15 分（IV 投与のみ）、45、90、180 及び 360 分、24、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採取した。ノンコンパートメント解析による PK パラメータを表 2に示す。PK には性差がみられなかった。1 mg/kg を IV 投与したとき、遊離形 aflibercept は複数コンパートメントの PK プロファイルを示した（図 1）。クリアランスは遅く、$t_{1/2}$ は長く、分布容積は中央コンパートメントよりわずかに大きかった。血清中遊離形 aflibercept 濃度は、投与後 7 日でも検出された。1 mg/kg を SC 投与したとき、バイオアベイラビリティは高く（94%）、$t_{1/2}$ は IV 投与したときと同程度であった。

表 2 - CD-1 マウスに 1 mg/kg の用量で単回 IV 及び SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD）

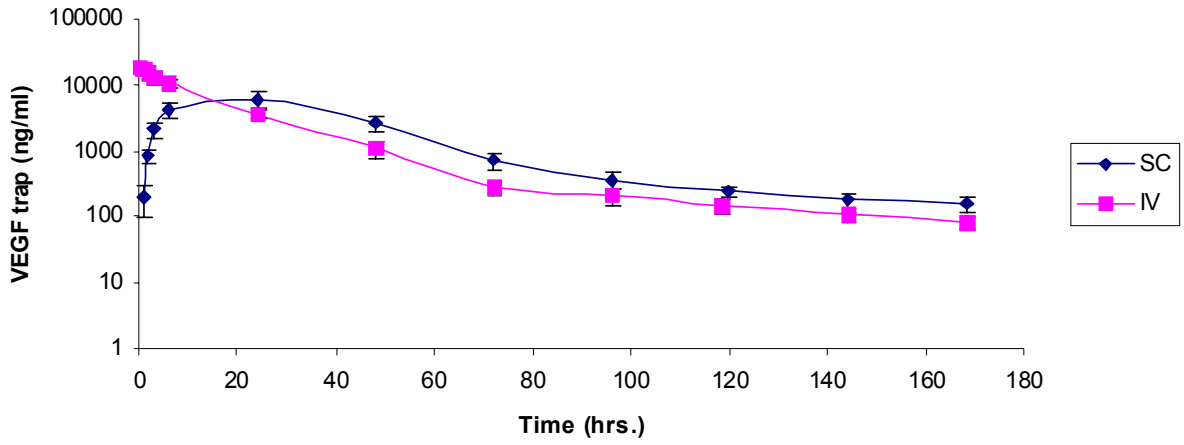
投与経路	**IV**	**SC**
例数 [a]	9 (5/4)	10 (5/5)
用量 (mg/kg)	1	1
C_{max} (µg/mL)	19.5 ± 2.6	6.15 ± 1.6
t_{max} (h)	0.48 ± 0.97	24 ± 0
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	306 ± 40	288 ± 66
$t_{1/2}$ (h)	48 ± 7	41 ± 5
CL (mL/h/kg)	3.31 ± 0.43	n.c.
V_{ss} (mL/kg)	77 ± 14	n.c.
F (%) [b]	n.c.	94

略号： n.c. = 算出せず

a　全動物数 (雄 / 雌)

b　$AUC_{0-\infty}$比から算出したバイオアベイラビリティ

図 1 - マウスに 1 mg/kg の用量で SC 又は IV 投与したときの血清中遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線（平均 ± SD）



3.2　C57BL6 マウスにおける SC 投与後の遊離形及び結合形 aflibercept の PK 評価

Aflibercept を 0.5～25 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの雄 C57BL6 マウスにおける遊離形及び結合形 aflibercept の PK を評価した（[Module 4.2.2.2-2: VGT-NC-004]）。血清検体は、投与後 0.04、0.083、0.16、0.25、1、3、7、10、14、17、21、24 及び 28 日に採取し、遊離形及び結合形 aflibercept を ELISA

で測定した。遊離形 aflibercept に関するノンコンパートメント解析による PK パラメータ及び用量比例性の評価を表 3及び図 2に示す。

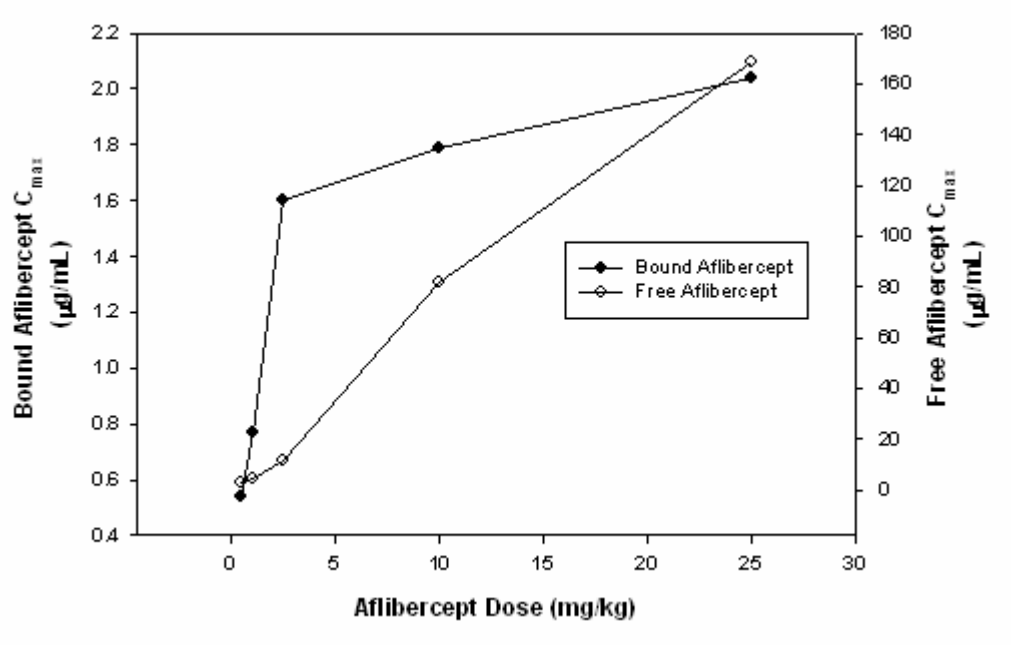
SC 投与時の用量範囲における遊離形 aflibercept の曝露量の用量比例性からの逸脱及び用量依存的な $t_{1/2}$ の変化から、遊離形 aflibercept の全身クリアランスには、飽和性のクリアランス経路が寄与していることが強く示唆される。結合形 aflibercept の曝露量（C_{max} 及び AUC）は、0.5～2.5 mg/kg では用量に比例して増大し、次いで、さらに用量を増やすとプラトーに近づいた（図 2）。遊離形 aflibercept の曝露量は、0.5～2.5 mg/kg の範囲では用量に対して非線形に増加し、2.5 mg/kg を超える用量では、ほぼ線形になった。これらのデータから、2.5 mg/kg 以上の aflibercept で、利用可能な内因性 VEGF とほぼ完全に結合することが示唆される。

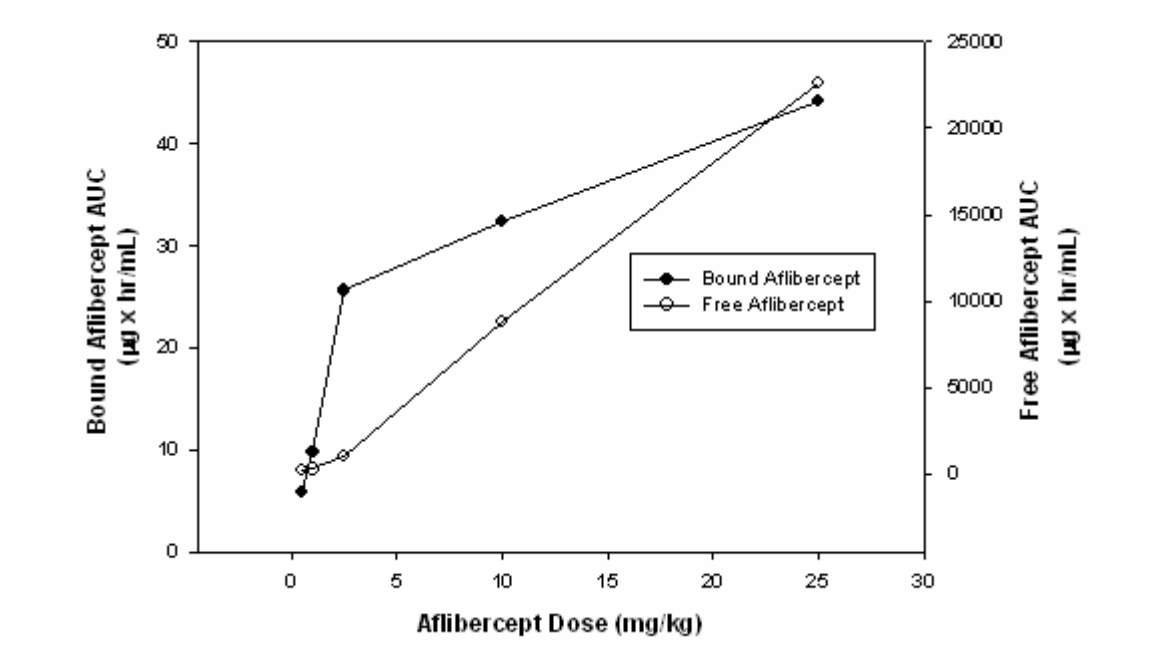
表 3 - 雄 C57BL6 マウスに SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ

（平均 ± SD；n=6）

投与経路	**SC**	**SC**	**SC**	**SC**	**SC**
用量 (mg/kg)	0.5	1	2.5	10	25
C_{max} (µg/mL)	3.10 ± 1.61	4.50 ± 0.79	11.7 ± 2.19	81.96 ± 49.4	169 ± 16
t_{max} (h)	19 ± 9	19 ± 9	19± 9	24 ± 0	24 ± 0
$AUC_{0-\infty}$ (µg･h/mL)	190 ± 108	286 ± 50	989 ± 166	8817 ± 4789	22623 ± 2808
$AUC_{0-\infty}$/用量	380	286	396	882	905
$t_{1/2}$ (h)	33 ± 3	25 ± 3	26 ± 8	61 ± 3	62 ± 4

図 2 - 雄 C57BL6 マウスに aflibercept を単回 SC 投与したときの血清中遊離形及び結合形 aflibercept 曝露量





3.3　Sprague Dawley ラットにおける IV 及び SC 投与後の遊離形 aflibercept の PK 評価

Sprague Dawley ラットにおける遊離形 aflibercept の PK を評価するため、2 つの試験を実施した（[Module 4.2.2.2-3: VGFT-PK-01001-2]、[Module 4.2.2.2-4: VGFT-PK-01002-3]）。いずれの試験も、希釈していな

い血清で LLOQ が 7.75 ng/mL の ELISA を用いて血清中遊離形 aflibercept 濃度を測定した（[Module 4.2.2.1-2: VGFT-AS-00020-SA-01V2]）。

1 つ目の試験（[Module 4.2.2.2-3: VGFT-PK-01001-2]）では、雌雄ラットに 1 mg/kg の用量で IV 及び SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept のバイオアベイラビリティ及びノンコンパートメント解析による PK パラメータを算出し、性差についても検討した。血液を投与前（0）、投与後 5 及び 15 分（IV 投与のみ）、45、90、180 及び 360 分、24、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採取した。ノンコンパートメント解析による PK パラメータを表 4に示す。PK には性差は見られなかった。1 mg/kg を IV 投与したとき、血清中遊離形 aflibercept は複数コンパートメントの PK プロファイルを示した。クリアランスは遅く、$t_{1/2}$ は長く、定常状態での分布容積（V_{ss}）は中央コンパートメントよりわずかに大きかった。血清中遊離形 aflibercept 濃度は、投与後 7 日でも検出された。血清中遊離形 aflibercept の平均 $t_{1/2}$ は IV と SC で類似しており、また、SC 投与したときのバイオアベイラビリティは 33%であった。

表 4 - ラットに 1 mg/kg の用量で単回 IV 及び SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD）

投与経路	IV	SC
例数 *a*	10 (5/5)	10 (5/5)
用量 (mg/kg)	1	1
C_{max} (µg/mL)	20.8 ± 2.4	2.7 ± 1.0
t_{max} (h)	0.28 ± 0.32	24 ± 0
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	463 ± 65	154 ± 48
$t_{1/2}$ (h)	54 ± 9	45 ± 8
CL (mL/h/kg)	2.21 ± 0.34	n.c.
V_{ss}(mL/kg)	51 ± 7	n.c.
F (%)*b*	n.c.	33

略号： n.c. = 算出せず

a 全動物数 (雄 / 雌)

b $AUC_{0-\infty}$比から算出したバイオアベイラビリティ

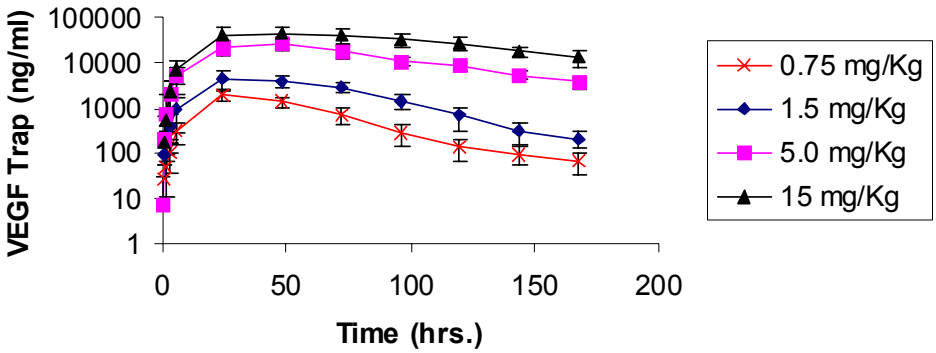
2 つ目の試験は SC 用量設定試験であり（[Module 4.2.2.2-4: VGFT-PK-01002-3]）、雌雄ラットに 4 用量で SC 投与したときの遊離形 aflibercept のノンコンパートメント解析による PK パラメータを算出し、用量比例性についても検討した（図 3）。血液を投与前（0）、投与後 45、90、180 及び 360 分、24、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採取した。ノンコンパートメント解析による PK パラメータを表 5に示す。PK に性差はみられなかった。

表 5 - ラットに 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD）

投与経路	**SC**	**SC**	**SC**	**SC**
例数 *a*	10 (5/5)	10 (5/5)	9 (4/5)	10 (5/5)
用量 (mg/kg)	0.75	1.5	5	15
C_{max} (µg/mL)	1.9 ± 0.5	4.6 ± 1.7	25.8 ± 8.3	46.6 ± 15.2
C_{max}/用量	2.53	3.07	5.16	3.11
t_{max} (h)	29 ± 10	36 ± 17	45 ± 8	38 ± 12
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	114 ± 31	345 ± 88	2482 ± 676	6024 ± 1975
$AUC_{0-\infty}$/用量	152	230	496	402
$t_{1/2}$ (h)	46 ± 10	32 ± 5	43 ± 9	50 ± 16
間隔 *b* (h)	96 – 168	120 – 168	120 – 168	96 – 168

a　全動物数 (雄 / 雌)
b　$t_{1/2}$ を算出するための回帰に使用した採血時点

図 3 - ラットに 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線（平均 ± SD）



5 mg/kg 用量群を除くと、C_{max} の平均値はほぼ用量に比例していると考えられた。5 mg/kg 群での平均の C_{max} は、他の用量群で得られた値から比例するよりもわずかに高かった。遊離形 aflibercept の平均の $AUC_{0-\infty}$ 値は、0.75～5 mg/kg 群では、マウスで見られたように、用量比を超えて増加したが、これは恐らく aflibercept が血清中の内因性 VEGF と結合する飽和性のクリアランスに用量依存的な低下が生じたためと考えられる（3.2項参照）。

3.4　カニクイザルにおける IV 及び SC 投与後の aflibercept の PK 評価

雌雄カニクイザルに単回IV及びSC投与したときの遊離形 aflibercept のPKプロファイルについて、用量依存性、バイオアベイラビリティ及び性差を含めて検討した（[Module 4.2.2.2-5: [redacted]-223-3]及び[Module 4.2.2.2-6: [redacted]-223-3comp01]）。血液検体を投与前及び投与後 5、15 及び 30 分（IV 投与のみ）並びに 1、2、4、6、8、10、12、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240、264、288、312 及び 336 時間の 2 週間にわたって採取した。希釈していない血清における LLOQ が 175.5 ng/mL である ELISA を用いて、血清中遊離形 aflibercept 濃度を測定した（表 1及び[Module 4.2.2.1-4: VGFT-AS-01010-SA-01V2]）。ノンコンパートメント解析による PK パラメータ及びプロファイルをそれぞれ表 6及び図 4に示す。PK に性差はみられなかった。

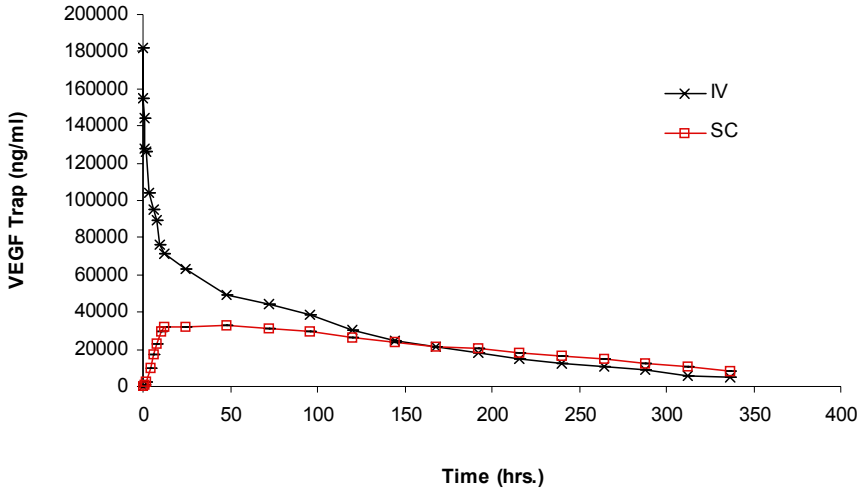
表 6 - サルに 5 mg/kg の用量で単回 IV 又は 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で単回 SC 投与したときの血清中遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均 ± SD）

投与経路	IV	SC	SC	SC	SC
例数 [a]	6 (3/3)	6 (3/3)	6 (3/3)	6 (3/3)	6 (3/3)
用量 (mg/kg)	5	0.75	1.5	5	15
C_{max} (µg/mL)	181.7 ± 46.4	3.7 ± 2.0	6.5 ± 2.6	36.2 ± 13.0	101 ± 20.8
C_{max}/用量	36.4	4.93	4.33	7.24	6.73
t_{max} (h)	0.08	39 ± 25	64 ± 29	40 ± 28	32 ± 24
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	10235 ± 1532	511 ± 217	1089 ± 389	8704 ± 2584	24379 ± 5207
$AUC_{0-\infty}$/用量	2050	681	726	1740	1630
$t_{1/2}$ (h)	98 ± 31	55 ± 18	45 ± 10	118 ± 19	101 ± 39
CL (mL/h/kg)	0.50 ± 0.07	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
V_{ss} (mL/kg)	62 ± 11	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.
F [b] (%)	n.c.	n.c.	n.c.	85	n.c.

略号：n.c. = 算出せず
a　全動物数 (雄 / 雌)
b　$AUC_{0-\infty}$比から算出したバイオアベイラビリティ

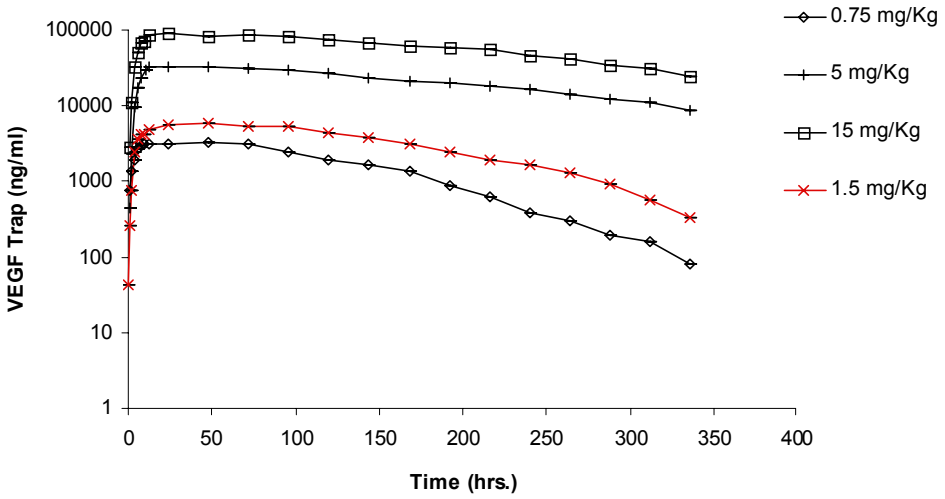
5 mg/kg を単回 IV 投与したとき、血清中遊離形 aflibercept は複数コンパートメントのプロファイルを示した（図 4）。クリアランスは遅く、$t_{1/2}$は長く、分布容積は中央コンパートメントよりわずかに大きかった。血清中遊離形 aflibercept 濃度は、投与後 14 日でもすべての用量群のすべてのサルで検出された。

図 4 - カニクイザルに 5 mg/kg の用量で IV 又は SC 投与したときの遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線



SC 投与したときの遊離形 aflibercept の平均の C_{max} 及び $AUC_{0-\infty}$ 値は、0.75～1.5 mg/kg（低用量範囲）及び 5～15 mg/kg（高用量範囲）で用量にほぼ比例して増加したが、低用量範囲と高用量範囲の間では用量比を超えて増加した。このときの遊離形 aflibercept の平均 $t_{1/2}$ は、高用量範囲と比較して低用量範囲で短かった（図 5）。

図 5 - カニクイザルに 0.75、1.5、5 及び 15 mg/kg の用量で SC 投与したときの遊離形 aflibercept 濃度－時間曲線



Aflibercept をマウス及びラットに単回投与したときに認められた in vivo 動態（3.2項及び3.3項）と同様に、SC 投与時の用量範囲における遊離形 aflibercept の曝露量の用量比例性からの逸脱及び用量

依存的な $t_{1/2}$ から、遊離形 aflibercept の全身クリアランスには、標的分子を介した PK を示す飽和性のクリアランス経路が寄与していることが強く示唆される。

3.5　Aflibercept の反復投与毒性試験における TK 評価

反復投与毒性試験（CTD2.6.6. 3 項）においてラット及びマウスに aflibercept を投与（週 2～3 回投与、最長 13 週）したとき ADA 反応がみられ、aflibercept のクリアランスの増加及び致死的な腎毒性がみられた。このことから慢性及び亜急性毒性試験においてこれらの動物種を用いることはできなかった。一方サルでは ADA 陽性となる割合は、3 か月反復投与試験で 12%、6 か月反復投与試験で 36%程度であり、その割合は投与期間に依存して増加した。6 か月反復投与試験で ADA 陽性となった 14 例中、遊離形及び結合形 aflibercept のクリアランスが増加したのは 2 例であった。以下に薬物動態パラメータに及ぼす免疫原性の影響が少なかったサルにおける 13 週投与試験の TK の結果を示す（[redacted].223.18）。

サルに 3、10 及び 30 mg/kg の用量で週 1 回 30 分間の持続投与を 13 週間繰り返し、遊離形及び結合形 aflibercept の TK を調べた（表 7）。遊離形 aflibercept の曝露量及び結合形 aflibercept 濃度の評価を 1、5、9、11、13 週及び回復期間の 183 日目に行った。

表 7 - カニクイザルにおける遊離形 aflibercept 平均（標準偏差）TK パラメータ

性	用量	C_{max} (µg/mL)		$AUC_{0\text{-}168hs}$ (µg.h/mL)		R_{acc}
	(mg/kg/week)	1 週目	13 週目	1 週目	13 週目	AUC
雄	3 (n=4)	79.8 (24.0)	118 (27.2)	4060 (723)	7000 (1980)	1.77 (0.593)
	10 (n=8)	232 (39.0)	479 (110) a	14500 (2520)	30600 (4520) a	2.01 (0.394) a
	30 (n=8)	973 (156)	1370 (250) a	51200 (6220)	87100 (15900) a	1.77 (0.288) a
雌	3 (n=4)	80.7 (3.12)	150 (29.2) b	4160 (215)	8240 (1380) b	1.95 (0.365) b
	10 (n=8)	227 (38.0)	400 (98.3)	12600 (2250)	24200 (7380)	1.96 (0.668)
	30 (n=8)	791 (138)	1260 (313) c	44600 (5820)	80000 (21300) c	1.80 (0.491) c

有効数値 3 桁、R_{acc}：蓄積率（13 週目の $AUC_{0\text{-}168hs}$／1 週目の $AUC_{0\text{-}168hs}$）、a：n=6、b：n=3、c：n=7
[redacted].223.18 Amended study report の Table 1 を改編

遊離形 aflibercept の曝露量は 3～30 mg/kg/week の範囲で用量に比例して増加した。遊離形 aflibercept の血漿曝露量はいずれの用量においても 1 週目に比べ 13 週目で約 2 倍に増加した。C_{max} と $AUC_{0\text{-}168hs}$ に性差はみられなかった。

表 8 - 2、5 及び 13 週目の投与前におけるカニクイザルの結合形 aflibercept 平均血漿濃度

性	用量	投与前結合形血漿中濃度 (µg/mL)			R_{acc}
	(mg/kg/week)	2 週目	5 週目	13 週目	5 週/2 週
雄	3 (n=4)	2.71	7.85	7.07	2.90
	10 (n=8)	3.53 *	6.92	7.94 *	1.96
	30 (n=8)	3.57	7.01	7.65 *	1.96
雌	3 (n=4)	2.92	6.91	8.11	2.37
	10 (n=8)	2.92	8.58	7.35	2.94
	30 (n=8)	3.69	7.41	8.24 *	2.01

有効数値 3 桁、R_{acc}：蓄積率（5 週目の濃度／2 週目の濃度）、*： n=7

表 8に 2、5 及び 13 週目の aflibercept 投与前における結合形 aflibercept 平均血漿濃度を示す。結合形 aflibercept濃度はいずれの週においても用量に依存せず類似していることから、低用量（3 mg/kg/week）においても、初回投与からリガンドへの結合が飽和していることが示唆された。aflibercept 投与前の結合形 aflibercept 濃度は、投与量に依存せず 2 週目と比べて 5 週目で約 2 倍になり、その後は 13 週目まで変わらなかった。また、性差はみられなかった。

4　分布

血清中濃度－時間推移から推測されるように、マウス、ラット及びサルに IV 投与後の aflibercept は複数コンパートメントの分布を示した。対応する分布容積から説明されるように、このことは、分子量の大きい蛋白医薬品に典型的な細胞外液への限られた分布を反映していると考えられる。ラットに ^{125}I-aflibercept を IV 投与したときの組織分布から、分布は主として循環血中に限定された。蛋白医薬品であることから予測されたように、組織内放射能は肝臓で最も高く、次いで他の血流量の多い組織で高かった（4.1項）。

4.1　ラットに IV 投与後の aflibercept の分布

^{125}I-aflibercept を IV 投与後の体内分布を、雌の Sprague Dawley ラットを用いて検討した（[Module 4.2.2.3-1: VGFT-PK-01005-2]）。^{125}I-aflibercept を HPLC で分析した結果、^{125}I-aflibercept は単一のピークとして、非標識 aflibercept と同程度の保持時間（放射測定及び非放射測定により測定）で溶出することが示された。ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いた追加分析から、^{125}I-aflibercept は非標識 aflibercept と同様に泳動することが示された。^{125}I-aflibercept を添加し、総放射活性を 100357 cpm/μL（ガンマシンチレーションカウンターにより測定）、総 aflibercept 濃度を 1.96 mg/mL（ELISA 分析により測定）とした投与液を用いて、雌ラット（各時点で n = 3）に aflibercept1 mg/kg を単回 IV 投与した。投与後 5、15 及び 45 分、並びに 1.5、3、6、24、48、72、120 及び 168 時間に全採血による血液検体を採取し、次いで 30 U/mL ヘパリンを含む 10%ヘパリン加生理食塩水で血管灌流を行った。その後、腎臓、肝臓、肺、脾臓、心臓、小腸、大腸、結腸、皮下脂肪、大腿筋、甲状腺及び副腎を採取して重量を測定し、ガンマカウンターで放射能を直接測定した。血清検体はトリクロロ酢酸を加えて除蛋白した後、遠心分離し、ガンマシンチレーションカウンターで放射能を測定した。さらに、希釈していない血清における LLOQ が 7.75 ng/mL である ELISA を用いて、検体中の aflibercept 濃度を測定した（[Module 4.2.2.1-2: VGFT-AS-00020-SA-01V2]）。

雌ラットに ^{125}I-aflibercept1 mg/kg を単回 IV 投与したとき、投与後 5 分における血清中 aflibercept 濃度（放射能の当量濃度）は ELISA で測定した同時点における濃度よりも著しく低かった。さらに、総放射能の PK パラメータは非標識 aflibercept の PK パラメータと大きく異なっていた（表 9）。

表 9 - ラットに ^{125}I-aflibercept 1 mg/kg を単回 IV 投与したときの遊離形 aflibercept 及び総放射能の平均血清中 PK パラメータ推定値

PK パラメータ推定値	ELISA	放射能
C_{max} (µg/mL)	27.6 ± 4.3	17.0 ± 0.6
$AUC_{0-\infty}$ (µg·h/mL)	440 ± 22	255 ± 36
$t_{1/2}$ (h)	26 ± 7	46 ± 10
CL (mL/h/kg)	2.28 ± 0.11	3.98 ± 0.60
V_{ss} (mL/kg)	41 ± 1	163 ± 40
MRT (h)	18 ± 0	31 ± 3

非標識 aflibercept と比較して、ラットにおいて総放射能はほぼ 2 倍の速度で消失し、V_{ss} は 4 倍大きく、$t_{1/2}$ 及び MRT はいずれも 2 倍長かった。このことから、放射能の分布は非標識 aflibercept の分布をそのまま表すものではないことが示唆された。投与後 5 分では総投与放射能の約 75%が血清中に認められ、投与後 24 時間では、血清中の放射能は投与量の 12.3%まで減少した。投与後 168 時間には、血清中に残存する放射能は総投与放射能の 0.76%のみとなった。組織内放射能はクリアランスに関わる臓器及びその他の血流量の多い組織で最も高かった。投与後 5 分では、肝臓、腎臓、脾臓、肺及び心臓にそれぞれ総投与放射能の約 11.4%、1.33%、0.42%、0.34%及び 0.19%が認められた（表 10）。血清中放射能の減少に続いて組織内放射能も減少し、投与後 168 時間には、肝臓で検出される放射能は総投与放射能の 0.16%のみとなった。これらの結果から、aflibercept の分布は大部分が循環血中に限定され、組織内で著しく蓄積する可能性は低いことが示唆された。

表 10 - ラットに ^{125}I-aflibercept1 mg/kg を単回 IV 投与したときの
投与後 5 分における組織内総放射能

臓器／組織	投与量に対する割合（%）
心臓	0.19
肺	0.34
肝臓	11.42
腎臓	1.33
副腎	0.02
脾臓	0.42
小腸	0.04
大腸	0.04
結腸	0.01
皮下脂肪	0.04
大腿筋	0.02
甲状腺	0.03

5　代謝（動物種間の比較）

Aflibercept は蛋白質であるため、代謝試験は実施しなかった。しかし、他の分子量の大きい蛋白質と同様に、遊離形及び結合形 aflibercept のいずれについても、蛋白質分解による非飽和性の異化過程によって代謝されると考えられる。

6　排泄

マウス、ラット又はカニクイザルに単回 SC 投与したとき、遊離形 aflibercept は標的を介した消失の特徴である非線形の PK を示した。遊離形 aflibercept のクリアランスは 0.5～3.5 mL/h/kg であった。消失半減期は 2 日（マウス）から 5 日（サル）であった（[Module 2.6.5 表 2.6.5.2]）。標的分子を介する PK を示す薬剤で一般的にみられるように、閾値レベルを下回る濃度において得られた終末半減期は、中央コンパートメントにおける標的（内因性 VEGF）の生成速度を反映している。循環血中に遊離形 aflibercept が存在しない、より高い濃度における結合形 aflibercept の消失半減期はマウスで約 7 日であり、遊離形 aflibercept の消失半減期（約 1～2 日）よりもかなり長かった。サルを用いた反復投与毒性試験では、結合形 aflibercept は最終投与 3 カ月後でも血漿中に残存していた。サルを用いた 13 週間毒性試験において、定常状態及び最終投与 3 カ月後における結合形 aflibercept 濃度を比較したところ（[Module 2.6.7 表 2.6.7.3]）、結合形 aflibercept の消失半減期は概算で約 20 日と推定された（表 11）。

表 11 - サルを用いた毒性試験における結合形 aflibercept 濃度から推定した結合形 aflibercept の消失半減期

試験	濃度測定時点	投与回数	結合形 aflibercept 濃度 (µg/mL)		
			3 mg/kg/週 コホート	10 mg/kg/週 コホート	30 mg/kg/週 コホート
13 週間毒性試験 ([redacted]223-18)	85 日（最終投与）	13	7.59	7.62	7.94
	183 日（回復期間）	-	NR[a]	0.28	0.51
	$t_{1/2}$（日）[b]		-	19.1	23.0
3 カ月間毒性試験 (670144)	85 日（最終投与）	13	5.58	-	3.95
	24 週	-	0.311	-	0.652
	$t_{1/2}$（日）[b]		16.6		26.5

a　NR= 回復期間なし

b　$t_{1/2}$ の値は以下の式を用いて推定した：$t_{1/2}$（日）= 0.693 × 投与間隔（日）/ Ln(C_0 / C)

Aflibercept の腎排泄を評価するため、腎摘出（腎血流を結紮により遮断することによる機能的摘出）雌ラット及びシャムオペ雌ラットに aflibercept 1 mg/kg を単回 IV 投与し、血清中 aflibercept 濃度を投与後 10 時間にわたって測定した（[Module 4.2.2.5-1: VGFT-PK-01004-2]）。希釈していない血清における LLOQ が 7.8 ng/mL である ELISA を用いて、血清検体中の遊離形 aflibercept 濃度を測定した（[Module 4.2.2.1-2: VGFT-AS-00020-SA-01V2]）。各ラットに aflibercept 1 mg/kg を単回 IV 投与し、投与前並びに

投与後 5、15、45、90、180、240、360、480 及び 600 分に血液検体を採取した。遊離形 aflibercept の曝露量に関する主な指標（C_{max}、t_{max}、AUC 及び $t_{1/2}$）を比較した結果、腎摘出ラット及びシャムオペ対照ラットとの間に明らかな差はなかった。このことから、aflibercept の腎排泄はわずかであることが示唆された（表 12）。

表 12 - シャムオペラット及び腎摘出ラットに aflibercept1 mg/kg を
単回 IV 投与したときの、遊離形 aflibercept の PK パラメータ（平均値 ± SD）

PK パラメータ推定値	シャムオペ	腎摘出
動物数	7	10
最初の時点における C_{max} (µg/mL)	27.26 ± 4.82	26.86 ± 3.52
t_{last} (h)	10 ± 0	10 ± 0
C_{last} (µg/mL)	11.46 ± 1.23	11.27 ± 0.96
AUC_{all} (µg·h/mL)	163.68 ± 14.17	163.74 ± 17.32

7　薬物動態学的薬物相互作用

動物を用いた薬物相互作用試験は実施しなかった。

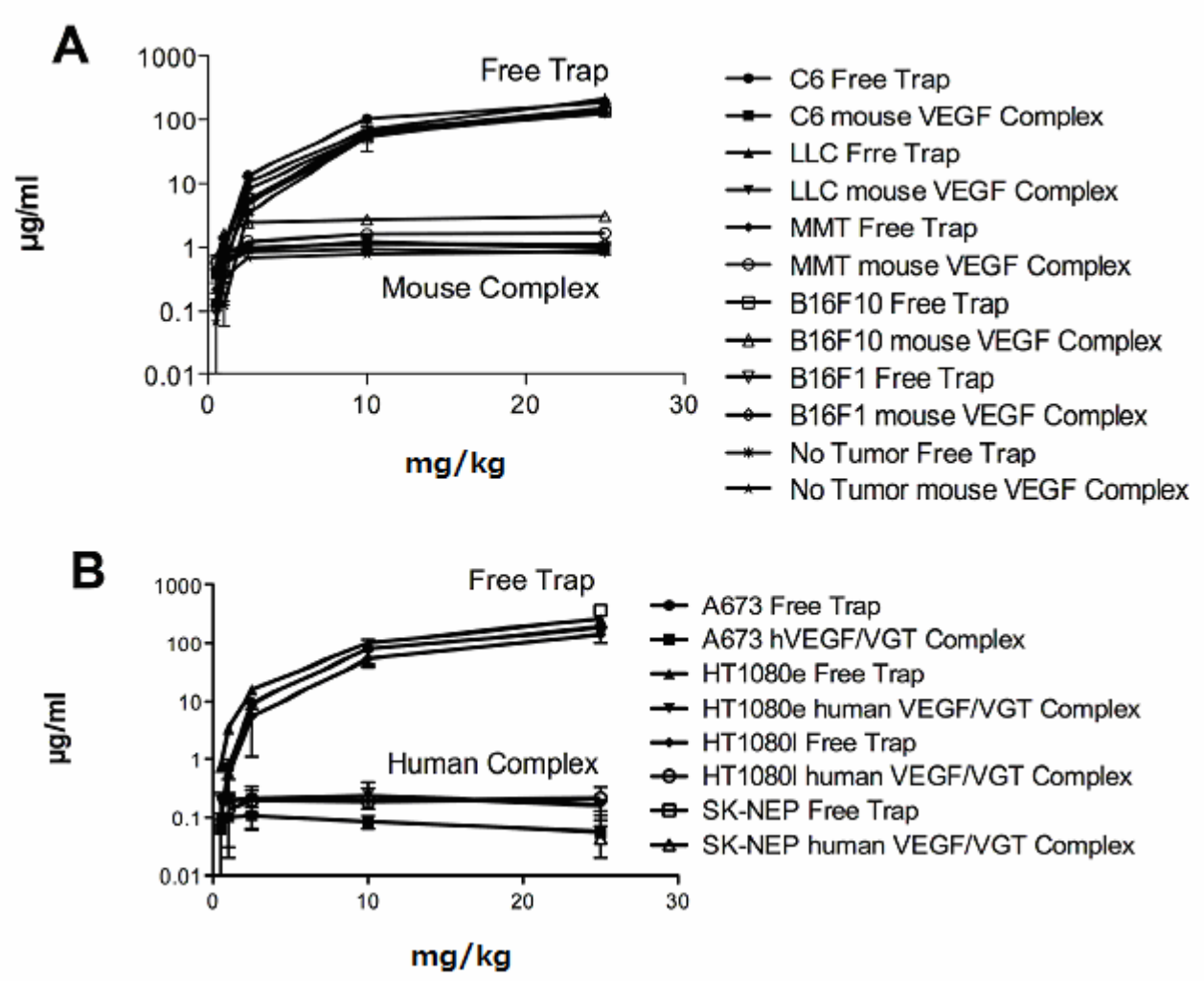
8　その他の薬物動態試験

8.1　種々の担癌マウスモデルにおける PK／PD 評価

マウス VEGF-aflibercept 結合体及びヒト VEGF-aflibercept 結合体の形成に関して、ヒト及びマウス腫瘍を皮下に移植した担癌 SCID マウス（各用量 n＝6）を用いて評価した（[Module 4.2.2.2-2: VGT-NC-004]）。ヒト腫瘍を移植したマウスでは、ヒト VEGF-aflibercept 結合体を測定することにより、内因性 VEGF に対するヒト腫瘍由来の VEGF の寄与を推定した（図 6）。マウス腫瘍（図 6A）又はヒト腫瘍（図 6B）を腫瘍容積として約 100 mm^3 に増殖させた後、aflibercept を 0.5、1、2.5、10 及び 25 mg/kg の用量で 1～2 週間、週 2 回 SC 投与した。腫瘍容積の減少は aflibercept の投与量と関連していた（図 7）。試験終了時に、マウス VEGF-aflibercept 結合体及びヒト VEGF-aflibercept 結合体、並びに遊離形 aflibercept の血清中濃度を測定した。

最終的な腫瘍容積に関わらず、すべての投与コホートにおいて遊離形 aflibercept 濃度は投与量とともに徐々に上昇した。遊離形 aflibercept の血清中濃度（投与 3 日後に測定）は、2.5 mg/kg 以上の用量で結合形濃度を上回り、25 mg/kg の用量で約 100 µg/mL の濃度に達した。マウス VEGF-aflibercept 結合形濃度は投与量の増加とともに 1～2 µg/mL（2.5 mg/kg 投与時）まで上昇した後、投与量の増加に関わらず一定となった。ヒト腫瘍を移植したマウスにおけるヒト VEGF-aflibercept 結合形濃度は、投与量に関わらず約 0.1 µg/mL であった。非担癌マウスにおいても、結合形 aflibercept の定常状態における血清中濃度は 1～2 µg/mL に達したことから、腫瘍移植マウスにおける腫瘍由来の VEGF は体内の総 VEGF 又は循環血中の VEGF のごく一部分にすぎないことが示唆される。用量 2.5 mg/kg における結合形 aflibercept の消失半減期は約 7 日であった。

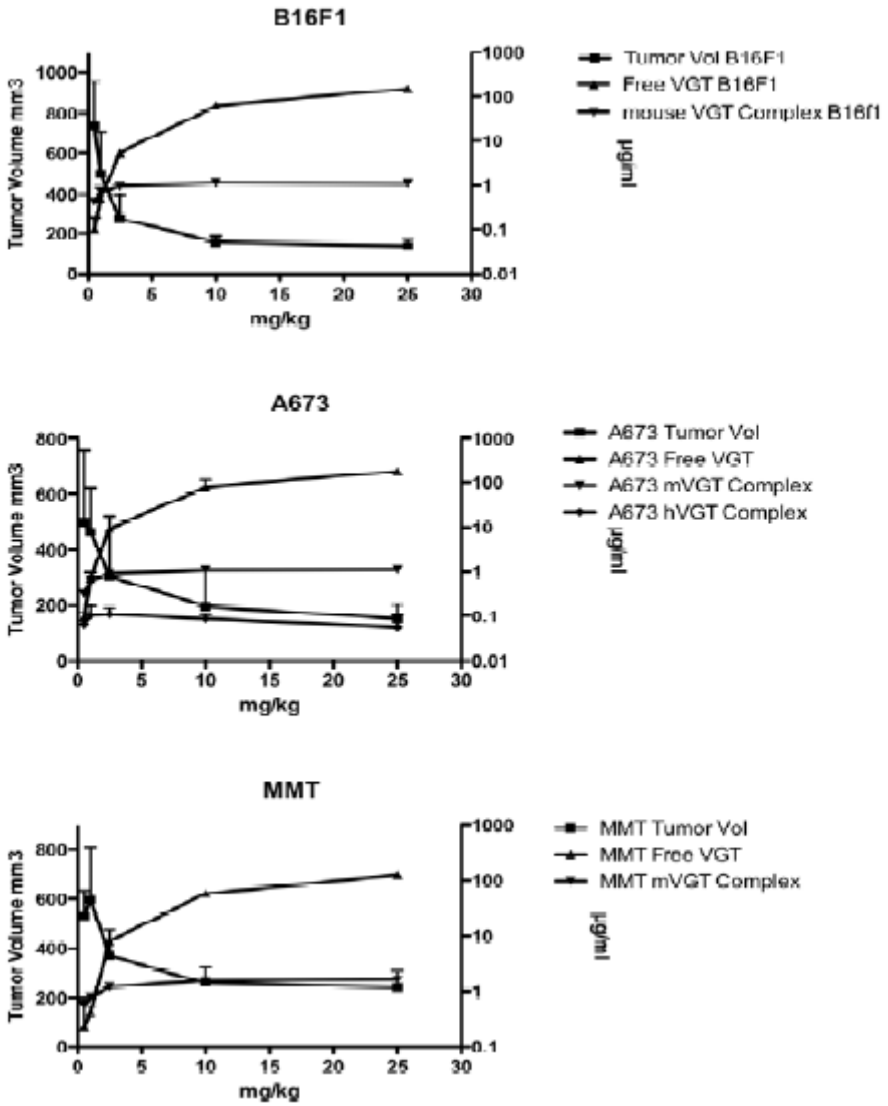
図 6 - 担癌 SCID マウスに aflibercept を 0.5、1、2.5、10 又は 25 mg/kg の用量で 1～2 週間、週 2 回 SC 投与したときの遊離形及び結合形 aflibercept の血清中濃度（A：マウス腫瘍、B ヒト腫瘍）



投与前に約 100 mm^3 に増殖した B16F1 マウス黒色腫、A673 ヒト横紋筋肉腫及び MMT マウス乳癌（図 7）を保有するマウスに、aflibercept を 0.5～25 mg/kg の用量で週 2 回投与した。Aflibercept を 2.5 mg/kg 以上の用量で投与した結果、マウス VEGF-aflibercept 結合体の濃度は約 1～2 µg/mL の定常状態となった。2.5 mg/kg を投与したとき、循環血中の遊離形 aflibercept 濃度は約 10 µg/mL に達し、この濃度は結合形 aflibercept 濃度の約 5～10 倍高かった。Aflibercept を 25 mg/kg の用量で投与したとき、遊離形 aflibercept 濃度は約 100 µg/mL に上昇した。0.5 及び 1 mg/kg の用量では腫瘍容積の減少はごくわずかであったが、2.5 mg/kg 以上の用量では腫瘍容積の著しい減少が認められ、その時の遊離形 aflibercept 濃度は定常状態の結合形濃度を上回っていた。Aflibercept を 2.5、10 及び 25 mg/kg の用量で投与したときの遊離形 aflibercept 濃度は、おおむね用量に依存して増加した。また 2.5、10 及び 25 mg/kg の用

量で投与したときの遊離形濃度は投与後それぞれ 7、9 及び 17 日に、結合形濃度よりも低濃度となった。

図 7 - 腫瘍容積、投与量並びに循環血中の遊離形及び結合形 aflibercept 濃度の関係



8.2　PK パラメータとシアル酸含有量との相関関係

Aflibercept はロット間によりシアル酸含有量が異なる。そこで in vivo においてシアル酸含有量の差が aflibercept の生物学的有効性にどの程度影響を及ぼすかを調べるため、ラットを用いた PK 試験を実施し、検討した（[Module 4.2.2.7-1: PK06005-9]）。

試験にはシアル酸付加の度合いが異なる 10 ロットの aflibercept を用いた：二量体あたり 4.6～11.5 のシアル酸残基［1 糖鎖あたりの平均シアル酸含有量（Z 数）は 0.6～1.2］。サイズ排除 HPLC で分析した結果、いずれのロットも aflibercept の純度は 97.8%以上（主ピークの百分率）であった。また、in vitro において生物学的測定法又は VEGF 結合測定法を用いて aflibercept の活性を測定した結果、明らかな違いは認められなかった。雌の Sprague Dawley ラットに 5 mg/kg の用量で単回 IV ボーラス投与した後、2 週間にわたって血液検体を採取し、血清中遊離形 aflibercept 濃度を測定後、ノンコンパートメント解析により PK パラメータを算出した。

10 ロットのうち 7 ロット（Z 数：0.98～1.2）では、$t_{1/2}$、AUC、V_z、クリアランス又は MRT に違いは認められなかった。一方、残りの 3 ロット（Z 数：0.6～0.9）では、aflibercept の曝露量（AUC 及び MRT）はシアル酸付加の度合いと相関し、シアル酸付加の度合いが減少すると曝露量が減少した（クリアランスは増加）。これら 3 ロットでは、終末相における分布容積（V_z）は Z 数と逆相関した。

以上本 PK 試験の結果から、ロット間によるシアル酸付加の程度は aflibercept の活性又は純度に影響を及ぼさなかったが、遊離形 aflibercept の曝露量に影響（Z 数がある閾値未満の場合は減少）を及ぼす可能性があることが示された。なお、Z 数が 0.9 以上のロットでは、PK の差はわずかであると予測された。

9　免疫原性

毒性試験の一部として血清中の ADA レベルを測定し、それらの抗体が aflibercept のクリアランス及び安全性に及ぼす影響について評価した（[2.6.6 8.3 項]）。

10　考察及び結論

Aflibercept を IV 及び SC 投与したときの遊離形及び結合形 aflibercept（VEGF-aflibercept 複合体）の PK を、薬理試験及び毒性試験で使用した動物種（マウス、ラット及びサル）で検討した。毒性（TK）試験及び薬物動態／薬力学（PK/PD）試験の一部として薬物曝露量を測定し、安全性及び有効性に関する所見と薬物曝露量との関係を評価した。

マウス、ラット及びサルに IV 及び SC 投与したときの遊離形 aflibercept の PK パラメータはいずれの種においても類似しており、性差は認められなかった。IV 投与したとき、aflibercept の分布容積は中央コンパートメントの容積よりもわずかに大きかった。いずれの種においても、aflibercept の $t_{1/2}$ は長く、クリアランスは緩徐であり投与量の増加とともに減少した。単回 IV 及び SC 投与したとき、遊離形 aflibercept 濃度は最終採血時点（ラットとマウスで投与後 7 日、サルで投与後 14 日）においても検出可能であった。

マウス、ラット及びサルに複数の用量レベルで SC 投与したとき、遊離形 aflibercept の曝露量プロファイル（AUC 及び C_{max}）は線形ではなかった。これらの結果は、aflibercept の全身クリアランスが飽和性の要素を含むことを示唆しており、内因性 VEGF プールに aflibercept が結合することと関連している可能性がある。Aflibercept と VEGF との結合が飽和する以前の、より低い用量では、遊離形 aflibercept が VEGF と結合し結合形 aflibercept を形成することにより、遊離形 aflibercept の循環血中からの消失が促進される可能性がある。これらの単回投与試験における遊離形 aflibercept の比較的速いクリアランスと標的分子を介した PK プロファイルには、内因性 VEGF の持続的な産生がおそらく寄与している。

ラットに SC 投与後の C_{max} は、5 mg/kg 投与群を除くすべての用量群でほぼ用量に比例して増加したが、5 mg/kg 投与群では用量比をやや上回って増加した。AUC 推定値は 0.75～1.5 mg/kg（低用量範囲）及び 5～15 mg/kg（高用量範囲）で用量に比例して増加した。マウスに SC 投与後の C_{max} 及び AUC 値は、0.5～2.5 mg/kg（低用量範囲）及び 10～25 mg/kg（高用量範囲）で用量に比例して増加した。サルに SC 投与後の C_{max} 及び AUC 値は、0.75～1.5 mg/kg（低用量範囲）及び 5～15 mg/kg（高用量範囲）で用量に比例して増加した。低用量範囲と高用量範囲の間で比較したときに認められた曝露量の増加は、ラットでは AUC の増加が用量比を上回り、マウス及びサルでは C_{max} 及び AUC 両方の増加が用量比を上回っていた。観察された用量比例性からの逸脱は、遊離形 aflibercept の $t_{1/2}$ の用量依存性に反映されており、低用量範囲と比較して高用量範囲では $t_{1/2}$ は延長した。

SC 投与時の aflibercept のバイオアベイラビリティは、マウス、ラット及びサルにおいてそれぞれ 94%、33%及び 85%であった。

ラットに ^{125}I-aflibercept1 mg/kg を単回 IV 投与したときの総放射能の分布は主に循環血中に限定された。組織内放射能は肝臓で最も高く、次いで腎臓、肺及び脾臓を含むその他の血流量の多い組織で高かった。組織内放射能は投与後 7 日目でほぼ完全に消失した。しかしながら、ELISA で測定した血清

中の遊離形 aflibercept 濃度から得られた aflibercept の PK 特性は、放射能の当量濃度から得られた PK 特性と大きく異なったため、これらのデータはある程度注意して解釈しなければならない。

腎摘出ラットにおける aflibercept の曝露量は、腎摘出のシャムオペ対照動物と同程度であった。このことから、ラットにおける aflibercept のクリアランスに腎排泄は寄与しないことが示された。

ヒト及びマウス腫瘍（B16F1 マウス黒色腫、A673 ヒト横紋筋肉腫及び MMT マウス乳癌）を皮下に移植した担癌 SCID マウスでは、大量の内因性 VEGF が結合（不活性化）することによって最大の抗腫瘍効果が得られた。遊離形 aflibercept 濃度が結合形 aflibercept 濃度を超え、用量依存的に上昇し続けたことに加え、結合形 aflibercept の濃度推移がプラトーになったこと、結合形 aflibercept 濃度が用量依存的に上昇しなかったことによって、内因性 VEGF が aflibercept にほぼ完全に結合したことが示された。

要約すると、aflibercept は循環血中において $t_{1/2}$ が長く、IgG1 融合蛋白質の特徴を持ち、蛋白質分解や内因性 VEGF への飽和性の結合を含む複数のメカニズムによって消失することが示された。高濃度の遊離形 aflibercept が存在するとき、結合形 aflibercept 濃度がプラトーに達することから、aflibercept の抗腫瘍活性はすべての内因性 VEGF をトラップすることにより持続的な VEGF の不活性化を引き起こすものと考えられた。

参 考 文 献

該当なし

サノフィ株式会社

ザルトラップ点滴静注 100mg／同 200mg

CTD 第二部 ー 非臨床概要

2.6.5 薬物動態試験概要表

Total number of pages: 25

目　　次

略号と用語の定義 **4**

1　薬物動態試験ー覧表 **5**

2　薬物動態試験ー分析法及びバリデーション試験 **7**

3　薬物動態試験ー単回投与後の吸収 **8**

4　薬物動態試験ー反復投与後の吸収 **12**

5　薬物動態試験ー分布 **13**

6　薬物動態試験ータンパク結合 **14**

7　薬物動態試験ー妊娠または授乳動物における試験 **15**

8　薬物動態試験ーその他の分布試験 **16**

9　薬物動態試験ーIn vivo における代謝 **17**

10　薬物動態試験ーIn vitro における代謝 **18**

11　薬物動態試験ー推定代謝経路 **19**

12　薬物動態試験ー薬物代謝酵素の誘導/阻害 **20**

13　薬物動態試験ー累積排泄 **21**

14　薬物動態試験ー胆汁中排泄 **22**

15　薬物動態試験ー薬物相互作用 **23**

16　薬物動態試験ーその他 **24**

図 表 目 次

表 2.6.5.1 薬物動態試験ー覧表 5
表 2.6.5.2 薬物動態試験ー分析法及びバリデーション試験 7
表 2.6.5.3 薬物動態試験ー単回投与後の吸収 8
表 2.6.5.5 薬物動態試験ー分布 13
表 2.6.5.16 薬物動態試験ーその他（続き） 25

略号と用語の定義

AUC	血漿中（又は血清中）濃度－時間曲線下面積（Area under the plasma (or serum) concentration time curve calculated by the linear trapezoidal rule and extrapolated to infinity）
CL	血漿（又は血清）クリアランス Plasma (or serum) clearance
C_{last}	t_{last} 時点での濃度（Concentration corresponding to t_{last}）
C_{max}	最高血漿中（又は血清中）濃度（Maximum plasma (or serum) concentration observed）
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）
F	絶対的バイオアベイラビリティ（Absolute bioavailability）
IV	静脈内（Intravenous）
MRT	平均滞留時間（Mean Residence Time）
PD	薬力学（Pharmacodynamic）
PK	薬物動態（Pharmacokinetic）
SC	皮下（Subcutaneous）
SCID	重症複合免疫不全（Severe combined immunodeficient）
t_{max}	最初の C_{max} 到達時間（First time to reach Cmax）
$t_{1/2}$	終末相半減期（Terminal half life）
VEGF	血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor）
VEGF Trap	aflibercept、AVE0005
V_{ss}	定常状態での分布容積（Volume of distribution at steady-state）
V_z	分布容積（Volume of distribution）

1　薬物動態試験一覧表

表 2.6.5.1 薬物動態試験一覧表

Test Article: aflibercept

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Absorption					
Pharmacokinetics in mice	CD-1 mice	SC, IV	[redacted]	[VGFT-PK-01007-3]	4.2.2.2-1
Pharmacokinetics in rats	Sprague Dawley	SC, IV	[redacted]	[VGFT-PK-01001-2]	4.2.2.2-3
Pharmacokinetics in rats	Sprague Dawley	SC	[redacted]	[VGFT-PK-01002-3]	4.2.2.2-4
Pharmacokinetics in monkeys	Cynomolgus monkeys	SC, IV	[redacted] USA	[redacted]223-3] and [redacted]223-3comp01]	4.2.2.2-5 4.2.2.2-6
Distribution					
Biodistribution in rats	Sprague Dawley	IV	[redacted]	[VGFT-PK-01005-2]	4.2.2.3-1
Metabolism					
Not applicable					
Elimination and Excretion					
Elimination in nephrectomized rats	Sprague Dawley	IV	[redacted]	[VGFT-PK-01004-2]	4.2.2.5-1
Drug Interactions					
Not applicable					
Other					
PK and PK/PD in SCID tumor bearing mice	C57bl6 and SCID	SC	[redacted]	[VGT-NC-004]	4.2.2.2-2
Correlation in C57bl6 between PK and sialic	Sprague-Dawley	IV	[redacted]	[PK06005-9]	4.2.2.7-1

Abbreviations: SC: subcutaneous; IV: intravenous; PK: pharmacokinetics; PD: pharmacodynamics

2　薬物動態試験－分析法及びバリデーション試験

表 2.6.5.2 薬物動態試験－分析法及びバリデーション試験

Test Article: aflibercept

Type of Study	Matrix	Testing Facility		Validation Report Number	Location
Quantitative Assay					
Validation of the assay of free Aflibercept	Mouse serum	[redacted]	USA	[VGFT-AS-01006-SA-01V2]	4.2.2.1-1
Validation of the assay of free Aflibercept	Rat serum		USA	[VGFT-AS-00020-SA-01V2]	4.2.2.1-2
Validation of the assay of free Aflibercept	Rabbit plasma		USA	[VGFT-AV-06004-SA-01V2]	4.2.2.1-3
Validation of the assay of free Aflibercept	Monkey serum		USA	[VGFT-AS-01010-SA-01V2]	4.2.2.1-4
Validation of the assay of free Aflibercept	Monkey plasma		USA	[VGFT-AS-03033-SA-01V2]	4.2.2.1-5
Validation of the assay of free Aflibercept	Monkey plasma		USA	[VGFT-AV-03033-PV01-SA-01V1]	4.2.2.1-6
Validation of the assay of bound Aflibercept	Rabbit plasma		USA	[VGFT-AV-06035-SA-01V3]	4.2.2.1-7
Validation of the assay of bound Aflibercept	Monkey plasma		USA	[VGFT-AV-04018-SA-01V1]	4.2.2.1-8
Immunogenicity					
Validation of the anti-Aflibercept antibody assay	Rabbit serum	[redacted]	USA	[VGFT-AV-07019-SA-01V3]	4.2.2.1-9
Validation of the anti-Aflibercept antibody assay	Monkey serum		USA	[VGFT-AS-02042-SA-01V2]	4.2.2.1-10
Validation of the anti-Aflibercept antibody assay	Monkey serum		USA	[VGFT-AS-02042-PV01-SA-01V2]	4.2.2.1-11

3　薬物動態試験－単回投与後の吸収

表 2.6.5.3 薬物動態試験－単回投与後の吸収

Species (strain)	**Mice (CD-1)**				**Rat (Sprague Dawley)**			
Study No.	[VGFT-PK-01007-3]				[VGFT-PK-01001-2]			
No. of Animals	5 M / 4 F		5 M / 5 F		5 M / 5 F		5 M / 5 F	
Feeding Conditions	Fed		Fed		Fed		Fed	
Test Article	Aflibercept		Aflibercept		Aflibercept		Aflibercept	
Vehicle/Formulation	Solution, 0.5 mg/mL		Solution, 0.5 mg/mL		Solution, 2 mg/mL		Solution, 2 mg/mL	
Method of Administration	**IV**		**SC**		**IV**		**SC**	
Dose	1 mg/kg		1 mg/kg		1 mg/kg		1 mg/kg	
Sample Type	Serum		Serum		Serum		Serum	
Analyte	Free Aflibercept		Free Aflibercept		Free Aflibercept		Free Aflibercept	
Analytical method	ELISA		ELISA		ELISA		ELISA	
Gender	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
PK Parameters[a]:								
t_{max} (h)	0.08 ± 0.00	0.98 ± 1.38	24 ± 0	24 ± 0	0.35 ± 0.37	0.22 ± 0.30	24 ± 0	24 ± 0
C_{max} (µg/mL)	20.6 ± 0.8	18.0 ± 3.4	4.87± 0.35	7.43 ± 1.15	20.6 ± 2.3	21.0 ± 2.9	2.03 ± 0.54	3.17 ± 1.17
AUC (µg.h/mL)	320 ± 41	290 ± 35	236 ± 27	341 ± 47	477 ± 29	448 ± 90	130 ± 28	174 ± 56
$t_{1/2}$ (h)	49 ± 8	45 ± 4	38 ± 5	43 ± 3	52 ± 11	55 ± 9	45 ± 9	45 ± 9
CL (mL/h/kg)	3.17 ± 0.45	3.49 ± 0.39	NA	NA	2.10 ± 0.12	2.31 ± 0.46	NA	NA
V_{ss} (mL/kg)	77 ± 19	77± 7	NA	NA	55 ± 8	48 ± 5	NA	NA
F (%)	NA	NA	74	118	NA	NA	27	39
Additional Information: [a] Values are mean ± standard deviation								

Abbreviations: SC: subcutaneous, IV: intravenous, NA: Not Applicable, M: Male, F:Female, AUC: area under the curve extrapolated to infinity, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, t_{max}: first time to reach C_{max}, C_{max}: maximum concentration observed, $t_{1/2}$: terminal half life, CL: plasma clearance, V_{ss}: volume of distribution at steady-state, F (%): AUC SC / AUC IV at the same dose

表 2.6.5.3 薬物動態試験－単回投与後の吸収（続き）

Species (strain)	**Rat (Sprague Dawley)**							
Study No.	[VGFT-PK-01002-3]							
No. of Animals	5 M / 5 F		5 M / 5 F		4 M / 5 F		5 M / 5 F	
Feeding Conditions	Fed		Fed		Fed		Fed	
Test Article	Aflibercept		Aflibercept		Aflibercept		Aflibercept	
Vehicle/Formulation	Solution, 2 mg/mL		Solution, 2 mg/mL		Solution, 25 mg/mL		Solution, 25 mg/mL	
Method of Administration	**SC**		**SC**		**SC**		**SC**	
Dose	0.75 mg/kg		1.5 mg/kg		5 mg/kg		15 mg/kg	
Sample	Serum		Serum		Serum		Serum	
Analyte	Free Aflibercept		Free Aflibercept		Free Aflibercept		Free Aflibercept	
Analytical method	ELISA		ELISA		ELISA		ELISA	
Gender	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
PK Parameters[a]:								
t_{max} (h)	34 ± 13	24 ± 0	43 ± 20	29 ± 11	48 ± 0	43 ± 11	43 ± 11	34 ± 13
C_{max} (µg/mL)	1.97 ± 0.55	1.88 ± 0.54	3.62 ± 0.86	5.64 ± 1.78	19.3 ± 1.8	30.9 ± 7.7	36.6 ± 13.1	56.6 ± 9.9
AUC (µg.h/mL)	130 ± 25	96.8 ± 28.5	314 ± 76	375 ± 96	1982 ± 338	2881 ± 615	5016 ± 2229	7032 ± 1126
$t_{1/2}$ (h)	45 ± 7	47 ± 13	31 ± 8	32 ± 2	39 ± 7	46 ± 10	53 ± 21	46 ± 11
CL (mL/h/kg)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V_{ss} (mL/kg)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F (%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Additional Information: [a] Values are mean ± standard deviation								

Abbreviations: SC: subcutaneous, NA: Not Applicable, M: Male, F: Female, AUC: area under the curve extrapolated to infinity, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, t_{max}: first time to reach C_{max}, C_{max}: maximum concentration observed, $t_{1/2}$: terminal half life, CL: plasma clearance, V_{ss}: volume of distribution at steady-state, F(%): AUC SC / AUC IV at the same dose

表 2.6.5.3 薬物動態試験ー単回投与後の吸収（続き）

Species (strain)	**Cynomolgus monkey**							
Study No.	[[redacted]223-3] and [[redacted]223-3comp01]							
No. of Animals	3 M / 3 F		3 M / 3 F		3 M / 3 F		3 M / 3 F	
Feeding Conditions	Fed		Fed		Fed		Fed	
Test Article	Aflibercept		Aflibercept		Aflibercept		Aflibercept	
Vehicle/Formulation	Solution, 25 mg/mL		Solution, 25 mg/mL		Solution, 25 mg/mL		Solution, 25 mg/mL	
Method of Administration	**SC**		**SC**		**SC**		**SC**	
Dose	0.75 mg/kg		1.5 mg/kg		5 mg/kg		15 mg/kg	
Sample	Serum		Serum		Serum		Serum	
Analyte	Free Aflibercept		Free Aflibercept		Free Aflibercept		Free Aflibercept	
Analytical method	ELISA		ELISA		ELISA		ELISA	
Gender	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**	**Male**	**Female**
PK Parameters[a]:								
t_{max} (h)	35 ± 22	43 ± 32	72 ± 42	56 ± 14	44 ± 30	36 ± 32	19 ± 8	44 ± 30
C_{max} (µg/mL)	4.34 ± 1.79	2.96 ± 2.22	5.98 ± 2.96	7.00 ± 2.80	32.7 ± 8.8	39.8 ± 17.5	112 ± 6	89.9 ± 25.8
AUC (µg.h/mL)	599 ± 259	423 ± 165	1061 ± 520	1117 ± 325	8084 ± 1525	9324 ± 3635	25919 ± 6428	22839 ± 4400
$t_{1/2}$ (h)	51 ± 18	59 ± 21	48 ± 14	41 ± 5	116 ± 26	120 ± 14	90 ± 49	113 ± 32
CL (mL/h/kg)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V_{ss} (mL/kg)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
F (%)	NA	NA	NA	NA	79	91	NA	NA
Additional Information: [a] Values are mean ± standard deviation								

Abbreviations: SC: subcutaneous, NA: Not Applicable, M: Male, F: Female, AUC: area under the curve extrapolated to infinity, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, t_{max}: first time to reach C_{max}, C_{max}: maximum concentration observed, $t_{1/2}$: terminal half life, CL: plasma clearance, V_{ss}: volume of distribution at steady-state, F (%): AUC SC / AUC IV at the same dose

表 2.6.5.3 薬物動態試験ー単回投与後の吸収（続き）

Species (strain)	Cynomolgus monkey		Sprague Dawley rats, sham-operated rats	Sprague Dawley rats, nephrectomized rats
Study No.	[[redacted]223-3] and [[redacted]223-3comp01]		[VGFT-PK-01004-2]	[VGFT-PK-01004-2]
No. of Animals	3 M / 3 F		7	10
Feeding Conditions	Fed		Fed	Fed
Test Article	Aflibercept		Aflibercept	Aflibercept
Vehicle/Formulation	Solution, 25 mg/mL		Solution, 2 mg/mL	Solution, 2 mg/mL
Method of Administration	IV		IV	IV
Dose	5 mg/kg		1 mg/kg	1 mg/kg
Sample	Serum		Serum	Serum
Analyte	Free Aflibercept		Free Aflibercept	Free Aflibercept
Analytical method	ELISA		ELISA	ELISA
Gender	Male	Female	Female	Female
PK Parameters[a]:				
t_{max} (h)	0.08	0.08	0.083	0.083
C_{max} (µg/mL)	218 ± 25	145 ± 27	27.3 ± 4.8	26.9 ± 3.5
C_{last} (µg/mL)[b]	NA	NA	11.5 ± 1.2	11.3 ± 1.0
$AUC_{(0\text{-}10h)}$ (µg.h/mL)	NA	NA	164 ± 14	164 ± 17
AUC (µg.h/mL)	10249	10221 ± 2075	NA	NA
$t_{1/2}$ (h)	85 ± 16	111 ± 40	17 ± 10	11 ± 3
CL (mL/h/kg)	0.49 ± 0.06	0.50 ± 0.10	NA	NA
V_{ss} (mL/kg)	60 ± 2	65 ± 17	NA	NA
Additional Information: [a] Values are mean ± standard deviation ; [b]: Clast is measured 10 hours after IV administration				

Abbreviations: IV: intravenous, NA: Not Applicable, M: Male ; F: Female, AUC: area under the curve extrapolated to infinity, C_{last}: concentration corresponding to t_{last}, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, t_{max}: first time to reach C_{max}, C_{max}: maximum concentration observed, $t_{1/2}$: terminal half life, CL: plasma clearance, V_{ss}: volume of distribution at steady-state

4　薬物動態試験－反復投与後の吸収

該当なし

5　薬物動態試験－分布

表 2.6.5.5 薬物動態試験－分布

Species (Strain): Sprague Dawley rats
Test Article: Aflibercept
Study Number: [VGFT-PK-01005-2]
No. per Time Point / Gender: 3 females / group
Vehicle / Formulation: solution, 2 mg/mL
Feeding Conditions: Fed
Method of Administration: IV
Sampling Times: pre-dose, 0.083, 0.25, 0.75, 1.55, 3, 6, 24, 48,72, 120, 168 h
Dose: 1 mg/kg
Analytical Method/Substance Analyzed: radioactivity (^{125}I), ELISA

	Mean concentration (µg/mL or µg/g)										
Tissue/Organ:	**0.083 h**	**0.25 h**	**0.75 h**	**1.55 h**	**3 h**	**6 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**120 h**	**168 h**
Serum (radioactivity)	17.0	14.1	13.9	12.2	10.1	7.53	2.81	1.18	0.774	0.410	0.173
Serum (ELISA)	27.3	24.3	22.9	22.4	18.6	16.1	6.27	2.08	0.444	0.0888	0.0287
Liver	3.14	3.86	3.21	2.40	1.28	0.634	0.285	0.159	0.108	0.0764	0.0383
Kidneys	1.43	2.03	1.44	1.51	0.930	0.789	0.306	0.181	0.158	0.0813	0.0443
Spleen	1.38	1.92	1.79	1.49	1.05	0.603	0.283	0.132	0.0983	0.0579	0.0265

Additional Information: Dosing solution is a combination of labelled and unlabelled aflibercept. Radioactivity was measured in serum, heart, lung, liver, kidney, adrenal glands, spleen, small intestine, large intestine, colon, fat pad, thigh muscle and thyroid gland over 168 hours post dose**.** At the first sampling time, the distribution of total radioactivity in liver, kidneys, spleen, lungs and heart was approximately 11.4%, 1.33%, 0.42%, 0.34% and 0.19% of the total dose while the rest of the tissues had less than 0.1% of total dose.

Abbreviations: IV: intravenous, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay

6　薬物動態試験ータンパク結合

該当なし

7　薬物動態試験－妊娠または授乳動物における試験

該当なし

8　薬物動態試験－その他の分布試験

該当なし

9　薬物動態試験－In vivo における代謝

該当なし

10　薬物動態試験－In vitro における代謝

該当なし

11　薬物動態試験－推定代謝経路

該当なし

12　薬物動態試験－薬物代謝酵素の誘導/阻害

該当なし

13　薬物動態試験－累積排泄

該当なし

14　薬物動態試験－胆汁中排泄

該当なし

15　薬物動態試験－薬物相互作用

該当なし

16　薬物動態試験－その他

表 2.6.5.16 薬物動態試験－その他

Species (strain)	**C57bl6 mice**									
Study No.	[VGT-NC-004]									
No. of Animals	30 males									
Feeding Conditions	Fed									
Test Article	Aflibercept (batch # VGTF01002T)									
Vehicle/Formulation	5 mmol/L sodium phosphate, 5 mmol/L sodium citrate, 100mmol/L NaCl, 0.004% polysorbate 20, pH 6.0									
Method of administration	**SC**									
Dose	0.5, 1, 2.5, 10, 25 mg/kg									
Sample	Serum									
Analyte	Free and bound Aflibercept									
Analytical method	ELISA									
Analyte	**Free Aflibercept**					**Bound Aflibercept**				
PK Parameters[a]:										
Dose (mg/kg)	**0.5**	**1.0**	**2.5**	**10**	**25**	**0.5**	**1.0**	**2.5**	**10**	**25**
t_{max} (day)	0.8 ± 0.4	0.81 ± 0.38	0.81 ± 0.38	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	3.0 ± 0.0	5.0 ± 2.3	7.0 ± 0.0	8.0 ± 1.7	13 ± 2
C_{max} (µg/mL)	3.10 ± 1.61	4.50 ± 0.79	11.7 ± 2.2	82.0 ± 49.4	169 ± 16	0.54 ± 0.13	0.77 ± 0.11	1.60 ± 0.84	1.79 ± 0.10	2.04 ± 0.26
AUC (µg.h/mL)	190 ± 108	286 ± 50	989 ± 166	8817 ± 4789	22623 ± 2808	5.76 ± 1.44	9.84 ± 0.48	25.7 ± 19.2	32.4 ± 4.6	44.2 ± 6.7
$t_{1/2}$ (day)	1.36 ± 0.11	1.05 ± 0.12	1.08 ± 0.34	2.53 ± 0.12	2.56 ± 0.17	4.73 ± 0.75	6.21 ± 0.56	6.79 ± 1.04	7.04 ± 0.65	7.73 ± 2.02

[a] Values are mean ± standard deviation

Additional Information: Free aflibercept concentration falling below complex levels at 4 days, 7 days, 9 days and 17 days following administration of 1, 2.5, 10 and 25 mg/kg, respectively.

Abbreviations: SC: subcutaneous, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, t_{max}: first time to reach C_{max}, C_{max}: maximum concentration observed, AUC: area under the curve extrapolated to infinity, $t_{1/2}$: terminal half life

表 2.6.5.16 薬物動態試験－その他（続き）

Species (strain)	**Female Sprague Dawley rats**									
Study No.	[PK06005-9]									
No. of Animals	50 females									
Test Article	Aflibercept (10 different batches with different sialic acid content)									
Vehicle/Formulation	Solution (3.6 – 14.2 mg/mL)									
Method of administration	IV, single dose									
Dose	5 mg/kg									
Sampling times	0, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 25, 48, 73, 98, 120.5, 143, 169, 216, 265, 337 h post dose									
Analyte	Free Aflibercept (serum)									
Analytical method	ELISA									
Batch number	C05003M020	060323QW2	060314QF1	060314QF2	060314QF3	060314QF4	060314QF5	060323QMP	C05003M049	C05003M39
Sialic acid*	**8.5**	**4.6**	**6.7**	**8.5**	**9.3**	**11.2**	**11.5**	**9.1**	**9.2**	**9.1**
Z number **	**0.98**	**0.6**	**0.8**	**0.9**	**1.0**	**1.2**	**1.2**	**1.1**	**0.98**	**1.2**
Concentration (mg/mL)	12.2	14.2	7.4	9.5	10.4	9.1	9.1	10.6	3.6	10
PK Parameters [a]:										
t_{max} (h)	0.20 ± 0.18	0.10 ± 0.02	0.29 ± 0.20	0.43 ± 0.38	0.33 ± 0.38	0.28 ± 0.21	0.27 ± 0.15	0.21 ± 0.17	0.19 ± 0.18	0.20 ± 0.18
C_{max} (µg/mL)	88.7 ± 10.2	105.6 ± 23.2	58.8 ± 8.9	83.3 ± 30.0	93.6 ± 33.6	90.4 ± 17.3	78.7 ± 27.1	124 ± 28	119 ± 6	128 ± 13
AUC (µg.h/mL)	2362 ± 432	504 ± 98	785 ± 136	1643 ± 607	2010 ± 706	2115 ± 447	2564 ± 637	3732 ± 970	2892 ± 193	3235 ± 203
CL (mL/h/kg)	2.18 ± 0.44	10.2 ± 2.1	6.52 ± 1.14	3.31 ± 0.91	2.72 ± 0.85	2.46 ± 0.56	2.05 ± 0.53	1.41 ± 0.35	1.73 ± 0.12	1.55 ± 0.10
V_z (mL/kg)	104 ± 16	413 ± 72	267 ± 49	136 ± 66	119 ± 38	124 ± 42	98.0 ± 31.1	66.9 ± 9.8	91.9 ± 8.7	74.7 ± 4.8
$t_{1/2}$ (h)	33.5 ± 2.6	28.1 ± 2.3	28.5 ± 3.5	28.2 ± 7.8	30.5 ± 2.9	34.4 ± 5.2	32.7 ± 2.6	33.6 ± 4.3	36.7 ± 2.8	33.4 ± 0.9
MRT (h)	42.4 ± 8.4	13.7 ± 0.8	22.0 ± 4.1	26.7 ± 6.7	35.1 ± 5.2	36.7 ± 2.4	48.8 ± 3.3	49.3 ± 4.5	46.8 ± 3.7	46.6 ± 2.2
Additional Information: The extent of sialic acid occupancy does not affect the potency or purity of VEGF Trap but can impact the overall exposure to the drug. It is expected that VEGF Trap containing a Z number of 0.9 or greater would exhibit minimal differences in the in vivo disposition of VEGF Trap.										

[a] Values are mean ± standard deviation *: Sialic acid content/VEGF Trap dimmer ; **: Average sialic acid content/N-linked sugar chain

Abbreviations: IV: intravenous, ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, t_{max}: first time to reach C_{max}, C_{max}: maximum concentration observed, $t_{1/2}$: terminal half life, AUC: area under the curve extrapolated to infinity, CL: plasma clearance, V_z: volume of distribution, MRT: Mean Residence Time