コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.4 非臨床試験の概括評価

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
図目次 3
表目次 3
略語一覧 5
2.4.1 非臨床試験計画概要 7
2.4.1.1 コンシズマブ分子と製剤 7
2.4.1.2 非臨床試験計画 8
2.4.2 薬理試験 9
2.4.2.1 作用機序 10
2.4.2.2 非臨床試験の動物種の適格性 10
2.4.2.3 効力を裏付ける試験 11
2.4.2.3.1 *In vitro* 薬理試験 11
2.4.2.3.2 *In vivo* 薬理試験 11
2.4.2.4 副次的薬理試験 15
2.4.2.5 安全性薬理試験 16
2.4.2.6 薬力学的薬物相互作用 16
2.4.3 薬物動態試験 18
2.4.3.1 分析法 19
2.4.3.2 吸収 20
2.4.3.3 分布 23
2.4.3.4 代謝 23
2.4.3.5 排泄 23
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 23
2.4.4 毒性試験 23
2.4.4.1 単回及び反復投与毒性 25
2.4.4.2 遺伝毒性 26
2.4.4.3 がん原性 27
2.4.4.4 生殖発生毒性 27
2.4.4.4.1 幼若動物を用いた毒性試験 28
2.4.4.5 局所刺激性 28
2.4.4.6 その他の毒性試験 28
2.4.4.6.1 組織交差反応性（TCR） 28
2.4.4.6.2 [redacted]及び[redacted]の特性評価 29
2.4.4.6.3 免疫複合体が介在する病態解明のための作用機序検討試験 29
2.4.4.6.4 コンシズマブによる予防治療を受ける患者における出血治療を非臨床的に裏付ける、rFVIIa との相互作用試験 30
2.4.4.7 組織因子（TF）の発現が増加した状態における理論的影響 30

2.4.4.8　製剤中の添加物の安全性評価 31
2.4.4.9　不純物及び溶出物の安全性評価 31
2.4.4.10　臨床曝露量と比較した慢性毒性試験の曝露量 31
2.4.5　総括及び結論 33
参考文献 35

図目次

ページ

図 2.4-1　コンシズマブの構造の概要 7
図 2.4-2　コンシズマブの作用機序 10
図 2.4-3　抗体誘発性 HA ウサギの爪上皮出血モデルにおけるコンシズマブ（静脈内投与）の用量依存的な出血量の減少 13
図 2.4-4　抗体誘発 HA ウサギにおけるコンシズマブ（20 mg/kg 単回静脈内投与）の作用持続時間 13
図 2.4-5　抗体誘発 HA ウサギの爪上皮出血モデルにおけるコンシズマブ（皮下投与）の出血量の減少 14
図 2.4-6　結紮顔面静脈圧搾後の正常ウサギにおける LMHW 存在下又は非存在下でのコンシズマブ投与後の血栓重量 15
図 2.4-7　内皮細胞をコンシズマブ、抗 TFPI K3 抗体、対照抗体又はヘパリンとともにインキュベートしたときの培養上清中 TFPI 濃度 16
図 2.4-8　コンシズマブ 0.1～20 mg/kg をカニクイザルに単回静脈内投与時の血漿中濃度－時間曲線 21
図 2.4-9　コンシズマブ 20 mg/kg をカニクイザルに単回静脈内投与時のコンシズマブ及び遊離 TFPI 濃度－時間曲線 23

表目次

ページ

表 2.4-1　コンシズマブの nmol/L から mg への変換 8
表 2.4-2　薬理試験の概要 9
表 2.4-3　薬物動態試験の概要 19
表 2.4-4　非臨床試料を用いて実施されたアッセイ 20
表 2.4-5　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験におけるコンシズマブのトキシコキネティクスデータの概要 22
表 2.4-6　カニクイザルを用いた毒性試験の概要 24
表 2.4-7　死亡動物及び死因（試験番号：209206、211087 及び 213542） 26
表 2.4-8　動物における慢性毒性試験の NOAEL とヒトの平均曝露量に基づく動物－ヒトの曝露量比 32
表 2.4-1　コンシズマブの nmol/L から mg への変換 8
表 2.4-2　薬理試験の概要 9

表 2.4-3 薬物動態試験の概要 19
表 2.4-4 非臨床試料を用いて実施されたアッセイ 20
表 2.4-5 カニクイザルを用いた反復投与毒性試験におけるコンシズマブのトキシコキネティクスデータの概要 22
表 2.4-6 カニクイザルを用いた毒性試験の概要 24
表 2.4-7 死亡動物及び死因（試験番号：209206、211087 及び 213542） 26
表 2.4-8 動物における慢性毒性試験の NOAEL とヒトの平均曝露量に基づく動物－ヒトの曝露量比 32

略語一覧

ADA	:	anti-drug antibody（抗薬物抗体）
ADCC	:	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity（抗体依存性細胞傷害）
APC	:	activated protein C（活性化プロテイン C）
aPCC	:	activated prothrombin complex concentrates（活性型プロトロンビン複合体製剤）
APTT	:	activated partial thromboplastin time（活性化部分トロンボプラスチン時間）
AT	:	antithrombin（アンチトロンビン）
AUC	:	Area under the curve（濃度－時間推移曲線下面積）
AUC_{inf}	:	Area under the concentration–time curve from time zero to infinity（投与後 0～∞時間までの AUC）
C_{max}	:	Maximum concentration（最高血中濃度）
CAS	:	Chemical Abstract Service
CE-SDS	:	Capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate（キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム）
CHMP	:	Committee for Medicinal Products for Human Use（欧州医薬品委員会）
CIC	:	Circulating immune complex（循環性免疫複合体）
DRF	:	Dose range finding（用量範囲設定）
dPT	:	dilute prothrombin time（希釈プロトロンビン時間）
DP	:	Drug product（製剤）
DS	:	Drug substance（原薬）
EC_{50}	:	50% effective concentration（50%有効濃度）
ED_{50}	:	Half maximal effective dose（50%有効量）
ECG	:	electrocardiogram（心電図）
FcR	:	Fc receptor（Fc 受容体）
FcγR	:	Fcγ receptor（Fcγ 受容体）
FHD	:	First-Human dose（ヒト初回投与）
FV	:	coagulation factor V（血液凝固第 V 因子）
FIX	:	coagulation factor IX（血液凝固第 IX 因子）
FIXa	:	activated coagulation factor IX（活性型血液凝固第 IX 因子）
FVII	:	coagulation factor VII（血液凝固第 VII 因子）
FVIIa	:	activated coagulation factor VII（活性型血液凝固第 VII 因子）
FVIII	:	coagulation factor VIII（血液凝固第 VIII 因子）
FX	:	coagulation factor X（血液凝固第 X 因子）
FXa	:	activated coagulation factor X（活性型血液凝固第 X 因子）
GLP	:	Good Laboratory Practice（医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準）
[redacted]	:	[redacted]
HA	:	haemophilia A（血友病 A）
HB	:	haemophilia B（血友病 B）
HCP	:	Host cell protein（宿主細胞由来タンパク質）
[redacted]	:	[redacted]
HUVEC	:	human umbilical vein endothelial cells（ヒト臍帯静脈内皮細胞）
IC	:	Immune complex（免疫複合体）
ICH	:	International Committee for Harmonisation（医薬品規制調和国際会議）
IgG	:	immunoglobulin G（免疫グロブリン G）
IHC	:	immunohistochemistry（免疫組織化学的検査）
IL	:	interleukin（インターロイキン）
i.v.	:	intravenous（静脈内）
JP	:	Japanese Pharmacopoeia（日本薬局方）

K1, K2, K3	:	Kunitz domain 1, 2, 3（Kunitz ドメイン 1、2、3）
LPS	:	Lipopolysaccharide（リポ多糖）
mAb	:	monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
NCA	:	Non-compartmental analysis（ノンコンパートメント解析）
NNC0172-2021 (NNC0172-0000-2021)	:	concizumab（コンシズマブ）
NOAEL	:	No observed adverse effect level（無毒性量）
NOEL	:	No observed effect level（無影響量）
NR	:	Not reported（報告なし）
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
pAb	:	Polyclonal antibody（ポリクローナル抗体）
PBMC	:	Peripheral blood mononuclear cells（末梢血単核球）
PD	:	Pharmacodynamic(s)（薬力学）
PK	:	pharmacokinetic(s)（薬物動態）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）
PT	:	prothrombin time（プロトロンビン時間）
r	:	recombinant（遺伝子組換え）
rsTF	:	Recombinant soluble tissue factor（遺伝子組換え可溶型組織因子）
s.c.	:	subcutaneous（皮下）
SD	:	standard deviation（標準偏差）
SDS-PAGE	:	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis（SDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動法）
SEC	:	Size exclusion chromatography（サイズ排除クロマトグラフィ）
SEM	:	standard error of the mean（標準誤差）
SPR	:	surface plasmon resonance（表面プラズモン共鳴）
$t_{1/2}$	:	Terminal half life（終末相半減期）
TAT	:	thrombin-anti thrombin（トロンビンーアンチトロンビン）
TCR	:	Tissue cross-reactivity（組織交差反応性）
TEG	:	thromboelastography（トロンボエラストグラフィー法）
TF	:	tissue factor（組織因子）
TFPI	:	tissue factor pathway inhibitor（組織因子経路インヒビター）
TM	:	thrombomodulin（トロンボモジュリン）
t_{max}	:	Time to reach maximum concentration（最高血中濃度到達時間）
TMDD	:	Target-mediated drug disposition（標的介在性の薬物動態）
TNF	:	Tumour necrosis factor（腫瘍壊死因子）
ULOQ	:	Upper limit of quantification（定量上限）
USP	:	United States Pharmacopoeia（米国薬局方）
VCAM-1	:	Vascular cell adhesion molecule 1（血管細胞接着分子 1）
V_{max}	:	Maximum rate of elimination（最大消失速度）
w/v	:	Weight/volume（重量／容積）

2.4.1　非臨床試験計画概要

コンシズマブは、ノボ ノルディスク社により開発された免疫グロブリン G4（IgG4）アイソタイプの遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（mAb）であり、血友病 A（HA）〔先天性血液凝固第 VIII 因子（FVIII）欠乏症〕及び血友病 B（HB）〔先天性血液凝固第 IX 因子（FIX）欠乏症〕患者（それぞれ FVIII 及び FIX のインヒビター保有の有無を問わない）の出血に対する予防治療を目的としている。

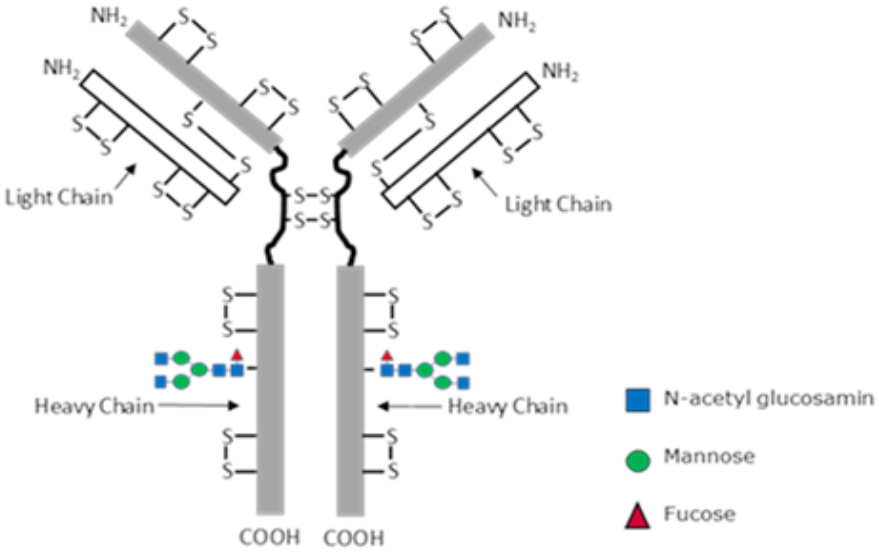
推奨される用法・用量は、1 日目に 1 mg/kg を負荷投与後、以降は 1 日 1 回、0.20 mg/kg 投与する。治療開始 4 週間後に測定したコンシズマブの曝露量に基づき、維持用量を 1 日 1 回、0.15、0.20 又は 0.25 mg/kg に増減する。

コンシズマブは皮下注射として投与され、長期の予防治療を目的としている。

2.4.1.1　コンシズマブ分子と製剤

コンシズマブは、組織因子経路インヒビター1（TFPI1；以下 TFPI と略す）のすべてのアイソフォーム（ヒトで発見されている 2 種類の主要な TFPI アイソフォームである TFPIα 及び TFPIβ を含む）の K2 ドメインを標的とする、遺伝子組換えヒト化インタクト IgG4 mAb である。コンシズマブは分子量が約 149 キロダルトン（kDa）のグリコシル化ポリペプチドであり、ジスルフィド架橋によって連結した 2 本の重鎖（それぞれ 448 アミノ酸残基）と 2 本の軽鎖（それぞれ 219 アミノ酸残基）から構成される（図 2.4-1）。

図 2.4-1　　コンシズマブの構造の概要



コンシズマブは 16 箇所のジスルフィド架橋を含み、重鎖の 298 位のアスパラギンでコアフコシル化された二分岐構造でグリコシル化されている。半抗体の形成を防ぐため、野生型のヒト IgG4 タンパク質重鎖の 229 位（Kabat ナンバリングでは 241 位）のセリンからプロリンへの点突然変異が導入された。この点突然変異は、他の市販の IgG4 抗体であるゲムツズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブにも存在する[1,2,3]。

コンシズマブは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株を用いて[redacted]による遺伝子組換え手法で生産されており、製造に用いられる原料はいずれも動物由来ではない。

非臨床試験におけるコンシズマブの用量と濃度は、それぞれ主に mg/kg と nM (nmol/L)で示される。nmol/L から ng/mL と、mg/kg から nmol/kg への変換を表 2.4-1 に示す。

表 2.4-1　　コンシズマブの nmol/L から mg への変換

Drug product	**MW (kg/mol)**	**1 nmol/L**	**1 mg/kg**
Concizumab	149	149 ng/mL	6.71 nmol/kg

販売されるコンシズマブ製剤には、添加剤として L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン、塩化ナトリウム、精製白糖、ポリソルベート 80 及びフェノールが含まれている。臨床製剤処方に含まれた添加剤はいずれも既知のものであり、また、長期間の皮下及び静脈内投与で使用される、他の既承認医薬品における使用量と同等又はより高用量が使用されている。

フェノールを除き、非臨床試験に含まれたすべての添加剤は臨床用製剤の濃度と同様であった。コンシズマブ製剤中のフェノール含量は 0.35%（w/v）であり、1 日 1 回の長期皮下投与で既承認の医薬品で使用されているフェノールの含有量を下回っている。

2.4.1.2　非臨床試験計画

コンシズマブの安全性試験プログラムは、医薬品規制国際調和会議（ICH） M3（R2）、ICH S6（R1）及び ICH S7A ガイドライン[4,5,6]に従って策定された。カニクイザルを用いたすべての重要な毒性試験及び安全性薬理試験は、経済協力開発機構（OECD）加盟国において、OECD 又は米国食品医薬品局（FDA）が制定した医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施された。

コンシズマブの非臨床データは、効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験、薬物動態（PK）／トキシコキネティクス試験、受胎能評価を含む毒性試験で構成される。生殖発生毒性試験、幼若動物を用いた試験、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施しなかったが、コンシズマブのがん原性は証拠の重みづけ評価手法により評価した。カニクイザル及びウサギは、コンシズマブに薬理反応を示す非臨床動物種であることが確認されている。効力を裏付ける試験に使用する動物種としてウサギを、安全性試験に使用する非げっ歯類動物種としてカニクイザルを選択し、両動物種を PK／薬力学（PD）評価に使用した。なお、正常な凝固系を有する（非血友病）カニクイザルを用いた最長 52 週間の毒性試験が実施されている。反復投与毒性試験では、コンシズマブを週 1 回静脈内投与又は 1 日 1 回皮下投与した。毒性試験では、標的介在性の薬物動態（TMDD）による曝露に関連した影響を回避するため、特に低用量でコンシズマブを 1 日 1 回投与した。静脈内及び皮下投与の両方を評価し、臨床開発プログラムを裏付けた。

コンシズマブによる予防治療を受ける血友病患者の破綻出血治療に、遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子製剤（rFVIIa、ノボセブン®）、活性型プロトロンビン複合体製剤（aPCC、ファイバ®）、

遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子製剤（rFVIII）又は遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子製剤（rFIX）の投与が可能か裏付けるため、*in vitro* 及び *in vivo* 薬物相互作用試験を実施した。

開発期間中、規制当局と協議し、FDA、欧州医薬品庁（EMA）ヒト用医薬品委員会（CHMP）、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）及び EU 各国の規制当局からの助言を求めた。受領した助言は開発戦略に考慮されている。

2.4.2 薬理試験

実施された薬理試験の概要を表 2.4-2 に示す。

コンシズマブの TFPI 中和作用は、複数の非臨床 *in vitro* 及び *in vivo* 試験で評価されている。安全性薬理評価項目は単回及び反復投与毒性試験に含まれた。コンシズマブによる予防治療を受けている血友病患者の破綻出血の治療薬として rFVIIa、aPCC、rFVIII 及び rFIX の投与を裏付けるため、*in vitro*、*ex vivo* 及び *in vivo* 薬物相互作用試験が実施された。

表 2.4-2 薬理試験の概要

Discipline	**Type of study**
Species qualification	
	Amino acid sequence of human K2 compared to mouse, rat, rabbit, pig, dog and cynomolgus and rhesus monkeys
	Binding of concizumab to human, cynomolgus monkey and rabbit TFPI
	Functional cross reactivity in dilute prothrombin time assay in human, mouse, rat, guinea pig, rabbit, dog, pig and cynomolgus monkey plasma
	Thromboelastography in human and cynomolgus monkey whole blood
Primary pharmacodynamics	
In vitro	Inhibition of TFPI in biochemical assays using purified proteins, endothelial cells, plasma and whole blood
In vivo	Acute and prolonged effect after concizumab s.c. or i.v. administration in a cuticle bleeding in rabbits with antibody-induced HA. Effect in a venous stasis model in normo-coagulant rabbits
Secondary pharmacodynamics	
	Examination of endothelial TFPI release
	Potential effect on protein C and antithrombin activity

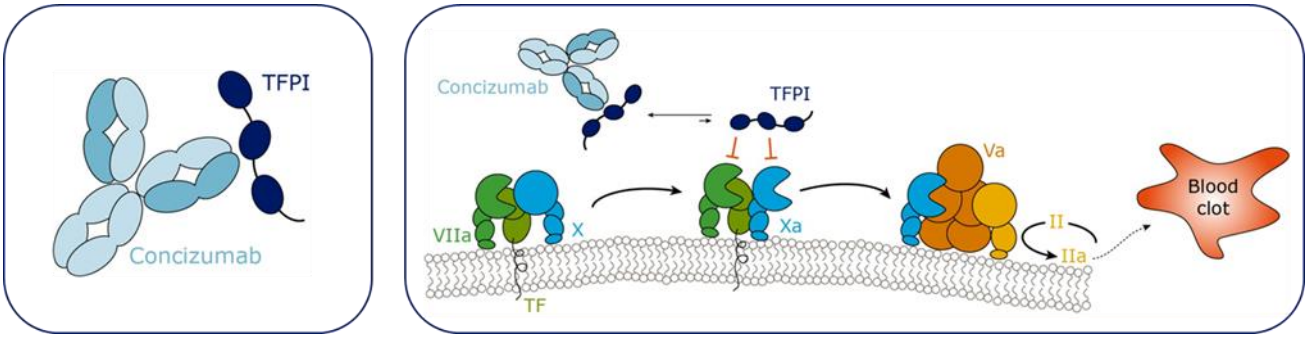
Discipline	Type of study
Safety pharmacology	
In vitro	Assessment of binding to Fc receptors, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), complement fixation and binding to peripheral blood cells
In vivo	Safety pharmacology endpoints (cytokine release, blood pressure measurement, ECG, respiration rate, urinalysis and CNS endpoints) were incorporated in some of the single- and repeat-dose toxicity studies in cynomolgus monkeys
Pharmacodynamic drug interactions	
In vitro	Thrombin generation by rFVIIa, aPCC, rFVIII or rFIX in absence or presence of concizumab in antibody-induced haemophilia whole blood or a haemophlia plasma pool
Ex vivo	Thrombin generation in plasma from haemophilia patients treated prophylactically with concizumab added of rFVIIa, aPCC or rFVIII
In vivo	Effects of rFVIIa in presence or absence of concizumab on cuticle bleeding in rabbits with antibody-induced HA

Abbreviations: ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytoxicity; aPCC = activated prothrombin complex concentrate; CNS = central nervous system; HA = haemophilia A; rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII; rFVIII = recombinant coagulation factor VIII; rFIX = recombinant coagulation factor IX; TFPI = tissue factor pathway inhibitor.

2.4.2.1　作用機序

コンシズマブは、血液凝固カスケードの初期相におけるダウンレギュレーションに関与する TFPI に作用する。コンシズマブは、TFPI の Kunitz ドメイン 2（K2）に特異的に結合し、TFPI が活性型血液凝固第 X 因子（FXa）の活性部位に結合するのを阻害する。TFPI の阻害活性が低下すると、活性型血液凝固第 VII 因子（FVIIa）／組織因子（TF）複合体により産生された FXa により、止血に十分な量のトロンビンが生成される。コンシズマブのこの新しい作用機序は FVIII 及び FIX の有無には左右されないため、HA 及び HB 患者（インヒビター保有の有無に関わらず）の両方に対する治療薬として開発されている（図 2.4-2）。

図 2.4-2　　コンシズマブの作用機序



Abbreviations: a = activated; TF = tissue factor; TFPI = tissue factor pathway inhibitor.

2.4.2.2　非臨床試験の動物種の適格性

カニクイザル及びウサギは、コンシズマブに薬理反応を示す非臨床動物種であることが確認されている。効力を裏付ける試験に使用する動物種としてウサギを、安全性試験に使用する非げっ歯類動物

種としてカニクイザルを選択し、両動物種を PK／PD 評価に使用した。動物種の選択は、カニクイザル、ウサギ及びヒト間の TFPI の K2 ドメインにおけるコンシズマブのエピトープの高いアミノ酸配列相同性によって裏付けられ、ウサギ、カニクイザル及びヒト内因性 TFPI に対するコンシズマブの結合及び機能的な交差反応性が認められた。マウス、ラット、イヌ、ブタ及びモルモットの血漿中の TFPI に対する交差反応性は認められなかった。ヒト及びカニクイザル全血試料を用いてトロンボエラストグラフィー法（TEG）で測定した結果、コンシズマブの血液凝固動態は同様であった。さらに、サルの血液凝固系はヒトと高い類似性を有することが示されている[7,8]。

2.4.2.3 効力を裏付ける試験

2.4.2.3.1 *In vitro* 薬理試験

In vitro 評価は、TFPI に対するコンシズマブの結合親和性、エピトープマッピング、並びにコンシズマブによる TFPI の中和が濃度依存的な FXa 活性の増加、トロンビン生成及び血栓形成の改善作用を誘導するか実証する機能的試験により構成された。これらの試験から、これらのアッセイで得られたコンシズマブの 50%有効濃度（EC_{50}）は、nmol/L 未満～低 nmol/L であった。これらの試験の一部で、HA 様又は HB 様条件を用いて行われた。得られた結果から、インヒビターの有無にかかわらず、HA 患者又は HB 患者における止血促進化合物としてのコンシズマブの使用が裏付けられた。

エピトープマッピングにより、TFPI の K2 ドメインにおけるエピトープは FXa 結合部位と重なっていることが明らかになった。ヒトの結合エピトープをその他の動物種における TFPI のアミノ酸配列と比較すると、カニクイザル及びウサギ TFPI の K2 ドメインにのみ同一のエピトープが認められた。遺伝子組換えウサギ、カニクイザル及びヒト TFPI に対するコンシズマブの結合を表面プラズモン共鳴（SPR）試験で確認した。結合定数はこれらの動物種を通して nmol/L 未満であった。

希釈プロトロンビン時間（dPT）アッセイを用いた改変凝固時間法において、コンシズマブはウサギ及びカニクイザル血漿中の内因性 TFPI を阻害したことから、これらの動物種の TFPI に対して交差反応性を示すことが更に裏付けられた。一方、マウス、ラット、モルモット、イヌ及びブタの血漿中 TFPI に対しては、コンシズマブは阻害作用を示さなかった。また、TEG を用いた試験から、コンシズマブは血友病状態を誘発したカニクイザルの全血において凝固時間及び血栓形成を改善し、EC_{50} 値はヒトの血液で得られた値と同程度であった。安全性薬理試験及び毒性試験は、正常な血液凝固系を有する（非血友病）カニクイザルを用いて実施した。

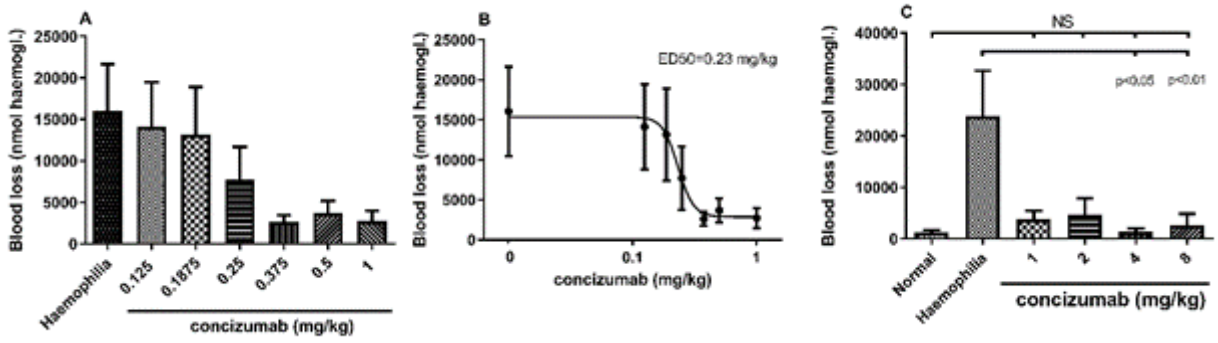
要約すると、精製タンパク質、内皮細胞、血漿及び全血を用いた *in vitro* 試験から、コンシズマブによる TFPI の中和は、FXa 及びトロンビン生成を増加させ、血栓形成を改善した。

2.4.2.3.2 *In vivo* 薬理試験

In vivo proof-of-concept 試験は、中和 FVIII 抗体の投与により HA を誘発したウサギの爪上皮出血モデルを用いて、麻酔下で実施した。

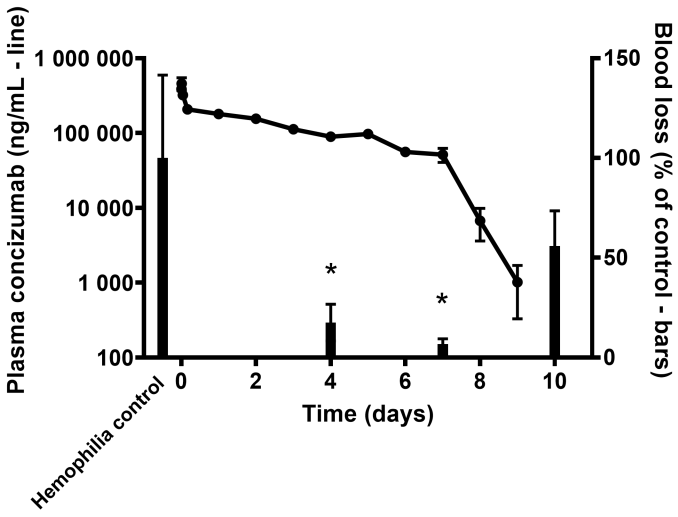
出血誘発前にコンシズマブを投与すると、用量依存的に出血量が減少し、50%有効量（ED_{50}）は 0.23 mg/kg であることが示された（図 2.4-3）。20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、コンシズマブの作用が 7 日間持続した。（図 2.4-4）。爪上皮出血の誘発 15～30 分後に投与した場合には、コンシズマブの作用は認められず、コンシズマブが作用するには損傷前か、損傷直後に投与される必要があることが示された。

図 2.4-3　　抗体誘発性 HA ウサギの爪上皮出血モデルにおけるコンシズマブ（静脈内投与）の用量依存的な出血量の減少



Note: A) Cuticle blood loss in rabbits with antibody-induced haemophilia A, when pre-treated with concizumab (n=6-8) or isotype control antibody (n=12). B) From the fitted sigmoidal curve an ED50 of 0.23 mg/kg was estimated. C) Cuticle blood loss in rabbits with antibody-induced haemophilia A, when pre-treated with concizumab or isotype control antibody (n=8-10) before induction of bleeding.

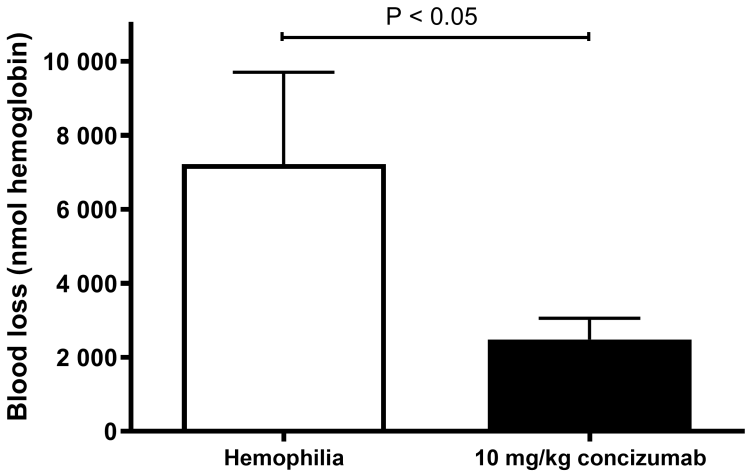
図 2.4-4　　抗体誘発 HA ウサギにおけるコンシズマブ（20 mg/kg 単回静脈内投与）の作用持続時間



Note: (Left axis, line) Plasma concizumab concentration in rabbits with antibody-induced haemophilia A dosed with 20 mg/kg intravenously and (right axis, bars) blood loss after cuticle bleeding induced at 4, 7, and 10 days after administration of concizumab, expressed as percentage of blood loss in control rabbits dosed with isotype control antibody (n=8). *P <0.05 compared with the corresponding control group[9].

また、コンシズマブをウサギの爪上皮出血モデルに皮下投与した結果、出血量の減少作用が示された（図 2.4-5）。

図 2.4-5　　抗体誘発 HA ウサギの爪上皮出血モデルにおけるコンシズマブ（皮下投与）の出血量の減少



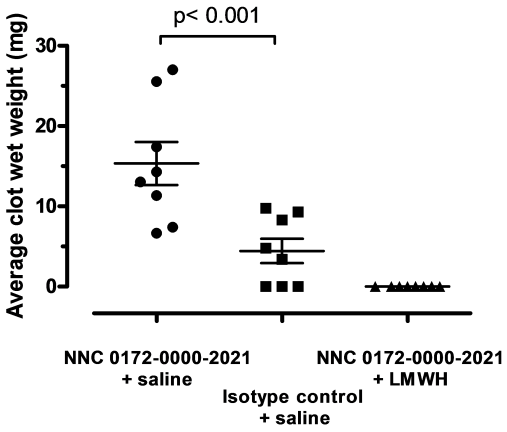
Note: Cuticle blood loss in rabbits (n=8) with antibody-induced haemophilia A, when pre-treated subcutaneously with 10 mg/kg concizumab or isotype control antibody 24 hours before induction of bleeding[9].

低分子量ヘパリンはウサギにおけるコンシズマブの凝固促進作用を抑制した

コンシズマブ 2 mg/kg 又はアイソタイプ対照抗体を投与した非血友病ウサギの静脈うっ滞モデルにおいて、結紮静脈から形成された血栓数及び大小に有意差は認められず、血小板数、プロトロンビン時間（PT）、トロンビンーアンチトロンビン（TAT）及びフィブリノゲン値に有意差は認められなかった。病理組織学的検査において、コンシズマブ投与群の 3/6 匹の肺に、対照群の 1/4 匹の心臓に血栓が認められた。これらの血栓の形成は、過去に報告されている[10]ように、正常な血液凝固系を有するウサギにおける外科的処置及び長時間の麻酔処置に関連するものと判断されたが、薬剤投与の寄与は否定できなかった。

低分子量ヘパリン（LMWH）とコンシズマブとの併用作用を、正常ウサギの静脈損傷改変モデルで評価した。本試験では、コンシズマブ 2 mg/kg を静脈内投与後、標準化されている結紮顔面静脈を圧搾する手法で損傷させた。コンシズマブ投与群では、アイソタイプ対照抗体と比較して局所血栓形成が有意に増加した。コンシズマブ投与後、損傷前に LMWH を注射した場合には、局所血栓形成は全く認められなかった（図 2.4-6）。測定した血液凝固パラメータ〔血小板数、PT、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）及びフィブリノゲン〕に変化は認められなかった。

図 2.4-6　結紮顔面静脈圧搾後の正常ウサギにおける LMHW 存在下又は非存在下でのコンシズマブ投与後の血栓重量



Note: Concizumab (NNC0172-0000-2021; 2 mg/kg i.v., n=8) increased the local clot formation in a venous stasis model in rabbits (with external crushing of ligated veins) compared to isotype control. When the administration of concizumab was followed by injection of a low molecular weight heparin (LMWH; 500 anti-FXa international units (IU)/kg) before the crush injury, the clot formation was prevented.
Abbreviations: FXa = activated coagulation factor X; LMWH = low molecular weight heparin.

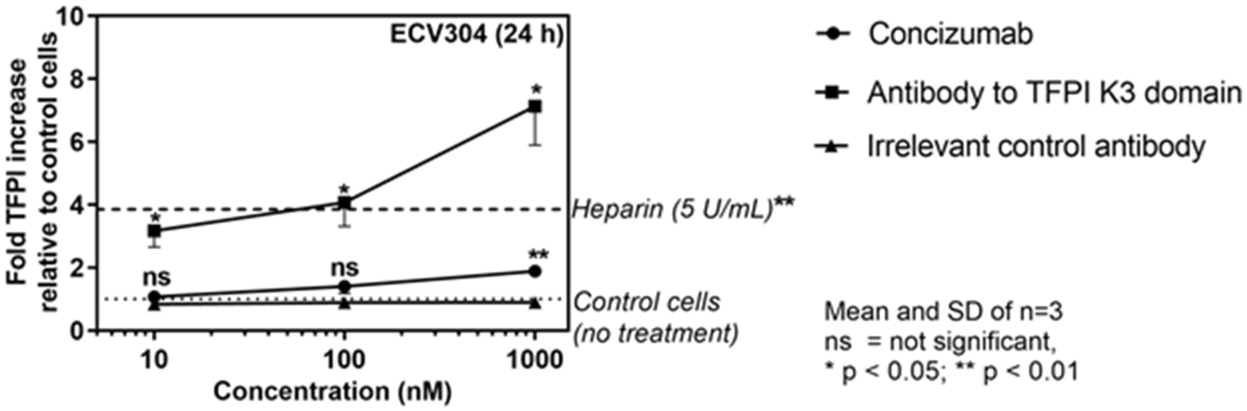
結論

抗体誘発 HA ウサギの爪上皮出血モデルにおいて、コンシズマブを皮下及び静脈内経路で投与した結果、出血量が減少し、作用は最大 7 日間持続した。非血友病ウサギの改変静脈うっ滞モデルにおいて、ヘパリンはコンシズマブにより誘発される局所血栓形成を抑制した。

2.4.2.4　副次的薬理試験

ヘパリンは *in vitro* 及び *in vivo* の両方で内皮細胞からの TFPI の遊離を誘発する[11]。また、TFPI アンタゴニストは内皮細胞からの TFPI の遊離を誘発する場合があり、結果的に抗凝固作用をもたらす可能性が考えられている[12]。コンシズマブによる内皮細胞からの TFPI の遊離の有無を評価した。100 nmol/L（15,000 ng/mL）以下のコンシズマブ濃度では、内皮からの TFPI の遊離は認められなかった。これらの濃度は臨床 C_{max} の平均値（1,167 ng/mL、2.4.4.10）を上回る濃度であった。1000 nmol/L（約 150,000 ng/mL）の非常に高濃度のコンシズマブを用いた場合、統計的に有意な TFPI の中程度の遊離が認められた。TFPI の Kunitz ドメイン 3（K3）に対する抗体は、1000 nmol/L コンシズマブよりも高い TFPI の遊離が誘発され、TFPI の細胞への固定に K3 が関与していることと一致していた（図 2.4-7）。したがって、臨床的に意味のある濃度では、コンシズマブは内皮細胞からの TFPI の遊離を誘発しないと考えられる。

図 2.4-7　　内皮細胞をコンシズマブ、抗 TFPI K3 抗体、対照抗体又はヘパリンとともにインキュベートしたときの培養上清中 TFPI 濃度



活性化プロテイン C（APC）及びアンチトロンビン（AT）は血液凝固カスケードの負の制御因子である。コンシズマブが APC 及び AT の阻害作用に影響を及ぼすか検討するため、TFPI 及びトロンボモデュリン（TM）の供給源としてヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた *in vitro* 試験を実施した。試験から得られた結論は、予想した通り、コンシズマブは APC に影響を及ぼさず、トロンビンによる AT の阻害作用にも影響を及ぼさないというものであった。これらの結果は、サル反復投与毒性試験で得られた血漿試料の分析結果により、プロテイン C 及び AT 濃度に毒性学的に意義のある変化が認められなかったことからも裏付けられている。以上より、これらの下流の抗凝固作用はコンシズマブによる影響を受けないことが示された。

2.4.2.5　安全性薬理試験

コンシズマブの *in vitro* 安全性薬理プログラムは、Fc 受容体（FcR）への結合、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、補体結合及び末梢血単核細胞（PBMC）への結合の評価により構成された。これらの検討において、コンシズマブはアイソタイプ IgG4 対照抗体と同様の結果であった。安全性に関する懸念は確認されなかった。

ICH S6（R1）[5] 及び ICH S7A[6] 非臨床安全性試験ガイドラインに準拠して、カニクイザルを用いた用量範囲設定（DRF）毒性試験及び重要な 13 週間反復投与毒性試験に *in vivo* 安全性薬理評価項目〔血圧、心電図（ECG）、呼吸数、尿検査及び関連する中枢神経系（CNS）〕並びにサイトカイン〔インターロイキン（IL）-2、IL-4、IL-5、IL-6、腫瘍壊死因子（TNF）-α、インターフェロン（IFN）-γ〕放出の評価を組み入れた。さらに、52 週間毒性試験でも ECG 及び尿検査を組み入れた。これらの試験では、最大 200 mg/kg/週（静脈内）及び 50 mg/kg/日（皮下）まで反復投与したが、いずれにおいても安全性薬理評価項目に及ぼすコンシズマブの影響は認められなかった。これらの用量は、臨床的に意味のある曝露量をはるかに超える（>1000 倍）曝露量であった（2.4.4.10）。

2.4.2.6　薬力学的薬物相互作用

コンシズマブによる予防治療を受ける血友病患者では、破綻出血に対する追加治療が必要となる可能性がある。コンシズマブと他の血液凝固因子製剤（rFVII、aPCC、rFVIII 及び rFIX）との薬力学的相

互作用の可能性については、血友病患者の血液検体を用いた *in vitro/ex vivo* 試験、並びにウサギ及びサルを用いた *in vivo* 試験で検討されている。

コンシズマブとインヒビターを保有する血友病患者の出血の治療に用いられる rFVIIa（ノボセブン®）又は aPCC（ファイバ®）との相互作用の可能性を検討するため、HA プール血漿及びコンシズマブによる予防投与を受けた患者の血漿を用いたトロンビン生成試験において、コンシズマブの非存在下と存在下での rFVIIa 又は aPCC の *in vitro* 及び *ex vivo* での作用を比較した。トロンビン生成試験のデータから、コンシズマブと rFVIIa 又は aPCC との薬物相互作用が示された。コンシズマブと rFVIIa 又は aPCC を併用した場合、得られた作用の総計は主に相加的であり、得られた作用の総計に占める相乗作用の割合は最大 40%であった。

抗体誘発 HA のウサギ爪上皮出血モデルにおいて、コンシズマブの存在下又は非存在下での rFVIIa の作用を検討した。相加作用又は相乗作用を示す徴候は認められなかった。さらに、投与後 1 時間の観察期間中、血小板数の減少などの毒性に関連する徴候は認められなかった。

インヒビターを保有しない HA 患者及び HB 患者の出血の治療には、それぞれ rFVIII 及び rFIX の使用が可能である。コンシズマブと rFVIII 又は rFIX との相互作用を検討するために、それぞれ HA 又は HB 血漿プールを用いた *in vivo* トロンビン生成試験、及びコンシズマブの予防治療を受けた患者（FVIII のみ使用）からの血漿を用いた *ex vivo* トロンビン生成試験において、コンシズマブの非存在下及び存在下における rFVIII 及び rFIX の作用を比較した。コンシズマブと rFVIII 又は FIX の併用作用は主に相加的であり、得られた作用の総計に占める相乗作用の割合は最大 22%であった。

得られた相乗作用は、コンシズマブと検討した血液凝固因子製剤の作用機序（FXa の生成増加を介してトロンビン生成を増加させる）に一致するものであった。この FXa は、コンシズマブ非存在下では TFPI によって阻害され、コンシズマブ存在下では TFPI による FXa の阻害作用が減弱すると考えられる。したがって、コンシズマブ存在下では、他の血液凝固因子製剤により生成した FXa がより持続的にトロンビンを生成すると考えられる。

コンシズマブの一般毒性試験は、血液凝固系が正常な（非血友病）カニクイザルを用いて実施された。すなわち、FVIII 及び FIX は正常値であり、FVIII 又は FIX のいずれかの投与を受けた血友病患者に相当する。したがって、ノボ ノルディスク社は、これらの試験は血友病患者における FVIII 製剤又は FIX 製剤との併用投与時の安全性を裏付けるものと考える。コンシズマブと rFVIIa の併用投与を裏付けるため、薬物相互作用毒性試験が実施された。本試験では、薬物動態学的薬物相互作用（2.4.3.6）及び投与に関連した毒性所見は認められなかった（2.4.4.6.4）。コンシズマブと rFVIIa の両方が存在する場合には、凝固系の活性化は相加傾向が認められた。

結論として、データから、rFVIIa、aPCC、FVIII 及び FIX は、コンシズマブの存在下でトロンビン生成を増加させる作用が示された。コンシズマブと rFVIIa、aPCC、rFVIII 又は rFIX とを *in vitro* で併用時の作用は主に相加的であり、得られた相互作用に占める相乗作用の割合は最大 40%であった。一方、コンシズマブと rFVIIa の作用は、*in vivo* で主に相加的と考えられた。

全体として、これらのデータから、コンシズマブによる予防治療を受ける患者の破綻出血治療として、rFVIIa、aPCC、rFVIII 及び rFIX の使用の妥当性が裏付けられた。

2.4.3　薬物動態試験

ウサギ及びサルに 0.1～20 mg/kg の用量を投与時のコンシズマブの PK が特性解析されている（表 2.4-3）。

表 2.4-3　　薬物動態試験の概要

Type of study	Species	Route of administration	Dose levels (mg/kg)	Interval	Study ID
Single-dose					
	Rabbit (NZW)	i.v.	2	Single dose	209176
	Rabbit (NZW)	i.v.	2 and 20	Single dose	[redacted]081102
		s.c	2	Single dose	
	Rabbit (NZW)	s.c.	2, 5, 10 and 20	Single dose	209305
		i.v.	20	Single dose	
	Cynomolgus monkey	i.v.	2 and 20	Single dose	[redacted]081101
	Cynomolgus monkey	i.v. and s.c.	20	Single dose	208250
Repeat single-dose					
	Rabbit (NZW)	s.c.	5	Weekly (3 doses)	209305
	Cynomolgus monkey	i.v.	0.1, 0.5 or 1	Two weeks (2 doses)	210156
	Cynomolgus monkey	s.c.	2-20-80, 20-80-160 and 80-160-200	Two weeks (3 escalating doses)	208250
Repeat-dose					
4 weeks	Cynomolgus monkey	s.c.	3 and 9	daily	210130
	Cynomolgus monkey	i.v.	30	weekly	210130
13 weeks	Cynomolgus monkey	s.c.	1, 10 and 50	daily	209206
	Cynomolgus monkey	i.v.	200	weekly	209206
26 weeks	Cynomolgus monkey	s.c.	3 and 9	daily	211087
	Cynomolgus monkey	i.v.	30	weekly	211087
52 weeks	Cynomolgus monkey	s.c.	0.5, 1 and 9	daily	213542

Abbreviations: NZW = New Zealand White, i.v. = intravenous. s.c. = subcutaneous.

2.4.3.1　分析法

コンシズマブの血漿中濃度は酵素免疫測定法（ELISA）を用いて測定され、その測定法のバリデーションは GLP 試験で確認された（表 2.4-4）。さらに、コンシズマブの薬理活性に基づいて、5 種類の機能／PD アッセイを確立した。抗薬物抗体（ADA）の測定については、GLP 適用の非臨床試験における抗コンシズマブ抗体の検出にブリッジング ELISA 法が用いられた。さらに、2 種類のアッセイを用いて、血漿中の免疫複合体（IC）の有無を評価した。1 つ目は ADA/コンシズマブ複合体を特異的に検出すること、2 つ目は IC の組成に関係なく（すなわちコンシズマブに特異的でなく）循環性免疫複合体（CIC）の存在を検出することであった。

表 2.4-4　　非臨床試料を用いて実施されたアッセイ

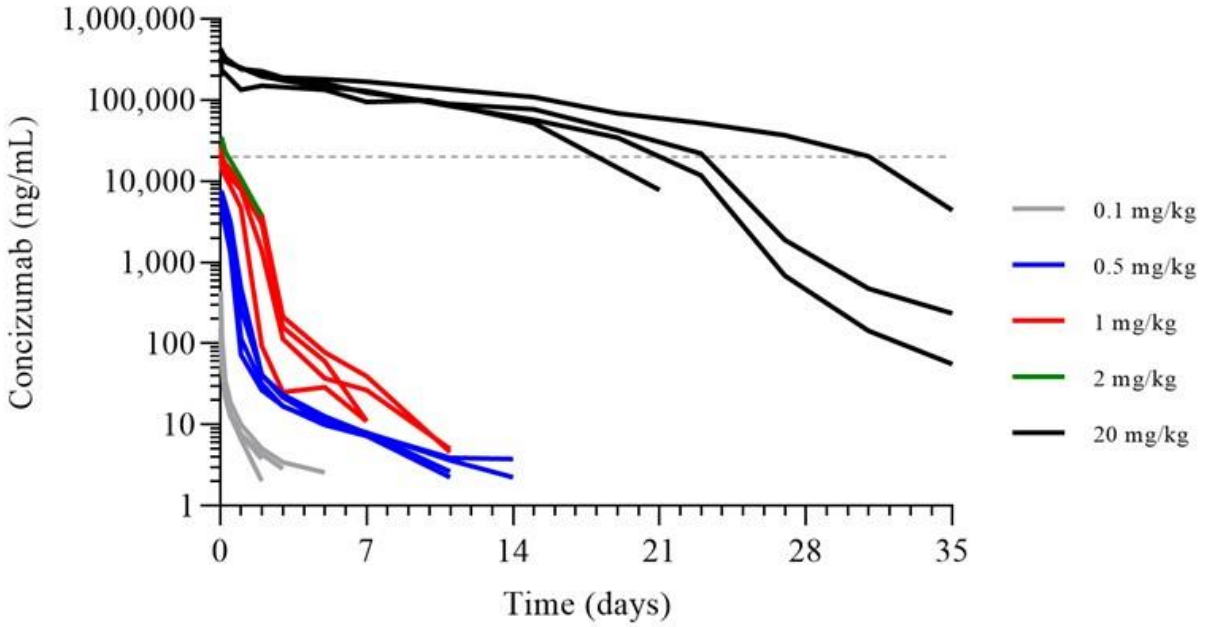
Assay	Used for pharmacology studies (rabbit)		Used for safety studies (cynomolgus monkey)	
	Yes / No	Assay-status	Yes / No	Assay-status
Pharmacokinetic assays				
Concizumab ELISA	Yes	Non-GLP	Yes	GLP
rFVIIa (clot)	No	N/A	Yes	GLP
Pharmacodynamic assays				
Free TFPI ELISA	Yes	Non-GLP	Yes	Non-GLP/GLP
Total TFPI ELISA	Yes	Non-GLP	Yes	Non-GLP
Actichrome®/TFPI functionality	Yes	Non-GLP	Yes	Non-GLP/GLP
S2222/TFPI functionality	No	N/A	Yes	GLP
Dilute prothrombin time (dPT)	Yes	Non-GLP	Yes	Non-GLP
Antibody assays				
Binding antibodies	No	N/A	Yes	GLP
Detection of ADA/concizumab specific immune complexes by size exclusion chromatography and immune complex ELISA	N/A	N/A	Yes	Non-GLP
Circulating immune complexes	N/A	N/A	Yes	Non-GLP

Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; dPT = dilute prothrombin time; ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay; GLP = Good Laboratory Practice; N/A = not applicable; rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII; TFPI = tissue factor pathway inhibitor.

2.4.3.2　吸収

単回投与時のコンシズマブの PK は、ウサギ及びカニクイザルに静脈内及び皮下投与時の特性が明らかにされている。両動物種ともに TMDD により非線形性の PK が示され、他の複数の mAb でも報告されているように[13]、用量依存的なクリアランスがみられた。標的介在性のクリアランスは高濃度のコンシズマブで飽和した。この結果を図 2.4-8 に示す。高濃度では血漿中濃度は平坦であり、濃度が減少するにつれてクリアランスが上昇する。これらの特性のため、コンシズマブの全体的な終末相半減期（$t_{1/2}$）を示すことはできないが、飽和が生じる血漿中濃度（> 20,000 ng/mL）では、コンシズマブの $t_{1/2}$ はサルにおける mAb の典型的な $t_{1/2}$（11～19 日）に近い。コンシズマブを皮下投与時のバイオアベイラビリティは、ウサギ及びサルで約 80%であった。

図 2.4-8　　コンシズマブ 0.1～20 mg/kg をカニクイザルに単回静脈内投与時の血漿中濃度－時間曲線



Note: Data from Study ID 210156: 0.1, 0.5 and 1 mg/kg; Study ID [redacted]081101: 2 and 20 mg/kg; and Study ID 208250: 20 mg/kg. The dotted horizontal line indicates the concentration (20,000 ng/mL) above which TMDD appears to be saturated.

Abbreviations: TMDD = target-mediated drug disposition.

反復投与毒性試験では、コンシズマブを週 1 回静脈内投与又は 1 日 1 回皮下投与した。毒性試験では、TMDD の影響を回避するため、特に低用量でコンシズマブを 1 日 1 回投与した。この投与方法にすることで、曝露の飽和が生じる血漿中濃度を維持することができた。コンシズマブの用量依存的なクリアランスにより、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験における曝露量は用量比を上回る増大を示した（表 2.4-5）。TMDD が生じるモノクローナル抗体で予想された通り、蓄積は 1 日 1 回投与の毒性試験で高く〔平均蓄積比（Rac）が最大 400〕、週 1 回投与試験では低かった（平均 Rac が最大 4）。

表 2.4-5　　カニクイザルを用いた反復投与毒性試験におけるコンシズマブのトキシコキネティクスデータの概要

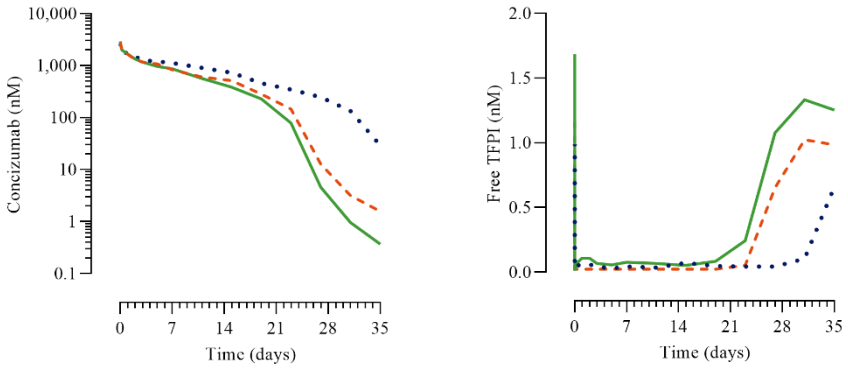
Study ID	Duration	Dose (mg/kg/day[a])	Route	C_{max}[b] (ng/ml)	AUC_{tau}[c] (h*ng/ml)
210130	4 weeks	3	s.c.	638,000	14,100,000
		9	s.c.	1,730,000	37,400,000
		30	i.v.	1,290,000	154,000,000
209206	13 weeks	1	s.c.	282,000	5,930,000
		10	s.c.	4,200,000	83,600,000
		50	s.c.	14,700,000	326,000,000
		200	i.v.	11,800,000	1,580,000,000
211087	26 weeks	3	s.c.	992,000	21,400,000
		9	s.c.	3,310,000	76,500,000
		30	i.v.	2,650,000	307,000,000
213542	52 weeks	0.5[d]	s.c.	82,600	1,910,000
		1[d]	s.c.	309,000	6,890,000
		9	s.c.	5,070,000	99,300,000

Note: Mean of male and female animals. Overall, no differences in TK between males and females observed.
[a]mg/kg/week for i.v. [b]During last week of dosing. [c]AUC_{0-24h} for s.c. and AUC_{0-168h} for i.v. [d]Exposure in animals being ADA-negative (0.5 mg/kg/day), ADA inconclusive or having low-titre ADAs.
Abbreviations: ADA = anti-drug antibody; AUC = area under the concentration–time curve; C_{max} = maximum concentration; TK = toxicokinetic(-s).

カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、コンシズマブに対する ADA の発生が一部の動物の曝露量に影響を及ぼし、これらの動物の一部では凝固系に対するコンシズマブの機能的影響が逆転した。

コンシズマブの投与により遊離 TFPI の濃度が減少した。カニクイザルに 20 mg/kg を単回静脈内投与時の結果を図 2.4-9 に示す（左図はコンシズマブ濃度、右図は遊離 TFPI 濃度を示す）。コンシズマブ濃度が低下すると、遊離 TFPI 濃度はベースライン値に戻った。反復投与毒性試験では、遊離 TFPI 濃度は低下し、コンシズマブ投与を休止後、又は ADA が発生した場合には、コンシズマブ濃度の低下に伴い遊離 TFPI の血漿濃度はベースライン値に戻った。

図 2.4-9　　コンシズマブ 20 mg/kg をカニクイザルに単回静脈内投与時のコンシズマブ及び遊離 TFPI 濃度－時間曲線



Note: The left panel shows the concizumab concentration and right panel the free TFPI concentration. The results are shown from three individual monkeys (same colour code for the same monkey in both figures) (Study ID 208250).

2.4.3.3　分布

コンシズマブの分布試験は実施されていない。コンシズマブの分布は、カニクイザル及びヒト組織を用いた組織交差反応性試験並びにウサギ及びカニクイザルを用いた免疫組織化学的検査[14]により評価されている。一般に、コンシズマブは血液中に存在し、血管内皮と関連していることが認められ、動物種間で差異は認められなかった。

2.4.3.4　代謝

コンシズマブは天然に存在するアミノ酸からなる mAb である。したがって、その代謝は十分に知られている（すなわち、酵素によるペプチド及び構成アミノ酸への蛋白質分解消化）。ICH S6（R1）ガイドラインに従うと [5]、古典的な生体内変化を調べる試験はコンシズマブには必要ないと考えられる。

2.4.3.5　排泄

コンシズマブの排泄試験は実施されていない。前述したように、コンシズマブはペプチド及びアミノ酸に分解され、体内で再利用又は排泄されると考えられる。

2.4.3.6　薬物動態学的薬物相互作用

コンシズマブによる予防治療を受ける血友病患者では、破綻出血に対する追加治療が必要となる可能性がある。コンシズマブの存在下で rFVIIa（ノボセブン®）を追加した場合の薬物相互作用を評価するため、カニクイザルを用いてコンシズマブ及び rFVIIa との 4 週間薬物相互作用毒性試験を実施した。本試験では、1 日 1 回 28 日投与により定常状態のコンシズマブ濃度が得られたが、rFVIIa の PK に影響を及ぼさなかった。

2.4.4　毒性試験

正常な血液凝固系を有する（非血友病）カニクイザルを用いた単回及び反復投与毒性試験において、コンシズマブの毒性プロファイルが評価された（表 2.4-6）。

コンシズマブのような mAb は遺伝毒性や DNA との相互作用を生じることは予想されないことから、コンシズマブの遺伝毒性試験は実施されていない。コンシズマブはげっ歯類に薬理活性を示さないことから、がん原性試験は実施されていない。また、正常な血液凝固系を有する動物を用いてコンシズマブの生殖発生毒性試験を実施する意義はないと考えられたことから、これらの試験は実施されていない。

要約すると、幼若（2〜3 年）及び性成熟した（3.5〜6 年）カニクイザルを用いた 13、26 及び 52 週間毒性試験において 2 つの明らかな毒性所見として血栓及び限局性の血管変化が認められた。血栓症は過剰な薬理作用と考えられたが、限局性の血管変化は ADA の発生により生じる IC 沈着によって引き起こされることが示された。

表 2.4-6　　カニクイザルを用いた毒性試験の概要

Discipline	**Route of administration (dose interval)**	**Dose levels (NOAEL) (mg/kg)**	**Adverse findings**
Single-dose toxicology			
Single-dose PK (with toxicity endpoints; non-GLP)[a]	i.v.	2 and 20	None
Repeat single-dose PK/PD study (with toxicity endpoints; GLP)[a]	i.v. (2-weeks)	0, 0.1, 0.5, 1.0	None
Repeat single-dose (escalating doses; Dose Range Finding; non-GLP)[a]	s.c. (2 weeks)	2, 20 and 80 20, 80 and 160 80, 160 and 200	None
Repeat-dose toxicology (GLP)			
4 weeks[a]	i.v. (weekly) s.c. (daily)	0, 30 3, 9	None
13 weeks[a,c]	i.v. (weekly) s.c. (daily)	200 0, 1, 10, 50	Thrombi and focal vascular changes due to immune complexes secondary to ADAs
26 weeks[b,d]	i.v. (weekly) s.c. (daily)	30 0, 3, 9	Thrombi and focal vascular changes due to immune complexes secondary to ADAs
52 weeks[b,e]	s.c.	0, 0.5, 1, 9	Thrombi and focal vascular changes due to immune complexes secondary to ADAs
Genotoxicity	No studies performed		
Carcinogenicity	No studies performed – Weight of evidence assessment		
Reproductive toxicity	No studies performed – Fertility assessed in 26-week toxicity study		
Local tolerance	Assessed in repeat-dose toxicity studies		
Other toxicology			
Tissue cross-reactivity	N/A	N/A	None
Potential functional differences between [redacted] and [redacted] forms of [redacted]	N/A	N/A	N/A

Discipline	Route of administration (dose interval)	Dose levels (NOAEL) (mg/kg)	Adverse findings
Mechanistic studies to investigate immune complex-mediated pathology	N/A	N/A	N/A
Drug-drug interaction study with rFVIIa - 4-week study in cynomolgus monkeys	Concizumab s.c. (daily) rFVIIa, i.v. (3 doses with 2 h interval on Day 28)	0 (Day 1-28), or 9 (Day 1-4) + 1 (Day 5-28) 0.25, 0.5, 1 mg/kg (Day 28)	None
Biomarker evaluations in toxicity studies	N/A	N/A	N/A

Note: No NOAEL identified in 26-week study.

[a]Juvenile monkeys: 2.0-3.3 years of age at study start, [b]Sexually mature monkeys: 3.5-6 years of age at study start [c]The study included an 11-week recovery group [d]The impurity profile of the batch used is not representative for clinical trial material. The study included a 13-week recovery group [e]The study included 13- and 26-week interim groups.

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; N/A = not applicable; NOAEL = no observed adverse effect level; rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII.

2.4.4.1 単回及び反復投与毒性

単回及び反復投与毒性試験は、正常な血液凝固系を有する（非血友病性）幼若（2～3 歳）及び性成熟（3.5～6 歳）した雌雄カニクイザルを用いて実施した。コンシズマブの投与期間は最長 52 週間とし、1 日 1 回皮下投与又は週 1 回静脈内投与のいずれかを用いた（表 2.4-6）。13、26 及び 52 週間の反復投与毒性試験では、2 つの明らかな毒性所見として血栓及び限局性の血管変化が認められた。

血栓は肺、心臓、その他の器官でも観察され、正常な血液凝固系を有する非血友病サルに血液凝固促進物質を投与した際の過剰な薬理反応と考えられた。血栓に関する無毒性量（NOAEL）は 52 週間皮下投与の 0.5 mg/kg/日であり（C_{max}：82,600 ng/mL、$AUC_{0\text{-}24h}$：1,910,000 h*ng/mL）、この用量は第 3 相臨床試験（4311 試験）から得られたヒトの平均曝露量と比較して 70 倍超の曝露量比に相当した（2.4.4.10）。

局所性の血管変化は、内皮細胞肥大、内皮細胞下の肥厚又は炎症性細胞浸潤であり、主として脳の脈絡叢、肺及び注射部位で認められた。作用機序を詳細に検討した結果から、これらの所見は ADA の発生により生じる IC 形成により引き起こされたものであると結論され（2.4.4.6.3）、他のバイオ医薬品でもサルへの投与後に発生することが報告されている[15,16,17,18,19]。ADA に関連した IC の生成が動物の生理的な IC クリアランス容量を超えて形成されると、組織に IC が沈着し二次的に組織傷害が誘発される。13 週間及び 26 週間試験では、それぞれ 11 週間及び 13 週間の回復期間終了後に血管変化は認められず、予想された IC クリアランスと一致するものであった[19]。動物試験は、一般的にヒト治療用タンパク質製剤に対する免疫反応の予測性が乏しいことが認識されている[5,18,20]。ヒトではコンシズマブのようなヒト化 mAb に対する免疫反応は低いことが予想され、また、毒性試験の動物と比較してより低い濃度で曝露されることから、ヒトではクリアランス容量を超える IC 形成のリスクは低いと考えられる。

いずれの毒性試験においても、投与に関連したフィブリノゲンの減少並びに D-ダイマー及び TAT の増加が認められ、血液凝固系の活性化が示された。これらの所見に関して、26 週間及び 52 週間毒性試験の高用量群（≧3mg/kg、ヒト曝露量の平均値の 630 倍超）では、APTT 及び PT の軽微な延長、又は血小板数の減少が認められたこと以外に、血小板パラメータ、APTT 又は PT に毒性影響は認められなかった。これらの所見は、予想される血液凝固系に対する薬理作用と一致するものであった。

反復投与毒性試験を通じて、計 3 頭の死亡が認められた（表 2.4-7）。1 頭の死亡はおそらく投与に関連したものと考えられた。

表 2.4-7　　死亡動物及び死因（試験番号：209206、211087 及び 213542）

Study	**Cause of death**
13 weeks (Study ID 209206)	One male (10 mg/kg/day s.c.; 12M) was euthanised on Day 35 due to symptoms from the gastrointestinal tract and poor clinical condition, this was considered **unrelated to treatment**. This animal had a single early thrombus in the liver regarded as potentially related to treatment, but not the cause of the animal's poor condition.
26 weeks (Study ID 211087)	One female (9 mg/kg/day s.c.; 34F) was terminated prematurely in Week 18 due to adverse clinical signs in terms of subdued behaviour, pale gums, slow movements, shallow breathing and collapse. Histopathology showed coagulative necrosis of the lung parenchyma, with mononuclear inflammation and pleural fibrosis, potentially related to recent and older thrombi. In addition, vascular changes (subendothelial intimal thickening, endothelial hypertrophy and hyperplasia) were observed in the lung. The lung thrombi and necrosis in combination with a severe anaemia were considered the cause of the animal's moribund condition. This death was considered likely to be **treatment-related**.
52 weeks (Study ID 213542)	One male (0.5 mg/kg/day s.c.; 2009M) was euthanised during Week 20 following a fight with cage mates resulting in traumatic injuries. No treatment-related clinical signs or pathological findings were observed in this animal. This death was considered **unrelated to treatment**.

いずれの試験においても、最初は全用量でコンシズマブの曝露が認められたが、コンシズマブに対する ADA の発生は、特に最低用量での曝露量に影響を及ぼした。

要約すると、コンシズマブの安全性プロファイルは十分に特性解析がなされており、13、26 及び 52 週間毒性試験において 2 つの明らかな毒性所見として血栓及び限局性の血管変化が認められた。限局性の血管変化は ADA の発生により生じる IC 沈着によって引き起こされることが示され、これはサルにおけるヒト化 mAb の種の外来性に関連している可能性が高い。血栓は、想定される抗凝固作用物質の作用機序に起因する過剰な薬理作用と考えられた。

血栓に関する NOAEL は 52 週間皮下投与の 0.5 mg/kg/日であり、この用量は第 3 相臨床試験（4311 試験）から得られたヒトの平均曝露量に基づくと、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ のいずれも動物－ヒト曝露量比が 70 倍超の値に相当した（2.4.4.10）。

2.4.4.2　遺伝毒性

コンシズマブは mAb であり、天然の内因性アミノ酸から構成され、遺伝毒性を有すること又は DNA や染色体物資と直接的に相互作用するとは考えられない。コンシズマブの変異原性又は細胞増殖を示唆する作用機序データはない。したがって、ICH S6（R1）ガイドライン [5] に従い、コンシズマブの遺伝毒性試験は実施していない。

2.4.4.3 がん原性

コンシズマブはげっ歯類に作用しないことから、承認申請における標準的なげっ歯類を用いたがん原性試験を実施する意義はない。したがって、コンシズマブのがん原性評価は、作用機序、関連文献レビュー及び ICH S6（R1）ガイドライン [5] に準拠した、非臨床及び臨床データの評価を考慮した証拠の重み付け評価手法に基づいて行った。

腫瘍の成長及び転移は多因子が関与する非常に複雑なプロセスを経るが、このプロセスには血液凝固系も関与する。がん関連プロセスにおいて TF-FVIIa シグナル伝達には何らかの役割を果たすことはよく知られているが、生理的レベルの TFPI がこれらの反応に影響を及ぼすとは考えられない。コンシズマブにより TFPI が抑制されると、血液凝固プロセス下流におけるトロンビン生成が増加する。トロンビンはがんに関与するとされるシグナル伝達反応を介在することが報告されている。したがって、コンシズマブや血液凝固促進物質は、多くのがん種で認められる血液凝固亢進状態を含め、トロンビンの作用を増強する可能性が考えられる。

がんと TF、TFPI 及びヘパリンの生物学的特性との関係、並びにがんに関連した先天性 TFPI 欠損症の影響に関する文献を評価したが、腫瘍発生に対するコンシズマブの影響のリスクは示されていない。

コンシズマブはカニクイザルを用いた最長 52 週間の 1 日 1 回皮下投与による非臨床反復投与毒性試験において評価されている。これらの試験では、細胞増殖の徴候、血管新生、免疫抑制又は器官重量の変化は認められなかった。

コンシズマブは現在第 3 相臨床試験を 2 試験実施中である。これらの試験で報告された重篤な有害事象に加え、すでに完了した第 1 相試験と 2 種類の第 2 相臨床試験データからは、がんに関連した安全性上の懸念は認められていない。

ノボ ノルディスク社は、コンシズマブの発がん性は証拠の重み付け評価により適切に評価されたと考えている。他の血液凝固促進物質と同様に、コンシズマブの投与により、ある種のがん患者で認められる凝固亢進状態を増強する可能性があると結論付けられる。しかしながら、がん原性評価からは、コンシズマブの投与により、ヒトにおける腫瘍の発生が誘発又は増強されるリスクを高めるとの証拠は得られていない。

2.4.4.4 生殖発生毒性

生殖発生毒性試験は実施されていない。性成熟した雌雄カニクイザルを用いた 26 週間毒性試験では受胎能評価項目が組み入れられており、月経周期、精巣の長径・短径、精子数、精子運動性及び精子形態に投与の影響は認められなかった。幼若及び性成熟した雌雄カニクイザルを用いた最長 52 週間の毒性試験において、生殖器官の病理組織学的検査を実施した結果、生殖器官に及ぼす毒性は認められなかった。一方、正常な血液凝固能を有するカニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、種々の器官に血栓が認められている。血栓は過剰な薬理作用、すなわち、凝固カスケードの活性化と一致する（2.4.4.1）。血栓は流産のリスク要因の一つとなることが報告されており [21,22]、正常な血液凝固能

を有する動物に高用量のコンシズマブを投与すると、血栓が生じることにより生殖発生毒性が誘発される可能性がある。以上のことから、正常な血液凝固能を有する動物を用いてコンシズマブの生殖発生毒性試験を実施する意義はないと考えられる。

妊婦におけるモノクローナル抗体による TFPI 阻害の意義は不明であることから、妊娠中のコンシズマブの使用は推奨されない。

2.4.4.4.1　幼若動物を用いた毒性試験

これまでに毒性学的所見が認められた唯一の標的器官は血液凝固系であり、予想されるコンシズマブの薬理作用に一致する。ヒトの血液凝固系は出生後の早期の週又は月内に成熟し、ほとんどの血液凝固タンパク質濃度は、満期産児及び早産児とも 6 カ月齢で成人の値に近づく[23,24]。

コンシズマブの小児患者に対する毒性は、幼若（2～3 年齢）及び性成熟（3.5～6 年齢）した動物を用いた一般毒性試験プログラムで適切に特性解析されていると考えられ、幼若動物を用いた試験は実施されていない。

2.4.4.5　局所刺激性

局所刺激性は、カニクイザルを用いた反復投与毒性試験の一部に組み入れて、最大 50 mg/kg/日の皮下投与及び 200 mg/kg/週の静脈内投与で評価された。病理組織学的検査では、30 mg/kg/週を 26 週間静脈内投与した動物の 1 頭に血栓が認められたことを除いて、静脈内での注射部位に関連した所見は認められなかった。

皮下注射部位の病理組織学的検査から、最長 52 週間投与した全用量群で白血球の炎症細胞巣／血管周囲集積が認められた。

皮下注射部位で認められた局所性の影響は他のヒトタンパク質の皮下注射後の動物で認められたものと類似していた。この影響は可逆的であり、コンシズマブに対する免疫原性反応に関連しているものと考えられる。

観察された注射部位の変化は、ヒトタンパクの臨床投与において許容可能と考えられる。

2.4.4.6　その他の毒性試験

2.4.4.6.1　組織交差反応性（TCR）

初回ヒト投与試験に先立ち、選択したヒト及びカニクイザル細胞組織を用いて、コンシズマブによる TCR 試験を実施し、標的との結合性を評価し、ヒトとカニクイザル細胞組織における結合の類似性を評価した。予想された通り、コンシズマブによる結合は、TFPI の発現が既知の組織、すなわち内皮細胞、単核球及び紡錘細胞[25,26,27]で認められた。コンシズマブの結合は、TFPI の発現が知られていない細胞の細胞質内でも認められたが、*in vivo* でコンシズマブが細胞質に到達することはないと考えられる。

カニクイザルとヒトの組織間の交差反応性は類似し、適切な非臨床動物種としてカニクイザルの選択が支持された。

2.4.4.6.2 [redacted]及び[redacted]の特性評価

26 週間毒性試験で使用された被験物質には高含有量（[redacted]%）の[redacted]、特に[redacted]が含まれており、現在の保存期間中の[redacted]に関する有効期間内規格の限界値（[redacted]%）よりもはるかに高かった。反対に、4、13 及び 52 週間毒性試験で使用された被験物質は、[redacted]含量が低く（[redacted]%以下）、臨床試験で使用した被験物質との同等性・同質性が確認された。

26 週間反復投与毒性試験では、血栓及び血管変化が認められたことから、NOAEL は設定されず、それ故、不純物プロファイルの変化、すなわち[redacted]の高含有量がこれらの所見を説明し得るのか評価するため、特性解析を実施した。

[redacted]成分の特性解析から、[redacted]と[redacted]の両方が非共有結合的に会合し、本質的には不可逆性で十分な活性を有するものであることが示された。*In vitro* 試験において[redacted]と[redacted]で認められた唯一の相違は、複数のアッセイでコンシズマブの[redacted]が[redacted]よりも高い活性が認められたことと、コンシズマブの[redacted]は[redacted]に比較して種々の Fcγ 受容体（FcγR）からの解離が緩徐であることが示されたことであった。結合性、取り込み及び内在化は両バッチとも同等であった。種々のコンシズマブバッチのいずれも ADCC、活性化内皮細胞表面マーカー又は刺激影響下での FcγR を誘導しなかった。総合すると、これらのアッセイにおいてコンシズマブの[redacted]に及ぼす影響は非常に小さかった。この結果から、26 週間試験で認められた病理所見に関して、コンシズマブの[redacted]は、主に IC の生成を誘発する免疫原性に関連したことが示された（2.4.4.6.3）。

2.4.4.6.3 免疫複合体が介在する病態解明のための作用機序検討試験

13、26 及び 52 週間の反復投与毒性試験において、限局性の血管変化が主に注射部位、脳の脈絡叢及び肺で認められた。

コンシズマブ投与動物に認められた血管所見と同様の血管所見が、mAb を含む他のヒト型タンパク質投与のサルでも報告されており、注射されたタンパク質の免疫原性と関連付けられている[15,16,17,18,19]。大量の ADA により免疫複合体が形成された場合、動物では、このような免疫複合体に対する生理的なクリアランス容量を超えた場合には、組織沈着を引き起こす可能性がある。

26 週間及び 52 週間試験から得られたサル血漿及び細胞組織を用いた特殊検査を設定し、Society of Toxicological Pathology で組織されたワーキンググループが提唱する内容[19]に従い、証拠の重み付け評価手法を用いて血漿中及び組織中における IC の有無を評価した。

作用機序評価から組み合わせた証拠の重み付けに基づくと、13、26 及び 52 週間反復投与毒性試験で認められた限局性の血管変化は、局所的な IC 沈着を介したものと考えられた。コンシズマブで認めら

れた脈絡叢及び肺への局在を含む所見は、ヒト（ヒト化）タンパク質投与をサルに投与すると生じる変化と一致していた[15,16,17,18,19]。

2.4.4.6.4　コンシズマブによる予防治療を受ける患者における出血治療を非臨床的に裏付ける、rFVIIaとの相互作用試験

コンシズマブによる予防的治療を受ける血友病患者では、破綻出血に対する追加治療が必要となる可能性がある。

コンシズマブの非臨床毒性試験は、血液凝固系が正常な（非血友病）サル、すなわち FVIII 及び FIX 濃度が正常な動物を対象に実施された。以上より、ノボ ノルディスク社は、血友病患者における FVIII 製剤と FIX 製剤の併用時の安全性を裏付ける毒性試験が実施されたと考える。

コンシズマブの存在下でノボセブン®（rFVIIa）を追加した場合の薬物相互作用の可能性を評価するため、4 週間薬物相互作用毒性試験を実施した。

カニクイザルにコンシズマブを 1 日 1 回 28 日間静脈内投与後、第 28 日に rFVIIa 0.25、0.5 又は 1 mg/kg を 2 時間間隔で 3 回静脈内投与し、第 29 日に動物を安楽死処置した。血栓又はその他の過剰な凝固に関連した一般状態変化も含め、投与に関連した毒性は認められなかった。コンシズマブ又は rFVIIa 投与は、両薬物が存在するとき相加的傾向のある血液凝固系の活性化を示唆する TAT 及び D-ダイマーの増加を誘発した。

2.4.4.7　組織因子（TF）の発現が増加した状態における理論的影響

特定の病理学的状態、例えば重度の全身性感染症及び敗血症では、TF の発現が増加する場合がある。TFPI は TF 関連反応の制御に関与することから、TF の発現が増加した状況で TFPI が抑制されると、血栓形成が増加することにより、病理的状態が一層悪化する可能性が理論的に懸念されている。

非臨床試験データから、TFPI が抑制されると、内毒素血症又は重度敗血症の状態に影響を及ぼす可能性が示唆されている[28,29,30,31]。しかしながら、エンドトキシン血症及び敗血症の動物モデルはヒトへの外挿性が乏しいことが知られていることから[32,33,34,35]、これらの研究結果がコンシズマブの予防治療を受ける血友病患者に関連するかは不明である。

コンシズマブの非臨床安全性試験では、TF の発現が増加する状態について特に検討していない。このようなモデルは臨床状況への外挿性が乏しいことから、非臨床モデルで評価する意義はないと考えられる。

文献の報告に基づくと、仮に TF の発現が増加した患者にコンシズマブが使用される場合には、他の血液凝固促進物質で予想されるように、理論的には血栓事象の懸念は否定できない。

2.4.4.8 製剤中の添加物の安全性評価

製剤中の添加物（L-アルギニン塩酸塩、L-ヒスチジン、塩化ナトリウム、精製白糖、ポリソルベート80及びフェノール）は、いずれも既知のものであり、長期間の皮下及び静脈内投与で使用される、他の既承認医薬品における使用量と同等又はより高用量が使用されている。また、これらは日本薬局方に収載されている。

フェノールを除き、非臨床試験に含まれたすべての添加剤は臨床用製剤の濃度と同様であった。コンシズマブ製剤中のフェノール含量は0.35%（w/v）であり、1日1回の皮下投与により長期間使用されている既承認医薬品に含まれるフェノール含有量を下回っている。

2.4.4.9 不純物及び溶出物の安全性評価

ICH M4S（R2）ガイドライン[36]に準拠し、開発中に非臨床試験及び臨床試験で使用された被験物質の同等性・同質性が評価されている。4、13及び52週間毒性試験で使用された被験物質の品質は、臨床試験で使用された被験物質及び市販用製剤との同等性・同質性が確認された。一方、26週間毒性試験で使用された被験物質には高含有量の[redacted]、特に[redacted]が含まれており、臨床試験に用いられた代表的な被験物質ではないことから、26週間毒性試験バッチは不純物の安全性評価には用いられなかった。

原薬に関して、非臨床試験用バッチの製造工程由来不純物の含量が、提案される原薬の出荷時規格の評価基準と比較されており、毒性試験で使用された動物は、ヒトにおける最大臨床用量（0.25 mg/kg/日）と比較して、NOAEL投与でも同等かそれ以上に曝露されていたことが示された。製造工程由来不純物は原薬の規格で管理されており、製剤の製造における精製行程で効率的に除去された。したがって、製造工程由来不純物によるヒトでの毒性学的懸念は生じないと考えられる。

製剤に関して、非臨床試験用バッチにおける製造工程由来不純物の含量は、提案される有効期間内規格及び製品使用時の評価基準と比較されている。ヒトにおける最大臨床用量（0.25 mg/kg/日）と比較すると、毒性試験におけるNOAEL（0.5mg/kg/日）投与では、動物はより高濃度の不純物に曝露されていたことが示されている。

以上より、製剤中のコンシズマブの不純物は、非臨床試験において安全性が確認されたものと考えられ、提案される有効期間内規格及び製品使用時の評価基準は妥当と考えられる。

一次包装材料からの溶出物は評価されており、患者への安全性上の懸念はないと考えられる。

2.4.4.10 臨床曝露量と比較した慢性毒性試験の曝露量

第3相試験（4311試験）における用法・用量は、1日目に1 mg/kgを負荷投与後、以降は1日1回、0.20 mg/kg投与である。4週間投与後に測定される血漿中コンシズマブ曝露量に基づき、維持用量は1日1回、0.15、0.20又は0.25 mg/kgに増減された。曝露量比の算出に3用量がすべて使用された。

0.15 及び 0.25 mg/kg/日の用量は、0.2 mg/kg/日では高すぎる又は十分な血漿中曝露が得られない患者でのみ使用された。これらの曝露量の差異は個々の患者における TMDD の変動によって引き起こされる。

52 週間毒性試験の NOAEL である 0.5 mg/kg/日での曝露量（表 2.4-5）と 4311 試験の平均臨床曝露量との曝露量比を表 2.4-8 に示す。

表 2.4-8　　動物における慢性毒性試験の NOAEL とヒトの平均曝露量に基づく動物－ヒトの曝露量比

Clinical dose[a] (mg/kg/day)	**Exposure ratios (monkey/human)**[b]			
	At NOAEL (0.5 mg/kg/day)		**At lowest exposure level where thrombi were seen (1 mg/kg/day)**	
	C_{max} (ng/mL)	**$AUC_{0\text{-}24h\ SS}$ (h*ng/mL)**	**C_{max} (ng/mL)**	**$AUC_{0\text{-}24h\ SS}$ (h*ng/mL)**
0.2	71	85	264	308

[a] Clinical dosing regimen as described in text above. [b] Calculation of exposure ratios: Monkey exposure/human exposure. See 表 2.4-5 for monkey exposures. Clinical mean exposure was for C_{max}: 1,167 ng/mL, and for $AUC_{0\text{-}24h}$: 22,400 h*ng/mL (trial NN7415-4311).

Abbreviations: AUC = area under the concentration–time curve; C_{max} = maximum concentration.

以上より、NOAEL（0.5 mg/kg/日）におけるサルの血漿中曝露量は、ヒトの平均曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）の 70 倍超であった。

全体として、動物とヒトの曝露量比から十分な曝露マージンが得られ、臨床用法・用量の適切性が示された。

2.4.5　総括及び結論

コンシズマブは、TFPI の K2 ドメインを標的とする遺伝子組換えヒト化インタクト IgG4 モノクローナル抗体である。TFPI は血液凝固カスケードの初期相におけるダウンレギュレーションに関与する。コンシズマブは TFPI を阻害することにより、止血に十分なトロンビンが生成される。コンシズマブは、インヒビター保有の有無にかかわらず、HA と HB の両方の治療薬として開発されている。

非臨床安全性試験プログラムは、ICH M3（R2）、ICH S6（R1）及び ICH S7A ガイドライン [4,5,6] に従って策定され、重要な安全性試験は GLP に準拠して実施されている。コンシズマブの非臨床データは、効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験、PK／トキシコキネティクス試験、受胎能評価を含む毒性試験で構成される。生殖発生毒性試験、幼若動物を用いた試験、遺伝毒性試験及びがん原性試験は実施されなかった。がん原性リスクを評価するために、証拠の重み付け評価が実施された。

ウサギ、サル及びヒト由来の血液及び血漿を用いた非臨床 *in vitro* 薬理試験、並びに血友病ウサギを用いた *in vivo* 薬理試験から、臨床的に意味のある濃度でコンシズマブが薬理学的に望ましい血液凝固促進作用を有することが示された。

In vitro 及び *in vivo* 安全性薬理試験の結果から、コンシズマブに関連した懸念は認められなかった。

コンシズマブの PK は TMDD により非線形を示し、飽和が生じる高い血漿中濃度（> 20,000 ng/mL）ではクリアランスが低く、$t_{1/2}$ が長かった。蓄積は、クリアランス及び半減期から予想されるように、1 日 1 回投与の毒性試験で高く、週 1 回投与の試験では低かった。コンシズマブを皮下投与時のバイオアベイラビリティは、ウサギ及びサルで約 80%であった。カニクイザルを用いた反復投与毒性試験において、コンシズマブに対する ADA の発生が一部の動物の曝露量に影響を及ぼし、これらの動物の一部では凝固系に対するコンシズマブの機能的影響が逆転した。コンシズマブ濃度の増加は遊離 TFPI の低下と平行し、投与休止後又は ADA の発生に伴い血中のコンシズマブ濃度が低下すると遊離 TFPI 濃度が増加した。

幼若及び性成熟したカニクイザルを用いた 13、26 及び 52 週間毒性試験において、2 つの明らかな毒性所見として血栓及び限局性の血管変化が認められた。

血栓は、正常な血液凝固系を有する（非血友病）サルにコンシズマブのような血液凝固促進物質を投与した際の過剰な薬理反応と考えられた。血栓に関する NOAEL は、52 週間皮下投与の 0.5 mg/kg/日であり、この用量は第 3 相臨床試験（4311 試験）から得られたヒトの平均曝露量に基づくと、C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ のいずれも動物－ヒト曝露量比が 70 倍超の値に相当した。

限局性の血管変化は、ADA の発生により生じる細胞組織への IC 沈着により引き起こされたものであることが明らかとなった。限局性の血管変化は、IC の生成が動物の生理的な IC クリアランス容量を超えた場合に観察された。動物試験は、一般的にヒト治療用タンパク質製剤に対する免疫反応の予測性が乏しいことが認識されている [5,18,20]。患者にはコンシズマブのようなヒト化 IgG4 mAb に対する免疫

反応は低いことが予想され、また、毒性試験の動物と比較してより低い濃度で曝露されることから、ヒトではクリアランス容量を超える IC 形成のリスクは低いと考えられる。

いずれの毒性試験においても、投与に関連したフィブリノゲンの減少並びに D-ダイマー及び TAT の増加が認められ、血液凝固系の活性化が示された。これらの所見に関して、長期毒性試験の高用量群（≧3mg/kg、ヒト曝露量の平均値の 630 倍超）では、APTT 及び PT の軽微な延長、又は血小板数の減少が認められたこと以外に、血小板パラメータ、APTT 又は PT に毒性影響は認められなかった。これらの所見は、予想される血液凝固系に対する薬理作用と一致するものであった。

コンシズマブによる予防投与を受ける血友病患者における破綻出血の rFVIIa、aPCC、rFVIII 又は rFIX による治療リスクを評価するために、*in vitro*、*ex vivo* 及び *in vivo* での複数の薬物間相互作用試験が実施された。これらの試験では、コンシズマブ存在下で rFVIIa、aPCC、rFVIII 又は rFIX を投与した場合、主に相加作用が示され、得られた相互作用の総計に占める相乗作用の割合は最大 40%であった。全体として、これらのデータから、コンシズマブによる予防治療を受ける患者の破綻出血治療として、rFVIIa、aPCC、rFVIII 及び rFIX の使用の妥当性が裏付けられた。

コンシズマブは mAb であり、げっ歯類に作用しないことから、がん原性試験は実施しなかった。代わりに、作用機序、関連文献レビュー及び非臨床及び臨床データの評価を考慮した証拠の重み付け評価手法を適用して、コンシズマブのがん原性評価を実施した。結論として、他の血液凝固促進物質と同様に、コンシズマブの投与により、ある種のがん患者で認められる凝固亢進状態を増強する可能性があると結論付けられる。しかしながら、がん原性評価からは、コンシズマブの投与がヒトにおける腫瘍形成を誘発又は増強するリスクを高めるとの証拠は得られていない。

性成熟した雌雄カニクイザルを用いた 26 週間反復投与毒性試験の一部として受胎能を評価したが、受胎能に対するコンシズマブの影響は示されなかった。また、幼若及び性成熟した雌雄カニクイザルを用いた最長 52 週間の毒性試験において生殖器官の病理組織学的検査を実施した結果、生殖器官に及ぼす影響は認められなかった。

正常な血液凝固能を有する動物を用いてコンシズマブの生殖発生毒性試験を実施する意義はないと考えられることから、生殖発生毒性試験は実施されていない。妊娠女性における TFPI 阻害の意義は不明であることから、妊娠中のコンシズマブの使用は推奨されない。

反復投与毒性試験の一部として、コンシズマブの局所刺激性が評価されており、観察された注射部位の変化は、ヒトタンパクの臨床投与において許容可能と考えられる。

全体として、非臨床安全性試験からコンシズマブの有効性及び安全性プロファイルは適切に特性解析がなされており、非臨床データは提案する効能の取得におけるヒトへのコンシズマブの長期投与を裏付けると考える。

参考文献

[1] Guo L, Zhang H, Chen B. Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. J Cancer. 2017;8(3):410-6.

[2] Yang X, Wang F, Zhang Y, Wang L, Antonenko S, Zhang S, et al. Comprehensive Analysis of the Therapeutic IgG4 Antibody Pembrolizumab: Hinge Modification Blocks Half Molecule Exchange In Vitro and In Vivo. J Pharm Sci. 2015;104(12):4002-14.

[3] Godwin CD, Gale RP, Walter RB. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2017;31(9):1855-68.

[4] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2), Current step 4 version. 11 Jun 2009.

[5] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1), Current step 4 version. Parent guideline dated 16 July 1997. Addendum dated 12 June 2011 incorporated at the end of June 2011. 16 Jul 1997.

[6] ICH Harmonised Tripartite Guideline. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals S7A, Step 4 version. 08 Nov 2000.

[7] Seaman AJ, Malinow MR. Blood clotting in nonhuman primates. Lab Anim Care. 1968;18(1):80-4.

[8] Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. Arzneimittelforschung. 1994;44(6):793-7.

[9] Hilden I, Lauritzen B, Sorensen BB, Clausen JT, Jespersgaard C, Krogh BO, et al. Hemostatic effect of a monoclonal antibody mAb 2021 blocking the interaction between FXa and TFPI in a rabbit hemophilia model. Blood. 2012;119(24):5871-8.

[10] Makin A. Study Report (Study ID 202198). Effect on Coagulation and Cardiovascular Parameters in Rabbits with Intact Haemostatic System. 05 Jul 2006.

[11] Lupu C, Poulsen E, Roquefeuil S, Westmuckett AD, Kakkar VV, Lupu F. Cellular effects of heparin on the production and release of tissue factor pathway inhibitor in human endothelial cells in culture. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(9):2251-62.

[12] Dockal M, Pachlinger R, Hartmann R, Knappe S, Sorensen B, Wong WY, et al. Biological explanation of clinically observed elevation of TFPI plasma levels after treatment with TFPI-antagonistic Aptamer BAX 499. Blood. 2012;120(21):Abstract 1104.

[13] Wang W, Wang EQ, Balthasar JP. Monoclonal antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(5):548-58.

[14] Hansen L, Petersen LC, Lauritzen B, Clausen JT, Grell SN, Agersø H, et al. Target-mediated clearance and bio-distribution of a monoclonal antibody against the Kunitz-type protease inhibitor 2 domain of Tissue Factor Pathway Inhibitor. Thromb Res. 2014;133(3):464-71.

[15] Heyen JR, Rojko J, Evans M, Brown TP, Bobrowski WF, Vitsky A, et al. Characterization, Biomarkers, and Reversibility of a Monoclonal Antibody-induced Immune Complex Disease in Cynomolgus Monkeys (Macaca fascicularis). Toxicol Pathol. 2014;42(4):765-73.

[16] Leach MW, Rottman JB, Hock MB, Finco D, Rojko JL, Beyer JC. Immunogenicity/hypersensitivity of biologics. Toxicol Pathol. 2014;42(1):293-300.

[17] Rojko JL, Evans MG, Price SA, Han B, Waine G, DeWitte M, et al. Formation, Clearance, Deposition, Pathogenicity, and Identification of Biopharmaceutical-related Immune Complexes: Review and Case Studies 1. Toxicol Pathol. 2014;42(4):725-64.

[18] Brennan FR, Baumann A, Blaich G, de HL, Fagg R, Kiessling A, et al. Nonclinical safety testing of biopharmaceuticals - Addressing current challenges of these novel and emerging therapies. Regul Toxicol Pharmacol. 2015;73(1):265-75.

[19] Frazier KS, Engelhardt JA, Fant P, Guionaud S, Henry SP, Leach MW, et al. Scientific and Regulatory Policy Committee Points-to-consider Paper: Drug-induced Vascular Injury Associated with Nonsmall Molecule Therapeutics in Preclinical Development: Part I. Biotherapeutics 1. Toxicol Pathol. 2015.

[20] Food and Drug Administration, CDER and CBER. Guidance for Industry. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. Aug 2014.

[21] Meroni PL, Borghi MO, Raschi E, Tedesco F. Pathogenesis of antiphospholipid syndrome: understanding the antibodies. Nat Rev Rheumatol. 2011; 7 (6): 330-339.

[22] Sotiriadis A, Makrigiannakis A, Stefos T, Paraskevaidis E, Kalantaridou SN. Fibrinolytic defects and recurrent miscarriage: a systematic review and meta-analysis. Obstet Gynecol. 2007; 109 (5): 1146-1155.

[23] Chalmers EA. Neonatal coagulation problems. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2004;89(6):F475-8.

[24] Albisetti M. The fibrinolytic system in children. Semin Thromb Hemost. 2003;29(4):339-48.

[25] Bajaj MS, Steer S, Kuppuswamy MN, Kisiel W, Bajaj SP. Synthesis and expression of tissue factor pathway inhibitor by serum-stimulated fibroblasts, vascular smooth muscle cells and cardiac myocytes. Thromb Haemost. 1999;82(6):1663-72.

[26] Lwaleed BA, Bass PS. Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. J Pathol. 2006;208(3):327-39.

[27] Rugeri L, Susen S, Bard JM, Corseaux D, Gavériaux V, Devos P, et al. Monocyte tissue factor response is decreased in patients with hyperlipidemia. Thromb Res. 1999;96(4):283-92.

[28] Sandset PM, Warn-Cramer BJ, Maki SL, Rapaport SI. Immunodepletion of extrinsic pathway inhibitor sensitizes rabbits to endotoxin-induced intravascular coagulation and the generalized Shwartzman reaction. Blood. 1991;78(6):1496-502.

[29] Sandset PM, Warn-Cramer BJ, Rao LV, Maki SL, Rapaport SI. Depletion of extrinsic pathway inhibitor (EPI) sensitizes rabbits to disseminated intravascular coagulation induced with tissue factor: evidence supporting a physiologic role for EPI as a natural anticoagulant. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(3):708-12.

[30] Tang H, Ivanciu L, Popescu N, Peer G, Hack E, Lupu C, et al. Sepsis-induced coagulation in the baboon lung is associated with decreased tissue factor pathway inhibitor. Am J Pathol. 2007;171(3):1066-77.

[31] Wang BQ, Shi M, Zhang JP, Wu X, Chang MJ, Chen ZH, et al. Knockdown of TFPI-Anchored Endothelial Cells Exacerbates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury Via NF-κB Signaling Pathway. Shock. 2019;51(2):235-46.

[32] Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(10):854-65.

[33] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. The enigma of sepsis. J Clin Invest. 2003;112(4):460-7.

[34] Munford RS. Murine responses to endotoxin: another dirty little secret? J Infect Dis. 2010;201(2):175-7.

[35] Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Moldawer LL, Mohr AM, Efron PA. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? ILAR J. 2017;58(1):90-105.

[36] ICH Harmonised Tripartite Guideline. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Safety - M4S(R2). Nonclinical Overview and Nonclinical Summaries of Module 2. Organisation of Module 4, Current Step 4 version. 20 Dec 2002.