コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.1 緒言

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 2
表目次 2
略語一覧 3
2.6.1 緒言 7
2.6.1.1 薬剤の構造 7
2.6.1.2 薬理学的特性 8
2.6.1.3 効能又は効果、用法及び用量案 8
2.6.1.4 非臨床試験計画 9
2.6.1.5 名称 9
参考文献 10

図目次

ページ

図 2.6.1-1 コンシズマブの構造の概要 7
図 2.6.1-2 コンシズマブの作用機序 8

表目次

ページ

表 2.6.1-1 コンシズマブの用量及び濃度の変換 8

略語一覧

本略語一覧は、非臨床の概要文を通して使用されている共通の略語一覧である。したがって、略語の中には本概要文に関連しないものも含まれる場合がある。

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）
BSA	:	Bovine serum albumin（ウシ血清アルブミン）
C3	:	Complement component 3（補体第 3 成分）
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）
CHO	:	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CIC	:	Circulating immune complex（循環性免疫複合体）
CNS	:	Central nervous system（中枢神経系）
CoA	:	Certificate of analysis（分析証明書）
CP	:	Choroid plexus（脈絡叢）
CV	:	Coefficient of variation（変動係数）
DIC	:	Disseminated intravascular coagulation（播種性血管内凝固症候群）
DNA	:	Deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
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）
ELISA	:	Enzyme-linked immuno-sorbent assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EOSL		End-of-shelf-life（有効期間内規格）
EU		European Union（欧州）
FcR	:	Fc receptor（Fc 受容体）
FcγR	:	Fcγ receptor（Fcγ 受容体）
FDA	:	US Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
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）
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]
HRP	:	Horseradish peroxidase（西洋ワサビペルオキシダーゼ）
HSPG	:	Heparan sulfate proteoglycan（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）
hTFPI	:	Human tissue factor pathway inhibitor 1（ヒト組織因子経路インヒビター 1）
HUVEC	:	Human umbilical vein endothelial cells（ヒト臍帯静脈内皮細胞）
IC	:	Immune complex（免疫複合体）
ICAM-1	:	Intercellular adhesion molecule 1（細胞間接着分子 1）
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）
Incon	:	Inconclusive（決定的ではない）
INF	:	Interferon（インターフェロン）
INN	:	International Nonproprietary Name（国際一般名）
ISR	:	Incurred sample reanalysis
IU	:	International Units（国際単位）
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）
kDa	:	Kilo Daltons（キロダルトン）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限）
LMWH	:	Low molecular weight heparin（低分子量ヘパリン）
LOD	:	Level of detection（検出限界）
LPS	:	Lipopolysaccharide（リポ多糖）
mAb	:	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MRD	:	Minimum required dilution
N/A	:	Not applicable（該当なし）
NA	:	Not analysed（分析なし）
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）
NZW	:	New Zealand white（ニュージーランド白色種）
OD	:	Optical density（光学密度）
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
OPD	:	O-phenylenediamine dihydrochloride（O-フェニレンジアミン二塩酸塩）
pAb	:	Polyclonal antibody（ポリクローナル抗体）
PBMC	:	Peripheral blood mononuclear cells（末梢血単核球）
PBS	:	Phosphate buffered saline（リン酸緩衝生理食塩水）
PD	:	Pharmacodynamic(s)（薬力学）
PK	:	Pharmacokinetic(s)（薬物動態）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）
Pos	:	Positive（陽性）
PT	:	Prothrombin time（プロトロンビン時間）
QC	:	Quality Control（品質管理）
q.s.	:	Quantum satis（適量）
r	:	recombinant（遺伝子組換え）
rcf	:	Relative centrifugal force（相対遠心力）
Rac	:	Ratio of accumulation（蓄積比）
RE	:	Relative error（相対誤差）
rFVIIa	:	Recombinant activated coagulation factor VII（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
rFVIII	:	Recombinant coagulation factor VIII（遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）
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－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）

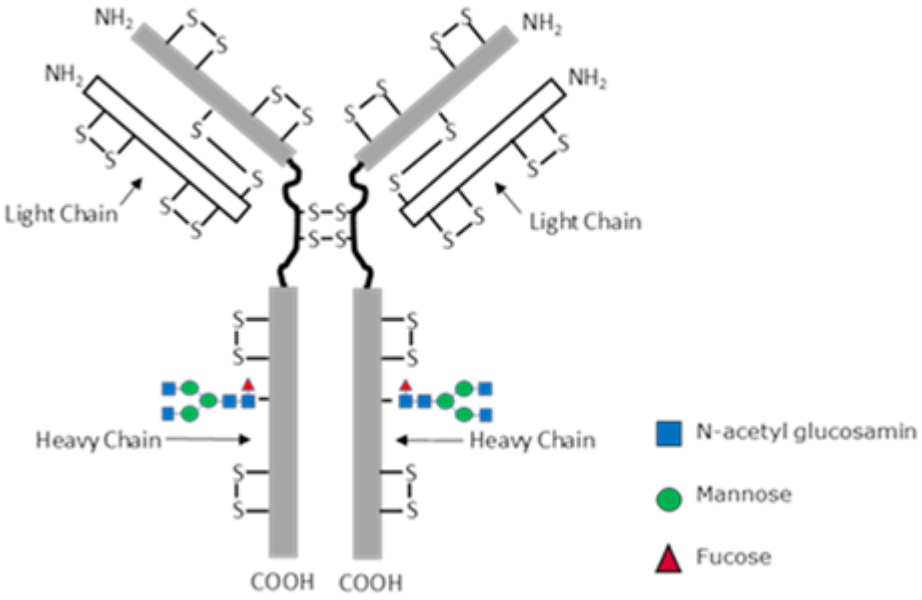
2.6.1　　緒言

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）に対して直接作用する遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体（mAb）であり、定期的に皮下投与することで出血に対する長期間の予防治療を目的としている。コンシズマブの作用機序から、血友病 A（HA）及び血友病 B（HB）患者に対して、インヒビター保有又は疾患の重症度の有無を問わずに使用可能と考えられる。

2.6.1.1　　薬剤の構造

コンシズマブは、TFPI のすべてのアイソフォームを標的とする、免疫グロブリン G4（IgG4）アイソタイプのヒト化インタクトモノクローナル抗体（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 2.6.1-1）。

図 2.6.1-1　　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 2.6.1-1 に示す。

表 2.6.1-1　　コンシズマブの用量及び濃度の変換

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

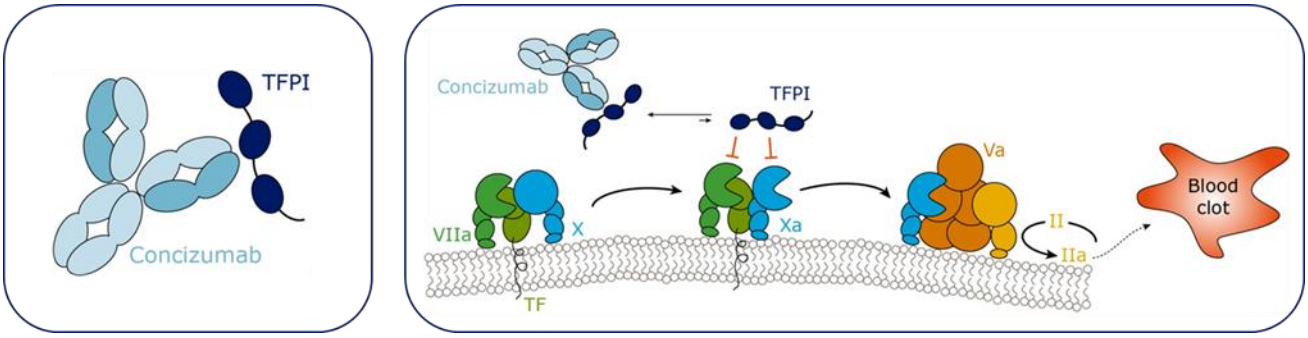
コンシズマブは、皮下注射用液剤として 1.5 及び 3 mL カートリッジに充填され、反復投与が可能なプレフィルドペン型デバイス（コンシズマブ用 PDS290 ペン型注入器）に組み込まれて提供される。本剤は透明～わずかに濁った無色～微黄色の液であり、半透明～白色のタンパク質微粒子が認められることがある。

2.6.1.2　薬理学的特性

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（図 2.6.1-2）。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 2.6.1-2　　コンシズマブの作用機序



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

2.6.1.3　効能又は効果、用法及び用量案

＜効能又は効果＞

血液凝固第Ⅷ因子又は第Ⅸ因子に対するインヒビターを保有する先天性血友病患者における出血傾向の抑制

＜用法及び用量＞

通常、12 歳以上の患者には、1 日目に負荷投与としてコンシズマブ（遺伝子組換え）1mg/kg を皮下投与する。2 日目以降は維持用量として 1 日 1 回、0.20mg/kg を皮下投与する。

なお、0.20mg/kg の投与を開始後、コンシズマブの血中濃度や患者の状態により、0.15mg/kg に減量又は 0.25mg/kg に増量できる。

2.6.1.4　非臨床試験計画

コンシズマブの非臨床データには、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／トキシコキネティクス試験、受胎能評価を伴う毒性試験が含まれる。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。毒性試験は、カニクイザルを用いて最長 52 週間まで実施した。コンシズマブによる予防治療を受けるインヒビターを保有す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（rFVIII）製剤又は遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子（rFIX）製剤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。

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。

2.6.1.5　名称

Chemical Abstract Service（CAS）番号：1312299-39-0

国際一般名称（INN）：concizumab

日本における医薬品の一般的名称（JAN）：コンシズマブ（遺伝子組換え）

コンシズマブの開発中、複数の名称が用いられてきた。非臨床文書では、以下の名称をコンシズマブの同義語として使用する。

- NNC0172-0000-2021 又は NNC 0172-0000-2021
- NNC0172-2021 又は NNC 0172-2021
- HzTFPI4F36
- mAb 2021
- anti-TFPI
- aTFPI

MuTFPI4F36 はコンシズマブがヒト化される前のマウス抗体であり、一部の非臨床薬理試験で使用されている。

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.

コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.2 薬理試験の概要文

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 4
略語一覧 6
2.6.2.1 まとめ 9
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 12
2.6.2.2.1 コンシズマブの標的疾患及び標的分子についての概説 12
2.6.2.2.1.1 血液凝固プロセス及び血友病 12
2.6.2.2.1.2 HA/HB に対する FVIII/FIX 補充療法 12
2.6.2.2.1.3 TFPI の役割 12
2.6.2.2.1.4 TFPI の構造 13
2.6.2.2.1.5 TFPI のアイソフォーム 13
2.6.2.2.1.6 TFPI の生体内分布 14
2.6.2.2.1.7 アンチトロンビン及び活性化タンパク質 C 15
2.6.2.2.1.8 抗 TFPI 抗体コンシズマブ 15
2.6.2.2.2 *In vitro* 薬理試験 1（TFPI に対する結合特異性） 15
2.6.2.2.2.1 コンシズマブのエピトープマッピング〔試験番号：209161（M 4.2.1.1-2)〕 15
2.6.2.2.2.2 TFPI に対するコンシズマブの結合親和性〔試験番号：210179（M 4.2.1.1-1)〕 17
2.6.2.2.3 *In vitro* 薬理試験 2（TFPI の中和） 18
2.6.2.2.3.1 コンシズマブは TFPI の FXa 活性／生成阻害作用を中和した〔試験番号：209144（M 4.2.1.1-6）及び 210180（M 4.2.1.1-7)〕 19
2.6.2.2.3.2 コンシズマブは内皮細胞における TFPI の FXa 生成阻害作用を中和した（試験番号：[redacted]080802） 20
2.6.2.2.3.3 コンシズマブはヒト血漿における FXa 生成を増加させた（Actichrome® TFPI 活性アッセイ）（試験番号：[redacted]100403） 21
2.6.2.2.3.4 コンシズマブは、ヒト、カニクイザル及びウサギ血漿における希釈プロトロンビン時間を短縮させた（試験番号：209168） 22
2.6.2.2.3.5 コンシズマブは血友病血漿におけるトロンビン生成を増加させた（参考資料：Waters EK, 2017） 23
2.6.2.2.3.6 コンシズマブはヒト及びカニクイザル全血における血栓形成を促進させた〔トロンボエラストグラフィー法（TEG)〕〔試験番号：[redacted]100201（M 4.2.1.1-10）及び [redacted]091002（M 4.2.1.1-5)〕 24
2.6.2.2.3.7 コンシズマブのマウス型は、FVIII が低濃度の多血小板血漿においてトロンビン生成及び血栓形成を促進させる〔試験番号：[redacted]080102（M 4.2.1.1-8)〕 26
2.6.2.2.3.8 *In vitro* 薬理試験の結論 27
2.6.2.2.4 *In vivo* 薬理試験 27

2.6.2.2.4.1 抗体誘発血友病を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用〔試験番号：[redacted]110403／[redacted]110701（M 4.2.1.1-12）、[redacted]100301（M 4.2.1.1-13）、[redacted]090801（M 4.2.1.1-14）、[redacted]100602（M 4.2.1.1-15）及び 300077（M 4.2.1.4-3）〕 27
2.6.2.2.4.2 抗体誘発血友病を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用持続時間〔試験番号：209164（M 4.2.1.1-16）〕 30
2.6.2.2.4.3 抗体誘発血友病を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを皮下投与したときの血液凝固促進作用〔試験番号：[redacted]090501（M 4.2.1.1-17）〕 31
2.6.2.2.4.4 非血友病ウサギにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固系に対する作用〔試験番号：[redacted]090201（M 4.2.1.1-18）及び[redacted]090802（M 4.2.1.1-19）〕 32
2.6.2.2.4.5 *In vivo* 薬理試験の結論 34
2.6.2.3 副次的薬理試験 35
2.6.2.3.1 コンシズマブは高濃度でのみ内皮細胞からの TFPI 遊離を誘発した〔試験番号：215093（M 4.2.1.2-1）〕 35
2.6.2.3.2 コンシズマブはプロテイン C の活性化及びアンチトロンビン活性に影響を及ぼさなかった 35
2.6.2.4 安全性薬理試験 36
2.6.2.4.1 *In vitro* における Fc 受容体（FcR）への結合 36
2.6.2.4.2 抗体依存性細胞傷害（ADCC） 37
2.6.2.4.3 抗原－抗体複合体依存性の補体結合 37
2.6.2.4.4 血液細胞への結合 37
2.6.2.4.5 *In vivo* 安全性薬理試験 38
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験 38
2.6.2.5.1 コンシズマブと rFVIIa との薬物相互作用 38
2.6.2.5.2 コンシズマブと aPCC との薬物相互作用 39
2.6.2.5.3 コンシズマブと rFVIII との薬物相互作用 40
2.6.2.5.4 コンシズマブと rFIX との薬物相互作用 41
2.6.2.5.5 薬物相互作用試験の結論 42
2.6.2.6 考察及び結論 43
参考文献 45

図目次

ページ

図 2.6.2-1 血液凝固の 3 相 12
図 2.6.6-2 TFPIα の構造の模式図 13
図 2.6.2-3 TFPI の生体内分布 14
図 2.6.2-4 コンシズマブの作用機序 15
図 2.6.2-5 TFPI の K2 におけるコンシズマブのエピトープ 16

図 2.6.2-6　ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、カニクイザル及びアカゲザルの TFPI K2 ドメインのアミノ酸配列 17
図 2.6.2-7　TFPI の FXa 活性／生成阻害作用に対するコンシズマブの作用 20
図 2.6.2-8　正常ヒト血漿における FXa 生成に対するコンシズマブの作用 22
図 2.6.2-9　ヒト、カニクイザル及びウサギの正常血漿における dPT に対するコンシズマブの作用 23
図 2.6.2-10　重症 HA 及び重症 HB 患者血漿におけるトロンビン生成に対するコンシズマブの作用 24
図 2.6.2-11　抗体誘発血友病 A 模倣及び血友病 B 模倣ヒト全血における TEG に対するコンシズマブの作用 25
図 2.6.2-12　抗体誘発血友病 A 模倣カニクイザル全血における TEG に対するコンシズマブの作用 26
図 2.6.2-13　ヒト血小板及び様々な濃度の FVIII を添加した FVIII 欠乏血漿におけるトロンビン生成に対する Mu4F36 の作用 27
図 2.6.2-14　抗体誘発血友病を有する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）の代表的な血液凝固促進作用（試験番号：[redacted]110403／[redacted]110701 及び [redacted]100301） 29
図 2.6.2-15　抗体誘発 HA を有するウサギにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用及び血漿中コンシズマブ濃度の変化 31
図 2.6.2-16　抗体誘発 HA を有する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）の血液凝固促進作用 32
図 2.6.2-17　正常ウサギにおける局所血栓形成に対する LMHW 存在下又は非存在下でのコンシズマブ（静脈内投与）の作用 34
図 2.6.2-18　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 35
図 2.6.2-19　HA 血漿プール又はコンシズマブによる予防治療中の HA 患者の血漿試料におけるトロンビン生成に対するコンシズマブと rFVII の併用作用 39
図 2.6.2-20　HA 血漿プール又はコンシズマブによる予防治療中の HA 患者の血漿試料におけるトロンビン生成に対するコンシズマブと aPCC の併用作用 40
図 2.6.2-21　HA 血漿プール又はコンシズマブによる予防治療中の HA 患者の血漿試料におけるトロンビン生成に対するコンシズマブと rFVIII の併用作用 41
図 2.6.2-22　HB 血漿プールにおけるトロンビン生成に対するコンシズマブと rFIX との併用作用 42

表目次

ページ

表 2.6.2-1　様々な動物種の TFPI に対する固定化コンシズマブの結合 18
表 2.6.2-2　*In vitro* アッセイにおけるコンシズマブの EC_{50} 値 18

表 2.6.2-3　ウサギ爪上皮出血モデルを用いた *in vivo* 薬理試験で使用された投与レジメン.....28
表 2.6.2-4　ヒト Fc 受容体に対するコンシズマブの結合定数（K_D）.....36

略語一覧

本略語一覧は、非臨床の概要文を通して使用されている共通の略語一覧である。したがって、略語の中には本概要文に関連しないものも含まれる場合がある。

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）
BSA	:	Bovine serum albumin（ウシ血清アルブミン）
C3	:	Complement component 3（補体第 3 成分）
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）
CHO	:	Chinese hamster ovary（チャイニーズハムスター卵巣）
CIC	:	Circulating immune complex（循環性免疫複合体）
CNS	:	Central nervous system（中枢神経系）
CoA	:	Certificate of analysis（分析証明書）
CP	:	Choroid plexus（脈絡叢）
CV	:	Coefficient of variation（変動係数）
DIC	:	Disseminated intravascular coagulation（播種性血管内凝固症候群）
DNA	:	Deoxyribonucleic acid（デオキシリボ核酸）
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）
ELISA	:	Enzyme-linked immuno-sorbent assay（酵素免疫吸着測定法）
EMA	:	European Medicines Agency（欧州医薬品庁）
EOSL		End-of-shelf-life（有効期間内規格）
EU		European Union（欧州）
FcR	:	Fc receptor（Fc 受容体）
FcγR	:	Fcγ receptor（Fcγ 受容体）
FDA	:	US Food and Drug Administration（米国食品医薬品局）
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）
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]
HRP	:	Horseradish peroxidase（西洋ワサビペルオキシダーゼ）
HSPG	:	Heparan sulfate proteoglycan（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）
hTFPI	:	Human tissue factor pathway inhibitor 1（ヒト組織因子経路インヒビター 1）
HUVEC	:	Human umbilical vein endothelial cells（ヒト臍帯静脈内皮細胞）
IC	:	Immune complex（免疫複合体）
ICAM-1	:	Intercellular adhesion molecule 1（細胞間接着分子 1）
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）
Incon	:	Inconclusive（決定的ではない）
INF	:	Interferon（インターフェロン）
INN	:	International Nonproprietary Name（国際一般名）
ISR	:	Incurred sample reanalysis
IU	:	International Units（国際単位）
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）
kDa	:	Kilo Daltons（キロダルトン）
LLOQ	:	Lower limit of quantification（定量下限）
LMWH	:	Low molecular weight heparin（低分子量ヘパリン）
LOD	:	Level of detection（検出限界）
LPS	:	Lipopolysaccharide（リポ多糖）
mAb	:	Monoclonal antibody（モノクローナル抗体）
MRD	:	Minimum required dilution
N/A	:	Not applicable（該当なし）
NA	:	Not analysed（分析なし）
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）
NZW	:	New Zealand white（ニュージーランド白色種）
OD	:	Optical density（光学密度）
OECD	:	Organisation for Economic Co-operation and Development（経済協力開発機構）
OPD	:	O-phenylenediamine dihydrochloride（O-フェニレンジアミン二塩酸塩）
pAb	:	Polyclonal antibody（ポリクローナル抗体）
PBMC	:	Peripheral blood mononuclear cells（末梢血単核球）

PBS	:	Phosphate buffered saline（リン酸緩衝生理食塩水）
PD	:	Pharmacodynamic(s)（薬力学）
PK	:	Pharmacokinetic(s)（薬物動態）
Ph. Eur.	:	European Pharmacopoeia（欧州薬局方）
PMDA	:	Pharmaceuticals and Medical Devices Agency（独立行政法人医薬品医療機器総合機構）
Pos	:	Positive（陽性）
PT	:	Prothrombin time（プロトロンビン時間）
QC	:	Quality Control（品質管理）
q.s.	:	Quantum satis（適量）
r	:	recombinant（遺伝子組換え）
rcf	:	Relative centrifugal force（相対遠心力）
Rac	:	Ratio of accumulation（蓄積比）
RE	:	Relative error（相対誤差）
rFVIIa	:	Recombinant activated coagulation factor VII（活性型遺伝子組換え血液凝固第 VII 因子）
rFVIII	:	Recombinant coagulation factor VIII（遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子）
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－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）

2.6.2.1 まとめ

コンシズマブは、組織因子経路インヒビター（TFPI）の Kunitz ドメイン 2（K2）に対する免疫グロブリン 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）である[1]。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因子であり、コンシズマブは TFPI のこの阻害活性を中和することにより、血友病 A（HA）又は血友病 B（HB）患者の止血を促進する。

コンシズマブの効力を裏付ける試験として、以下の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。

効力を裏付ける *in vitro* 試験

- X 線結晶構造解析によるヒト TFPI 上のエピトープマッピング
- 表面プラズモン共鳴（SPR）分析によるヒト及び動物の TFPI に対する結合親和性の測定
- 精製ヒトタンパク質を用いた TFPI 中和作用の測定
- ヒト内皮細胞上の TFPI に対する中和作用の測定
- ヒト血漿（正常及び血友病）における活性型血液凝固第 X 因子（FXa）生成改善作用及び FXa 生成後のトロンビン生成改善作用の評価
- ヒト及び動物の血漿における血栓形成改善作用の評価
- ヒト及び動物の全血（正常及び血友病モデル）における血栓形成改善作用の評価

効力を裏付ける *in vivo* 試験

- ウサギ爪上皮出血モデルにおける血液凝固促進作用の評価（静脈内及び皮下投与、血友病モデル；静脈内投与、非血友病モデル）

精製タンパク質［TFPI、FXa、血液凝固第 X 因子（FX）、活性型血液凝固第 VII 因子（FVIIa）及び組織因子（TF）］、内皮細胞、血漿及び全血を用いた *in vitro* 評価から、コンシズマブにより TFPI を中和すると FXa 及びトロンビンの生成が増加し、血栓形成が改善されることが示された。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。

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。ヒトのエピトープを一般的な実験動物における TFPI のアミノ酸配列と比較すると、ウサギ及びサル 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。

血栓形成アッセイにおいて、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、コンシズマブはカニクイザルの血液において全血血栓形成を改善し、EC_{50} 値はヒトの血液で得られた値と同程度であった。したがって、*in vivo* 試験にはウサギ血友病モデルを使用した。非臨床安全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。

In vivo proof-of-concept 試験は、抗体誘発 HA を有するウサギの爪上皮出血モデルを用いて実施した。コンシズマブを爪上皮切断前に 4 mg/kg 以上の用量で、切断後 5 分に 1 mg/kg 以上の用量で静脈内投与したとき、出血量の有意な減少が認められた。20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、作用が 7 日間持続した。コンシズマブを 10 mg/kg の用量で単回皮下投与したときには、投与後 24 時間に出血量の有意な減少が認められた。実験期間中、いずれの群においても血小板数に明らかな変化は認められなかった。非血友病ウサギにおいて、コンシズマブ（2 mg/kg、静脈内投与）は急性期の血液凝固系の活性化をほとんど誘導しないか又はわずかに誘導し、結紮顔面静脈障害後の局所血栓形成に関して、コンシズマブ投与後に低分子量ヘパリン〔LMWH、500 IU/kg（抗 FXa 活性）〕を投与すると局所血栓形成が抑制された。全体として、これらの試験から、コンシズマブは血液凝固促進活性を有し、血友病モデルにコンシズマブを静脈内及び皮下投与することにより出血が抑制され、血小板数への影響はほとんど又は全くないことが示された。

コンシズマブの副次的薬理試験として、以下の *in vitro* 試験を実施した。

***In vitro* 副次的薬理試験**

- ヒト内皮細胞からの TFPI 遊離に対する影響の検討
- ヒト内皮細胞におけるプロテイン C 活性化に対する影響の検討
- ヒト内皮細胞におけるアンチトロンビン（AT）に対する影響の検討

コンシズマブは、100 nmol/L（15,000 ng/mL）までの濃度において、内皮細胞からの TFPI の遊離を誘発しなかった。活性化プロテイン C（APC）及び AT は血液凝固カスケードの負の制御因子である。コンシズマブは、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）において、トロンボモジュリン（TM）結合型トロンビンによるプロテイン C 活性化に影響を及ぼさず、また TM 結合型トロンビンに対する AT の阻害作用にも影響を及ぼさなかった。

ヘパリンは内皮細胞[2]及び細胞外マトリックス[3]からの TFPI の遊離を誘発する。コンシズマブは内皮細胞の TFPI に結合するため、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。コンシズマブは高濃度（1 µmol/L、150,000 ng/mL）でのみ TFPI 遊離を約 2 倍に増加させ、この値はヘパリン及び TFPI の C 末端に結合する抗体で得られた値よりも小さかった。

コンシズマブの安全性薬理試験として、以下の *in vitro* 試験を実施したところ、安全性の懸念は認められなかった。

***In vitro* 安全性薬理試験**

- Fc 受容体（FcR）への結合の検討
- ヒト末梢血単核球細胞（PBMC）に対する抗体依存性細胞傷害（ADCC）の検討
- 抗原－抗体複合体依存性補体結合の検討
- ヒト血液細胞への結合の検討

非臨床安全性評価に関する医薬品規制調和国際会議（ICH）S6(R1)[4]及び ICH S7A[5]ガイドラインに従い、*in vivo* 安全性薬理評価項目〔血圧、心電図（ECG）、呼吸数、尿検査及び該当する中枢神経系（CNS）評価項目〕及びサイトカイン〔インターロイキン（IL）-2、IL-4、IL-5、IL-6、腫瘍壊死因子 α（TNFα）、インターフェロン（IFN）-γ〕放出の有無の評価は、カニクイザルを用いた用量設定毒性試験及び 13 週間反復投与毒性試験で実施した。また、52 週間毒性試験でも ECG 測定を実施した。これらのいずれの試験においても、安全性薬理評価項目に対するコンシズマブの影響は認められなかった。

コンシズマブの薬力学的薬物相互作用試験として、以下の *in vitro* 試験を実施した。

***In vitro* 薬力学的薬物相互作用試験**

- コンシズマブと遺伝子組換え活性型血液凝固第 VII 因子（rFVIIa）との相互作用の検討
- コンシズマブと活性型プロトロンビン複合体製剤（aPCC）との相互作用の検討
- コンシズマブと遺伝子組換え血液凝固第 VIII 因子（rFVIII）との相互作用の検討
- コンシズマブと遺伝子組換え血液凝固第 IX 因子（rFIX）との相互作用の検討

In vitro トロンビン生成試験において、血友病患者の破綻出血の治療に用いる止血剤との薬物相互作用の有無を検討したところ、コンシズマブと rFVIIa 又は aPCC を併用時の作用は主に相加的であったが、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。同様に、コンシズマブと rFVIII 又は rFIX とを併用したときの作用も主として相加的であり、相互作用の総計に占める相乗作用は認められないか、又は認められた場合の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 22%であった。ウサギ爪上皮出血モデルを用いた *in vivo* 試験において相加又は相乗作用を示す徴候は認められず、コンシズマブを投与したウサギに rFVIIa を投与しても毒性は認められなかった。

2.6.2.2　効力を裏付ける試験

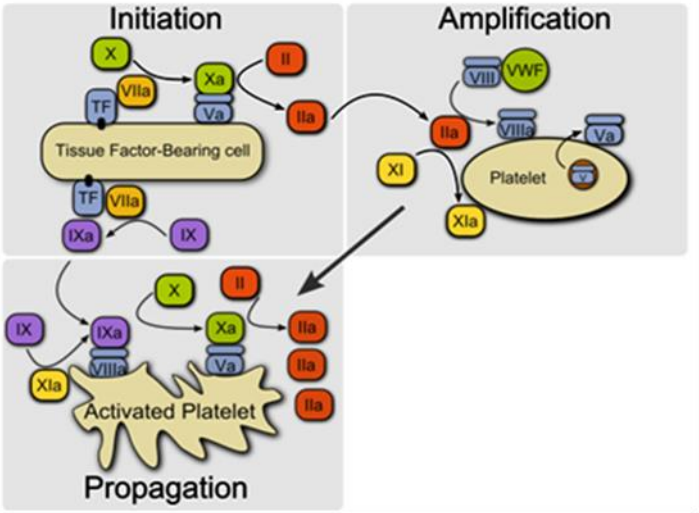
2.6.2.2.1　　コンシズマブの標的疾患及び標的分子についての概説

本項には、コンシズマブの作用機序に関する背景を文献に基づいて記載する。

2.6.2.2.1.1　血液凝固プロセス及び血友病

血液凝固プロセスは、初期相、増幅相及び伝播相の 3 相に分けられる（図 2.6.2-1）[6]。HA 及び HB 患者では血液凝固の開始は正常であるが、それぞれ血液凝固第 VIII 因子（FVIII）及び第 IX 因子（FIX）の欠乏により血液凝固プロセスにおける伝播が不十分であるため、活性化血小板における FXa 生成量が少なく、その結果として、プロトロンビナーゼ活性が低くなることにより、トロンビン生成量が少なく、出血障害が生じる。

図 2.6.2-1　　血液凝固の 3 相



Note: a = activated, II = prothrombin, IIa = thrombin, V, VII, VIII, IX, X, and XI = coagulation factor V, VII, VIII, IX, X, and XI, respectively, TF = tissue factor, vWF = von Willebrand factor. Adapted from Monroe *et al*, 2002[6].

2.6.2.2.1.2　HA/HB に対する FVIII/FIX 補充療法

HA 及び HB 患者に対する標準治療は、出血の予防及び治療のいずれにおいても、それぞれ欠乏している FVIII 及び FIX の補充療法である。補充療法に遺伝子組換えヒト血液凝固第 VIII 因子（rhFVIII）及び第 IX 因子（rhFIX）を使用することにより、アベイラビリティ、有効性及び安全性が向上した。しかし、rhFVIII 又は rhFIX を連続投与すると、FVIII 又は FIX に対する同種抗体が発現し、それらが rhFVIII 又は rhFIX に結合することにより有効性が低下する。したがって、タンパク質補充療法による限界を克服するための新機軸として、新規メカニズムによるトロンビン生成の回復に焦点が当てられている。

2.6.2.2.1.3　TFPI の役割

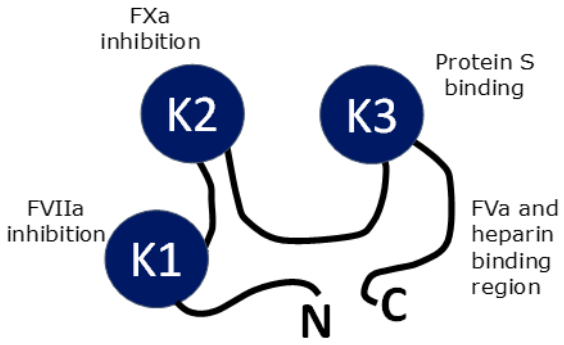
血液凝固の初期相は、血管壁が損傷し、内皮下細胞の TF が血液に曝露されて TF に FVIIa が結合することによって生じる。TF/FVIIa 複合体は FIX を FIXa に、FX を FXa に活性化する。この最初の

FVIIa/TF 介在性 FXa 生成は、FXa の活性部位に結合する TFPI によって厳密に制御されている。TFPI が FXa と複合体を形成すると速やかに TFPI/FXa が FVIIa/TF に結合し、FVIIa/TF の活性が低下する。また、TFPI は、FXa 及び部分的に活性化された活性型血液凝固第 V 因子（FVa）の両方と相互作用することにより、初期のプロトロンビナーゼ複合体を阻害する[7]。

2.6.2.2.1.4　TFPI の構造

TFPI は 3 つの Kunitz ドメインからなる内因性プロテアーゼインヒビターである（図 2.6.6-2）。Kunitz ドメイン 1（K1）は FVIIa の活性部位に、K2 は FXa の活性部位に結合し、Kunitz ドメイン 3（K3）はその阻害作用は知られていないが、プロテイン S に結合し、プロテイン S は TFPI と FXa との相互作用を刺激する[8]。また、K3 は C 末端部分とともに TFPI の細胞への固定に関与している[9]。塩基性に帯電した TFPI の C 末端部分は、ヘパリン及び血小板 FVa（すなわち初期のプロトロンビナーゼ複合体）などの部分的に活性化された FVa の B ドメインに露出している酸性領域に結合する[7]。コンシズマブは、FXa 結合部位と重なっている K2 ドメインのエピトープに結合する（2.6.2.2.2.1）。

図 2.6.6-2　　TFPIα の構造の模式図



Note: FVa, FVIIa, FXa = activated coagulation facor Va, FVIIa, FXa, respectively. K1, K2, K3 = Knunits domain 1, 2, 3, respectively, TFPI = tissue factor pathway inhibitpr.

2.6.2.2.1.5　TFPI のアイソフォーム

ヒトにおいて、スプライシングの異なる 2 つの主要な TFPI アイソフォーム（TFPIα 及び TFPIβ）が特定されている[10,11,12]。TFPIα は 3 つすべての Kunitz ドメイン及び塩基性に帯電した C 末端領域を有する完全長型である。TFPIα は内皮細胞及び巨核球により産生される。TFPIβ は K1 及び K2 を有する TFPI のスプライスバリアントである。K3 ドメイン及び C 末端領域は無関係な C 末端領域に置換されており、それによってグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーの結合が生じる。コンシズマブは TFPIα 及び TFPIβ 両方の K2 ドメインに結合することにより、両スプライスバリアントの機能を阻害する。

Kunitz ドメインは、タンパク質分解酵素の機能を阻害する別のタンパク質にも存在している。そのうち組織因子経路インヒビター2（TFPI-2）は、3 つの Kunitz ドメインを有し、TFPI-K2 との配列一致率が低い（33～47%）。TFPI-2 は、トリプシン、キモトリプシン、プラスミン、血漿カリクレイン及

び FXIa を阻害し（Ki = 2～25 nmol/L）、FXa 及び FVIIa/TF はほとんど阻害しない[13]。コンシズマブは TFPI-2 には結合しない[14]。

2.6.2.2.1.6　TFPI の生体内分布

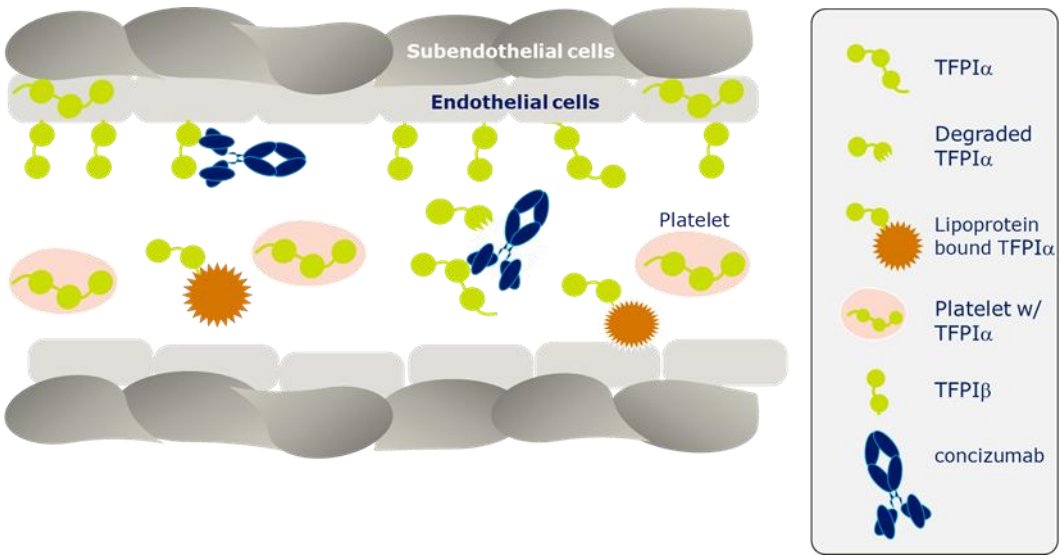
TFPI は内皮細胞の表面及び内部、血小板内及び血漿中に認められる（図 2.6.2-3）[10, 15]。

内皮細胞：活性型 TFPI の大半は内皮細胞表面に認められ、これには TFPIα 及び GPI アンカーで固定された TFPIβ の両方が含まれる。TFPIα の内皮への結合は、細胞表面のグリコサミノグリカンとの静電気学的相互作用又はまだ特定されていない GPI 結合型コレセプターを介して起こると考えられる。TFPI の内皮プールには、血漿中濃度の 10 倍を超える TFPI が含まれていると推定される[15]。最近のデータから、内皮に結合している TFPIα は、内皮細胞表面よりもむしろ細胞外マトリックスに認められることが示されている[3]。

血漿：健康なヒトにおける血漿中 TFPI 濃度平均値は 1.6 nmol/L（70 ng/mL）である[15]。TFPIα は活性を有する完全長型、部分的な活性を有する切断型及びリポタンパク質が結合した不活性型として存在する。

血小板：TFPIα は巨核球に発現し、血小板内の α 顆粒とは別の場所に貯蔵され、血小板の活性化時に放出される。血小板内に貯蔵されている TFPIα は、血中総 TFPIα の 8～10%である。しかし、血小板が凝集している損傷部位では、局所 TFPIα 濃度が血漿中 TFPIα 濃度の 30 倍を超える場合がある[15]。FVIII 及び TFPI の両方が欠乏したマウスを用いた試験において、TFPI 含有血小板を移植すると、TFPI 欠乏血小板を移植したマウスと比較して、出血モデルでの出血量が有意に増加した。このことから、血小板内 TFPI は、血友病における出血の重要な生理学的制御因子である可能性が示された[16]。

図 2.6.2-3　　TFPI の生体内分布



Note: TFPI = tissue factor pathway inhibitor.

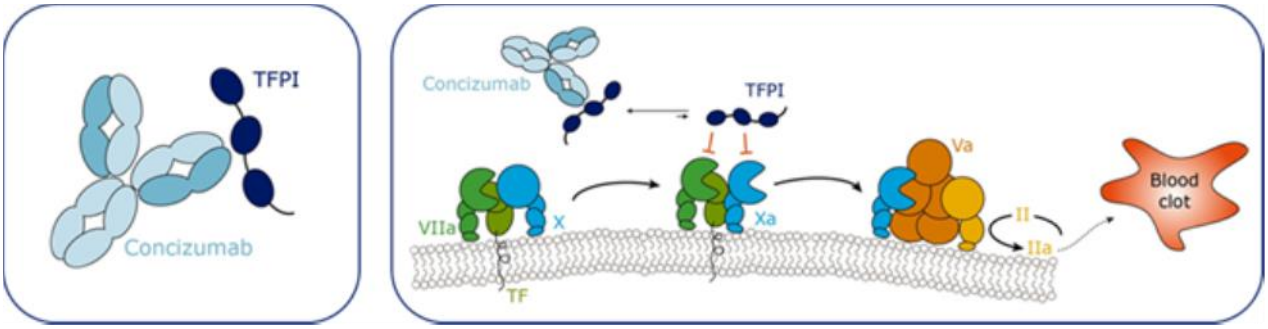
2.6.2.2.1.7　アンチトロンビン及び活性化タンパク質 C

TFPI に加えて、血液凝固に対するその他の内因性インヒビターもまた血液凝固が損傷部位に限定されるように働いている。AT は血漿中セリンプロテアーゼインヒビターであり、主にトロンビン及び FXa を阻害して、これらの活性化酵素が循環血中に存在しないように働いている[17]。プロテイン C 系は、トロンビンが無傷内皮の TM に結合すると活性化される。APC は、単独で又はそのコファクターであるプロテイン S と結合して、FVa 及び FVIIIa をタンパク質分解により不活化する[18]。

2.6.2.2.1.8　抗 TFPI 抗体コンシズマブ

コンシズマブは、ヒト TFPI の K2 ドメインに対するヒト化 mAb である。コンシズマブは、FXa の活性部位に対する TFPI の結合を阻害することにより、FXa 及び FVIIa/TF/FXa 複合体の両方並びに初期のプロトロンビナーゼ複合体（FVa/FXa）の阻害を抑制する（図 2.6.2-4）。TFPI の阻害活性が低下すると、FVIIa/TF 複合体により産生された FXa が、より多量のプロトロンビンを活性化してトロンビンを生成し、それによって血栓形成が促進され、場合によっては止血も促進される。コンシズマブの作用機序は FVIII 及び FIX の有無には左右されないため、インヒビター作用を有する抗 FVIII 又は抗 FIX 同種抗体の生成に関係なく、HA 及び HB 両方の患者の治療薬として開発されている。

図 2.6.2-4　　コンシズマブの作用機序



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

2.6.2.2.2　*In vitro* 薬理試験 1（TFPI に対する結合特異性）

2.6.2.2.2.1　コンシズマブのエピトープマッピング〔試験番号：209161（M 4.2.1.1-2）〕

［目的］

コンシズマブは、ヒト TFPI の K2 ドメインを標的とするマウス抗 TFPI mAb である Mu4F36 に基づくヒト化 mAb である。TFPI の K2 ドメインと Mu4F36 の抗原結合フラグメント（Fab）とを共結晶化させ、その複合体の構造を X 線結晶構造解析で明らかにした。

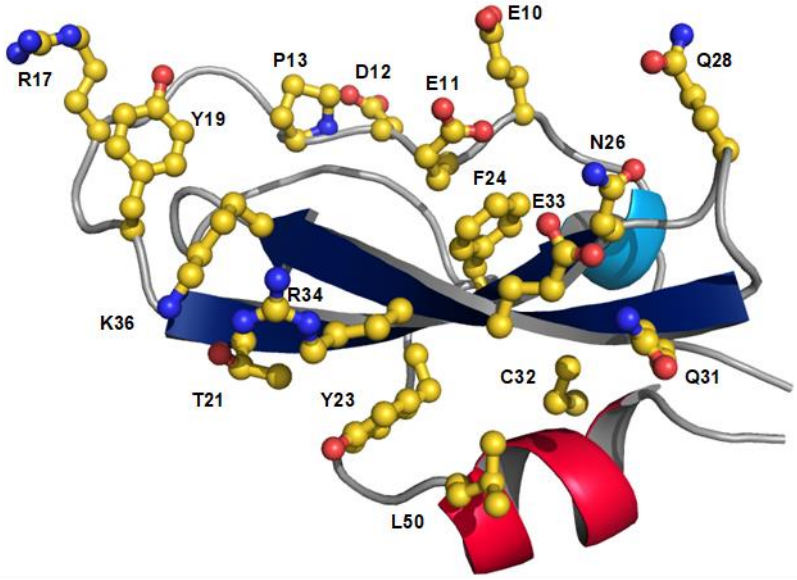
［方法］

K2 ドメイン及び Mu4F36 の Fab フラグメントを遺伝子組換えによって製造し、共結晶化させ、その複合体の構造を X 線結晶構造解析で明らかにした。K2－Mu4F36 Fab 複合体 3 次元構造を、タンパク質構造データバンク（PDB）を用いた分子置換法により解析した。

［結果］

K2 における Mu4F36 の結合エピトープは、14 のアミノ酸残基 E10、E11、P13、R17、Y19、T21、Y23、Q28、Q31、E33、R34、F35、K36 及び L50 で構成されていた。4Å を cut-off とした場合に K2 におけるコンシズマブの結合エピトープ複合体を Mu4F36 Fab のものと比較すると、D12、F24、N26、C32 が含まれ、F35 は含まれなかった（図 2.6.2-5）。エピトープの定義を 5Å に伸長した場合には、D12、F24、N26、C32、F35、43 及び E48 がエピトープに含まれた[1]。アミノ酸残基 R17、Y19、R34 及び K36 は、FXa の結合に重要と考えられる残基と重なっていた〔M 2.6.3.2：209161（M 4.2.1.1-2）〕[1]。

図 2.6.2-5　　TFPI の K2 におけるコンシズマブのエピトープ



Note: Amino acid side chains included in the epitope are represented by yellow ball and sticks. Red and blue balls correspond to oxygen and nitrogen atoms, respectively. Secondary structural elements are marked with blue (β-sheets) and red (α-helix). Source: 209161

K2－Mu4F36 Fab 複合体で得られたのと同じエピトープアミノ酸残基を有する Kunitz ドメインについて、Uniprot データベースで *in silico* 検索を行ったところ、同じエピトープを有するものはヒト、サル及びウサギの TFPI K2 のみであった。ヒト及び一般的な実験動物（マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、カニクイザル及びアカゲザル）の TFPI K2 のアミノ酸配列を図 2.6.2-6 に示す。ヒト、ウサギ、カニクイザル及びアカゲザルの配列では、17 のエピトープ残基（太字で示す）がすべて一致していたが、マウス、ラット、ブタ及びイヌの配列では不一致のものがあった（図 2.6.2-6）。ヒト K2 との配列一致率は、カニクイザル K2 が 96%、ウサギ K2 が 93%であった。

図 2.6.2-6　　ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、イヌ、カニクイザル及びアカゲザルの TFPI K2 ドメインのアミノ酸配列

Species	Uniprot	K2 domain numbering																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Human	P10646	Q	E	K	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**P**	G	I	C	**R**	G	**Y**	I	**T**	R	**Y**	**F**	Y
Mouse	O54819	A	E	R	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**P**	G	L	C	**R**	G	**Y**	M	**K**	R	**Y**	**L**	Y
Rat	Q02445	A	E	K	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**P**	G	I	C	**R**	G	**F**	M	**T**	R	**Y**	**F**	Y
Rabbit	P19761	K	G	K	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**P**	G	I	C	**R**	G	**Y**	I	**T**	R	**Y**	**F**	Y
Pig	B5ST96	K	E	K	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**A**	G	I	C	**R**	G	**Y**	I	**T**	R	**Y**	**F**	Y
Dog	Q28874	L	E	K	P	D	Y	C	H	M	**N**	**E**	**D**	**S**	G	L	C	**R**	G	**F**	V	**T**	R	**Y**	**Y**	Y
Cyno monkey	A0A2K5UGS2	K	E	K	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**P**	G	I	C	**R**	G	**Y**	I	**T**	R	**Y**	**F**	Y
Rhesus monkey	Q28864	Q	E	K	P	D	F	C	F	L	**E**	**E**	**D**	**P**	G	I	C	**R**	G	**Y**	I	**T**	R	**Y**	**F**	Y

Species	Uniprot	K2 domain numbering, continued																							
		26	27	**28**	29	30	**31**	**32**	**33**	**34**	35	**36**	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	**50**
Human	P10646	**N**	N	**Q**	T	K	**Q**	**C**	**E**	**R**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	**L**
Mouse	O54819	**N**	N	**Q**	T	K	**Q**	**C**	**E**	**R**	F	**V**	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	E	T	**L**
Rat	Q02445	**N**	N	**Q**	S	K	**Q**	**C**	**E**	**Q**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	S	N	N	F	E	T	**L**
Rabbit	P19761	**N**	N	**Q**	S	K	**Q**	**C**	**E**	**R**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	L	N	N	F	E	S	**L**
Pig	B5ST96	**N**	N	**Q**	S	K	**Q**	**C**	**E**	**R**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	L	N	N	F	E	S	**L**
Dog	Q28874	**N**	N	**V**	S	S	**K**	**C**	**E**	**G**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	L	N	N	F	E	T	**L**
Cyno monkey	A0A2K5UGS2	**N**	N	**Q**	S	K	**Q**	**C**	**E**	**R**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	**L**
Rhesus monkey	Q28864	**N**	N	**Q**	S	K	**Q**	**C**	**E**	**R**	F	**K**	Y	G	G	C	L	G	N	M	N	N	F	E	T	**L**

Note: Epitope amino acid residues are shown in bold.　cyno = cynomolgus, K2 = second Kunits domain
Source: Study 209161 and Uniprot database

［結論］

TFPI K2 におけるコンシズマブのエピトープは、アミノ酸残基 E10、E11、D12、P13、R17、Y19、T21、Y23、F24、N26、Q28、Q31、C32、E33、R34、K36 及び L50 で構成されていた。ヒト、ウサギ及びサルの TFPI K2 のアミノ酸配列では、これらのアミノ酸残基がすべて一致していた。このエピトープは K2 における FXa の結合部位と重なっていたことから、コンシズマブは TFPI の FXa への結合を阻害することが示唆された。

2.6.2.2.2.2　TFPI に対するコンシズマブの結合親和性〔試験番号：210179（M 4.2.1.1-1）〕

［目的］

ヒト、カニクイザル及びウサギ TFPI に対するコンシズマブの結合親和性を SPR 分析で評価することを目的として試験を実施した。

［方法］

SPR 装置（GE Healthcare Biacore）のセンサーチップ CM5 にコンシズマブを直接固定化した。ヒト、カニクイザル又はウサギ TFPI を、様々な濃度で、一定の流速（30 µL/min）の緩衝液中にインジェクトし、結合を SPR で分析した。

［結果］

ヒト、カニクイザル及びウサギ TFPI に対するコンシズマブの結合定数（K_D）の値はそれぞれ 0.04、0.06 及び 0.22 nmol/L であった。これらの値のほか、ヒト、カニクイザル及びウサギ TFPI に対する会合定数（k_a）及び解離定数（k_d）の値も同程度であった〔M 2.6.3.2、試験番号：210179（M 4.2.1.1-1）及び表 2.6.2-1〕。

表 2.6.2-1　　様々な動物種の TFPI に対する固定化コンシズマブの結合

TFPI	Association rate constant k_a ($M^{-1} \times s^{-1}$)	Dissociation rate constant k_d (s^{-1})	Binding constant K_D (nmol/L)
Human	1.7×10^6	6.3×10^{-5}	0.04
Cynomolgus monkey	4.2×10^6	2.3×10^{-4}	0.06
Rabbit	1.3×10^6	2.8×10^{-4}	0.22

k_a = association rate constant, k_d = dissociation rate constant, K_D = binding constant　Source: 210179

［結論］

ヒト、カニクイザル及びウサギ TFPI に対するコンシズマブの K_D 値は同程度であり、いずれも nmol/L 未満であったことから、コンシズマブはヒト、カニクイザル及びウサギの TFPI に高い親和性で同程度によく結合することが示された。この結果から、ヒト、ウサギ及びサルの TFPI K2 配列において、コンシズマブのエピトープに決定されたアミノ酸残基がすべて同じであることが示された。

2.6.2.2.3　　*In vitro* 薬理試験 2（TFPI の中和）

精製タンパク質（TFPI、FXa、FVIIa/TF/FXa）、内皮細胞、血漿及び全血を用いた種々の *in vitro* 系において、コンシズマブは TFPI を中和した。EC_{50} 値はすべてのアッセイで低 nmol/L 又は nmol/L 未満であった（表 2.6.2-2）。

表 2.6.2-2　　*In vitro* アッセイにおけるコンシズマブの EC_{50} 値

Assay	EC_{50} (nmol/L)[a]	Study ID
Neuralization of TFPI directly inhibiting FXa (n=1, duplicate analysis)	0.8	209144 (M 4.2.1.1-6)
Neuralization of TFPI inhibiting FXa generation (n=1, duplicate analysis)	1.1	210180 (M 4.2.1.1-7)
Neuralization of TFPI inhibiting FXa generation on endothelial cells (n=3)	<0.5	[redacted]080802 (M 4.2.1.1-8)
Enhancement of FXa generation in plasma in Acticrome TFPI® activity assay (n=4)	6 ± 1	[redacted]100403 (M 4.2.1.1-9)
Shortening of dPT (n=3) in Normal human plasma Human FVIII-deficient plasma Cynomolgus monkey plasma Rabbit plasma	 0.56 ± 0.01 0.62 ± 0.20 0.41 ± 0.09 0.49 ± 0.02	209168 (M 4.2.1.1-3)
TEG in antibody-induced HA- and HB-mimetic human whole blood (n=4)[b] Clot time, HA-mimetic blood Clot time, HB-mimetic blood MTG, HA-mimetic blood MTF, HB- mimetic blood	 0.43 ± 0.14 0.44 ± 0.13 2.2 ± 0.7 2.6 ± 0.9	[redacted]100201 (M 4.2.1.1-10)
TEG in antibody-induced HA-mimetic cynomolgus whole blood (n=4)[b] Clot time MTG	 0.38 ± 0.09 0.54 ± 0.26	[redacted]091002 (M 4.2.1.1-5)

[a] Mean ± SD,　[b] values for TEG experiments are based on blood concentrations. Approximate plasma EC50 values can be obtained by multiplying with 2 to correct for haematocrit.

dTP = dilute prothrombin time, HA = haemophilia A, HB = Haemophilia B, MTG = maximal velocity of thrombus generation, TEG = thromboelastography.

2.6.2.2.3.1　コンシズマブは TFPI の FXa 活性／生成阻害作用を中和した〔試験番号：209144（M 4.2.1.1-6）及び 210180（M 4.2.1.1-7）〕

［目的］

TFPI は 2 つの作用機序〔1 つ目は FXa の触媒活性に対する直接阻害作用、2 つ目は FVIIa/TF 複合体による FXa 生成（FX から FXa への変換）に対する阻害作用〕で FXa を阻害する。TFPI に対するコンシズマブのこれらの中和活性を無細胞系で評価することを目的として、2 つの試験を実施した。

［方法］

実験 1（試験番号：209144）：ヒト完全長 TFPI（TFPI-1α、6 nmol/L）を溶媒〔50 mmol/L HEPES、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L $CaCl_2$ 及び 100 µg/mL ウシ血清アルブミン（BSA）〕又はコンシズマブ（0.24～15 nmol/L）とともに 30 分間プレインキュベートした。ラッセルクサリヘビ毒で完全に活性化したヒト FXa（5 nmol/L）を添加し、その混合物を更に 30 分間インキュベートした。残存している FXa 活性を、FXa に対する発色基質を用いて測定した。コンシズマブ及び TFPI 非存在下での FXa 活性を 100%の FXa 活性とした。

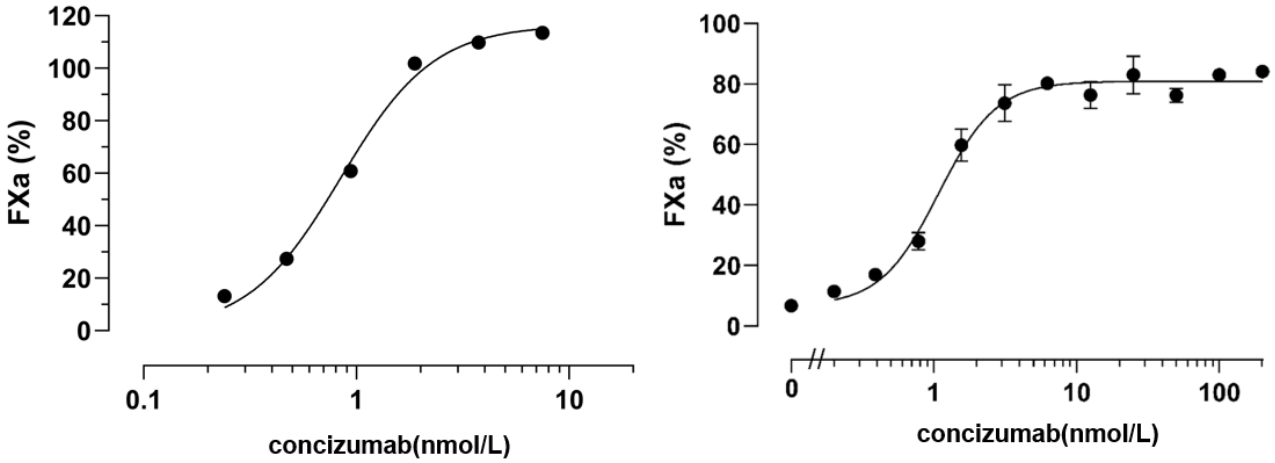
実験 2（試験番号：210180）：ヒト完全長 TFPI をヒト FX（160 nmol/L）、ヒト FVIIa（10 pmol/L）、脂質化されたヒト TF（10 pmol/L）及び溶媒（50 mmol/L HEPES、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L $CaCl_2$ 及び 100 µg/mL BSA）又はコンシズマブ（0.2～200 nmol/L）とともに 40 分間インキュベートした。生成した FXa の活性を、FXa に対する発色基質を用いて測定した。コンシズマブ及び TFPI 非存在下での FXa の生成を 100%の FXa 生成とした。

［結果］

実験 1：FXa 活性は TFPI（6 nmol/L）とのインキュベーションにより阻害され、TFPI 非存在下で得られた活性の 0.3%に減少した。TFPI をコンシズマブ（0.24～15 nmol/L）とともにプレインキュベートすると、FXa 活性は濃度依存的に増加し、TFPI 非存在下での FXa 活性の 102～118%まで回復した。EC_{50} 値は 0.8 nmol/L であった（表 2.6.2-2）〔M 2.6.3.2、試験番号：209144（M 4.2.1.1-6）〕。

実験 2：FXa 生成は TFPI（1 nmol/L）により減少し、活性が TFPI 非存在下で得られた値の 10%未満に減少した。コンシズマブ（0.24～15 nmol/L）は FXa 生成を濃度依存的に増加させ、TFPI 非存在下での FXa 生成の 80%まで回復させた。EC_{50} 値は 1.1 nmol/L であった〔表 2.6.2-2、M 2.6.3.2、試験番号：210180（M 4.2.1.1-7）〕。

図 2.6.2-7　　TFPI の FXa 活性／生成阻害作用に対するコンシズマブの作用



Note: Each point represents TFPI inhibition of FXa activity (left; 2019144) and TF/FVIIa down-regulation by TFPI/FXa (right; 210180).
Data are mean ± SEM (1 experiment with duplicate).

［結論］

TFPI は 2 つの作用機序（1 つ目は FXa の触媒活性に対する直接阻害作用、2 つ目は FVIIa/TF 複合体による FXa 生成に対する阻害作用）で FXa を阻害した。コンシズマブはこれら両方のメカニズムを中和し、EC_{50} 値はそれぞれ 0.8 及び 1.1 nmol/L であった。

2.6.2.2.3.2　コンシズマブは内皮細胞における TFPI の FXa 生成阻害作用を中和した（試験番号：[redacted]080802）

［目的］

TF 存在下における血管内皮細胞上の TFPI は、この細胞表面における FVIIa 介在性 FXa 生成を阻害する。本試験では、初代培養 HUVEC 及びヒト内皮様細胞株 ECV304（いずれも TFPI を構成的に発現しており、刺激により TF を発現させた）における TFPI の FXa 生成阻害作用に対するコンシズマブの中和活性を評価した。

［方法］

HUVEC 及び ECV304 細胞をヒト TNFα（20 ng/mL）及びヒト IL-1β（20 ng/mL）で 2 時間刺激し、TF の発現を誘導した。次に、細胞をヒト FVIIa（50 pmol/L）、ヒト FXa（50 pmol/L）及び溶媒（25 mmol/L HEPES、137 mmol/L NaCl、3.5 mmol/L KCl、5 mmol/L $CaCl_2$ 及び 1 mg/L BSA）又はコンシズマブ（0.3～20 nmol/L）とともに 30 分間インキュベートした。FX（50 nmol/L）を添加し、細胞を更に 40 分間インキュベートした。生成した FXa を、FXa に対する発色基質を用いて定量した。

ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識コンシズマブ及び ^{125}I 標識コンシズマブを用いた競合的酵素免疫吸着測定法（ELISA）で、コンシズマブが HUVEC に結合することを確認した（M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]100601）[1]。

［結果］

コンシズマブの添加により FXa 生成は約 2 倍に増加し、EC_{50} 値はいずれの細胞系でも 0.5 nmol/L 未満であった（表 2.6.2-2）（M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]080802）。コンシズマブ（0.3～20 nmol/L）は HUVEC に結合し、K_D 値は 0.1～0.4 nmol/L であった。

［結論］

コンシズマブは HUVEC に結合し（K_D 値は 0.1～0.4 nmol/L）、HUVEC 及び ECV304 細胞（いずれも TFPI 及び TF を発現）において細胞介在性 FXa 生成を増加させた（EC_{50} 値は 0.5 nmol/L 未満）。上記の結果に基づくと、FXa 生成の増加は、コンシズマブが内皮細胞表面において TFPI を中和し、TF/FVIIa 介在性 FXa 生成が回復したことに起因すると考えられる。

2.6.2.2.3.3　コンシズマブはヒト血漿における FXa 生成を増加させた（Actichrome® TFPI 活性アッセイ）（試験番号：[redacted]100403）

［目的］

本試験において、ヒト血漿中 FXa 生成に対するコンシズマブの作用を市販のキット（Actichrome® TFPI 活性アッセイ）で評価した。アッセイにおける FXa 活性の増加は、血漿中 TFPI の FXa 形成阻害作用を中和することによって生じると考えられている。

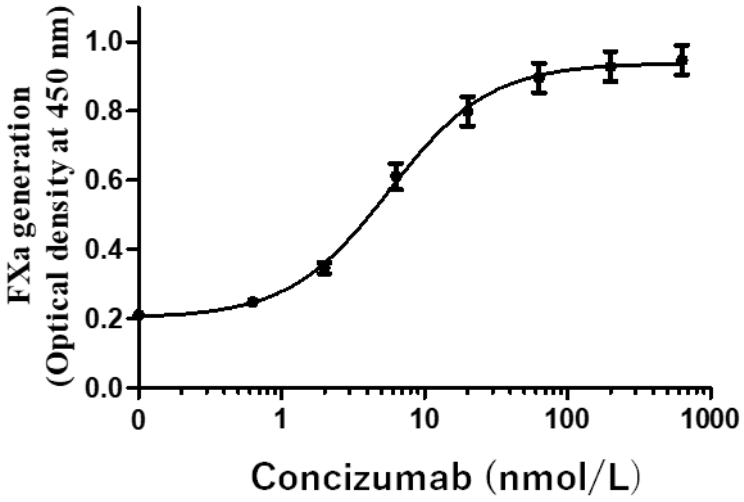
［方法］

0.1 U/mL の TFPI、FVIIa 及び脂質化 TF（Actichrome® TFPI 活性アッセイ付属品）を含有するヒト正常血漿を、コンシズマブ（0.6～600 nmol/L）とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。FX を添加し、その混合物を更に 37°C で 15 分間インキュベートした。生成した FXa の活性を、FXa に対する発色基質を用いて測定した。

［結果］

コンシズマブは FXa 生成を濃度依存的に増加させ、EC_{50} 値は約 6 nmol/L であった（図 2.6.2-8）（表 2.6.2-2）（M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]100403）。

図 2.6.2-8　　正常ヒト血漿における FXa 生成に対するコンシズマブの作用



Note: Each point represents a mean ± SEM (n=4 in duplicates). Source: [redacted]100403

［結論］

コンシズマブは、正常血漿において、血漿中 TFPI の FXa 生成阻害作用を中和することにより FXa 生成を増加させ、EC_{50} 値は約 6 nmol/L であった。

2.6.2.2.3.4　コンシズマブは、ヒト、カニクイザル及びウサギ血漿における希釈プロトロンビン時間を短縮させた（試験番号：209168）

［目的］

ヒト、カニクイザル及びウサギの血漿中 TFPI に対するコンシズマブの中和活性を、希釈プロトロンビン時間（dPT）アッセイと称される改変凝固時間法により測定した。

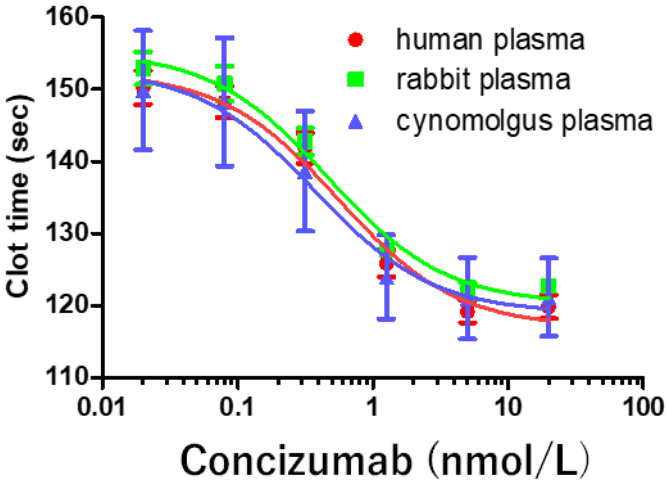
［方法］

市販の正常ヒト血漿（HemosIL）、ヒト FVIII 欠乏血漿（Dade Behring）、カニクイザル血漿（Huntingdon Life Sciences）及びウサギ血漿にコンシズマブ（0.625～2 nmol/L）を添加した。次に、遺伝子組換えヒト TF（15,000 倍希釈 Innovin、Dade Behring）及び $CaCl_2$（20 mmol/L）を添加し、凝固時間を ACL 300 又は ACL 9000（Instrumentation Laboratory）で測定した。

［結果］

コンシズマブはヒト正常血漿、カニクイザル血漿及びウサギ血漿の dPT を短縮させ、EC_{50} 値はそれぞれ 0.57、0.408 及び 0.490 nmol/L であった（図 2.6.2-9）。また、コンシズマブはヒト FVIII 欠乏血漿の dPT を短縮させ、EC_{50} 値は 0.620 nmol/L であった（表 2.6.2-2）。

図 2.6.2-9　　ヒト、カニクイザル及びウサギの正常血漿における dPT に対するコンシズマブの作用



Note: NNC 0172-0000-2021 = concizumab. Data are mean and SEM of n=3.

［結論］

コンシズマブはヒト血漿（正常血漿及び FVIII 欠乏血漿の両方）、カニクイザル血漿及びウサギ血漿の dPT を短縮させ、EC_{50} 値は約 0.5 nmol/L と同程度であったことから、コンシズマブはヒト、カニクイザル及びウサギの血漿中内因性 TFPI に対して同程度の強い中和効力を示すことが明らかになった。この結果から、コンシズマブがヒト、サル及びウサギの TFPI を認識して同程度によく結合することが示された。

2.6.2.2.3.5　コンシズマブは血友病血漿におけるトロンビン生成を増加させた（参考資料：Waters EK, 2017）[19]

［目的］

HA 及び HB 患者血漿におけるトロンビン生成に対するコンシズマブの作用を評価することを目的として試験を実施した。

［方法］

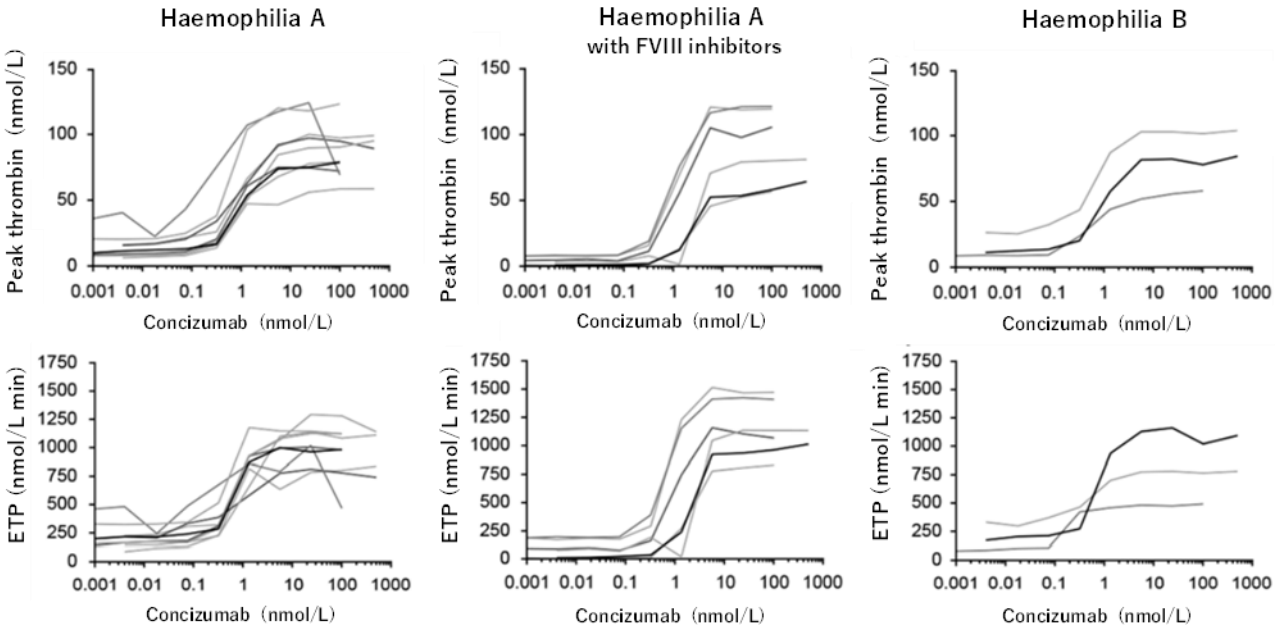
重症 HA 患者（FVIII 値が正常値の 1%未満）15 例及び重症 HB 患者（FIX 値が正常値の 1%未満）3 例を含む 18 例の患者から乏血小板血漿（PPP）を調製した。15 例の HA 患者のうち、ベセスダ法の Nijmegen 変法で FVIII インヒビター（抗 FVIII 同種及び自己抗体）が検出されたのは 6 例であった。PPP にコンシズマブ（0.001～500 nmol/L）を添加し、TF（1 pmol/L）、リン脂質及びカルシウムを添加することにより、トロンビン生成を開始させた。トロンビン生成曲線を Calibrated Automated Thrombogram システムでモニタリングし、トロンビンのピーク値（生成したトロンビンの最大濃度）及び総トロンビン生成量（ETP、トロンビン生成曲線下面積）を測定した。

［結果］

コンシズマブは重症 HA 患者（FVIII インヒビターを保有する及び保有しない）及び重症 HB 患者の血漿における TF 誘発トロンビン生成を濃度依存的に増加させた。3 つのすべての群において、コンシ

ズマブの 10 nmol/L 以上の濃度でトロンビンのピーク値及び ETP がプラトーに達し（図 2.6.2-10）、健康対照血漿の値と同程度になった（Waters EK, 2017）[19]。

図 2.6.2-10　　重症 HA 及び重症 HB 患者血漿におけるトロンビン生成に対するコンシズマブの作用



Note: Each point represents an individual patient plasma from HA without FVIII inhibitors (left, n = 9), HA with FVIII inhibitors (middle, n = 6), and HB (right, n = 3). ETP = endogenous thrombin potential, FVIII = coagulation factor VIII, HA = hemophilia A, HB = hemophilia B. (Source: Waters EK, 2017)[19]

［結論］

コンシズマブは重症 HA 患者血漿（FVIII インヒビター含有及び不含）及び重症 HB 患者血漿における TF 誘発トロンビン生成を濃度依存的に増加させた。コンシズマブは 10 nmol/L 以上の濃度でトロンビン生成を健康対照血漿と同じレベルまで増加させた。個々の血漿では値にばらつきがみられたが、重症 HA 患者と重症 HB 患者の間及び HA 血漿における FVIII インヒビター（抗 FVIII 同種／自己抗体）の非存在下と存在下の間で、刺激時のトロンビン生成に明らかな差は認められなかった。

2.6.2.2.3.6　コンシズマブはヒト及びカニクイザル全血における血栓形成を促進させた〔トロンボエラストグラフィー法（TEG）〕〔試験番号：[redacted]100201（M 4.2.1.1-10）及び[redacted]091002（M 4.2.1.1-5）〕

［目的］

抗体により血友病様の病態を誘発した（抗 FVIII IgG 又は抗 FIX IgG により FVIII 又は FIX を阻害した）ヒト及びカニクイザル全血における血栓形成に対するコンシズマブの作用を評価することを目的として、2 つの試験を実施した。

［方法］

実験 1、ヒト全血 TEG〔試験番号：[redacted]100201（M 4.2.1.1-10）〕：4 例の男性健康被験者から採取した全血にクエン酸を添加し、ヒツジ抗ヒト FVIII IgG 中和抗体及びヒツジ抗ヒト FIX IgG 中和抗体とともに室温で 30 分間インキュベートすることにより、それぞれ抗体誘発 HA 模倣及び HB 模倣ヒト全

血を調製した。コンシズマブ（0.01～500 nmol/L）を添加し、低濃度の TF（0.03 pmol/L）及びカルシウムで血液凝固を誘発した。

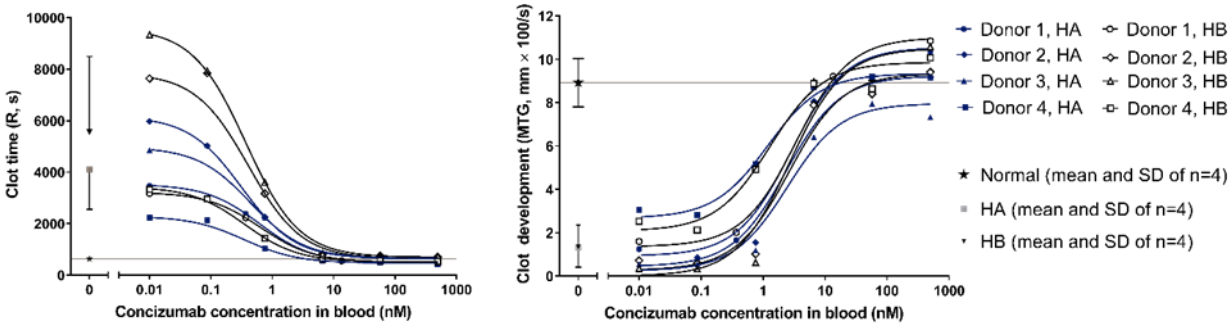
実験 2、カニクイザル全血 TEG〔試験番号：[redacted]091002（M 4.2.1.1-5）〕：6 頭の雄カニクイザルから採取した全血にクエン酸を添加し、ヒツジ抗ヒト FVIII IgG 中和抗体とともに室温で 30 分間インキュベートすることにより、抗体誘発 HA 模倣カニクイザル全血を調製した。コンシズマブ（0.01～50 nmol/L）を添加し、低濃度の TF（0.03 pmol/L）及びカルシウムで血液凝固を誘発した。

両実験において、凝固時間（最初のフィブリン形成までの時間）及び血栓形成の最高速度〔最高血栓形成速度（MTG）〕を TEG アナライザーで測定した。

［結果］

実験 1：ヒト全血アッセイにおけるドナー間のばらつきは大きかったものの、コンシズマブは濃度依存的に、4 例の正常な全血検体で得られた平均値と同じレベルまで、凝固時間を短縮させ（図 2.6.2-11 左）、MTG を増加させた（図 2.6.2-11 右）。HA 模倣血液と HB 模倣血液で得られた EC_{50} 値は同程度であった。凝固時間に対する EC_{50} 値は、HA 模倣血液が 0.43 ± 0.14 nmol/L、HB 模倣血液が 0.44 ± 0.13 nmol/L であった。血栓形成（MTG）に対する EC_{50} 値は、それぞれ 2.2 ± 0.7 及び 2.6 ± 0.9 nmol/L であった（表 2.6.2-2）〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]100201（M 4.2.1.1-10）〕。特記すべきこととして、EC_{50} 値は血中濃度に基づいているため、血漿中 EC_{50} の概略値はそれを 2 倍することによって得られる（ヘマトクリットを 50%と想定）。

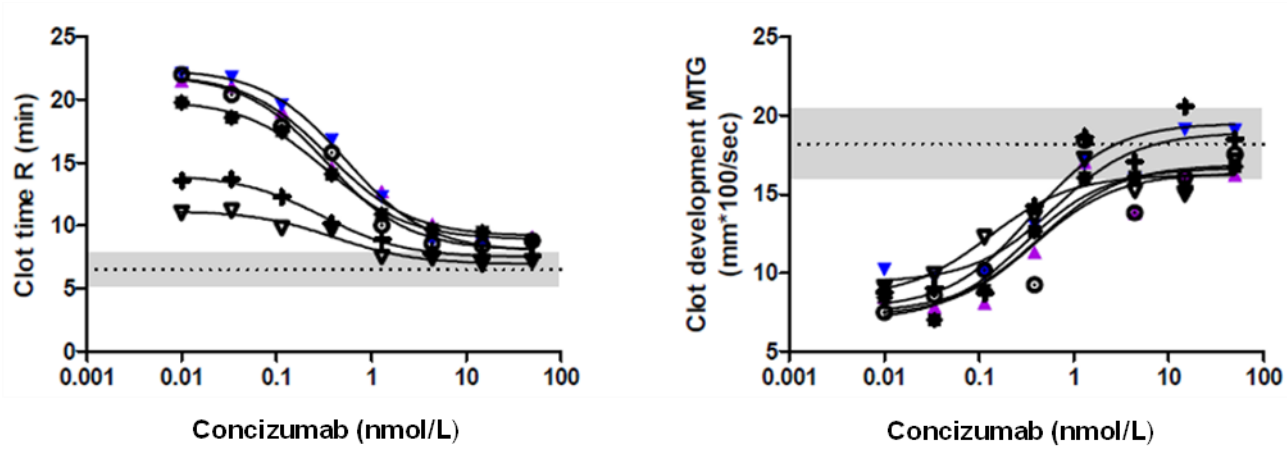
図 2.6.2-11　抗体誘発血友病 A 模倣及び血友病 B 模倣ヒト全血における TEG に対するコンシズマブの作用



Note: Each point represents clot time (left panel) or clot development MTG (right panel) for individual antibody-induced HA-mimetic and HB-mimetic human whole blood obtained from 4 male donors. ■ and ▼ represent mean ±SD (n=4) for HA-mimetic and HB-mimetic human whole blood, respectively. ★and the line represents mean ±SD (n=4) for normal human whole blood. HA = haemophilia A, HB = haemophilia B, MTG = maximal velocity of thrombus generation Source: [redacted]100201

実験 2：6 頭のカニクイザルから得られた抗体誘発 HA 模倣全血を用いて同様の TEG アッセイを実施した。コンシズマブは濃度依存的に、6 頭の正常全血で得られた平均値と同じレベルまで、凝固時間を短縮させ（図 2.6.2-12 左）、MTG を増加させた（図 2.6.2-12 右）。凝固時間に対する EC_{50} 値は 0.38 ± 0.09 nmol/L、MTG に対する EC_{50} 値は 0.54 ± 0.26 nmol/L であった（表 2.6.2-2）〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]091002（M 4.2.1.1-5）、値は血中濃度に基づく〕。

図 2.6.2-12　　抗体誘発血友病 A 模倣カニクイザル全血における TEG に対するコンシズマブの作用



Note: Each point represents an clot time (left panel) or clot development MTG (right panel) for individual antibody-induced HA-mimetic whole blood obtained form 6 cynomolgus monkeys. The dashed line and gray area represents normal range as mean ±SD (n=8）of cynomolgus monkey normal whole blood. HA = haemophilia A, MTG = maximal velocity of thrombus generation, NNC 0172-0000-2021 = concizumab　Source: [redacted]091002

［結論］

抗体誘発 HA 模倣ヒト血液、HB 模倣ヒト血液及び HA 模倣カニクイザル血液において、コンシズマブは濃度依存的に血液凝固プロセスを改善し、EC_{50} 値は同程度で、nmol/L 未満～低 nmol/L であった。3 つのすべてのモデルにおいて、凝固時間及び MTG は正常値に到達した。これらの結果から、コンシズマブは HA 及び HB 模倣血液の両方に止血促進能を示すことが確認された。

2.6.2.2.3.7　コンシズマブのマウス型は、FVIII が低濃度の多血小板血漿においてトロンビン生成及び血栓形成を促進させる〔試験番号：[redacted]080102（M 4.2.1.1-8）〕

［目的］

本試験では、様々な FVIII 濃度の多血小板血漿におけるトロンビン生成に対する Mu4F36（コンシズマブのマウス型）の作用を評価した。

［方法］

クエン酸を添加した FVIII 欠乏ヒト血漿（Helena）に TF（0.12 pmol/L）、洗浄血小板（135,000 /μL、リン脂質の代わり）及び様々な濃度の遺伝子組換えヒト FVIII（ReFacto®、0.05～1 IU/mL、正常値の 0～100%の FVIII に相当）を添加した。FVIII の濃度 0.005 IU/mL（0.5%）及び 0.05 IU/mL（5%）はそれぞれ重症及び中等症 HA に相当する。カルシウムを添加することにより、Mu4F36（10 nmol/L）の非存在下又は存在下で血液凝固を開始させた。5000 シリーズ TEG アナライザーでトロンビン生成を連続的に 120 分まで測定した。

［結果］

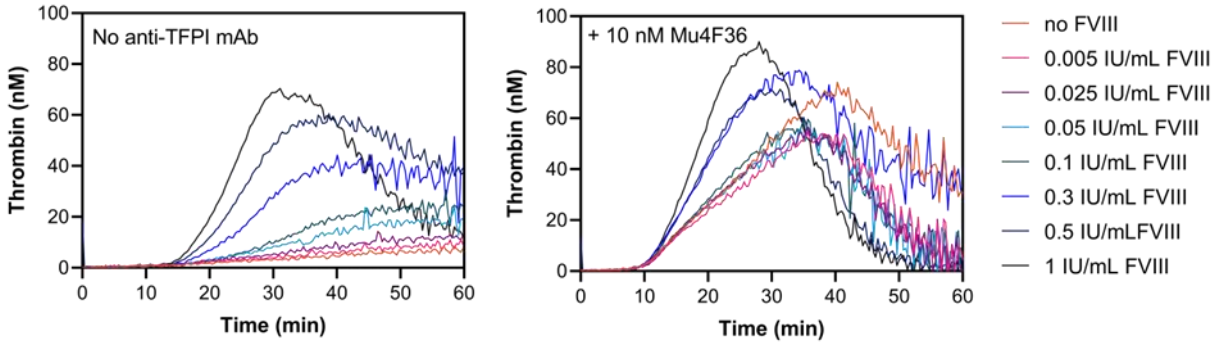
FVIII はトロンビン生成を濃度依存的に増加させた（図 2.6.2-13 左）。Mu4F36（10 nmol/L）は FVIII の非存在下又は低濃度（0～0.05 IU/mL）においてトロンビン生成を著しく増加させた（図 2.6.2-13

右）。Mu4F36 によるトロンビン生成の増加作用は、FVIII がより高濃度（0.5～1 IU/mL）であっても認められたが、低濃度ではより顕著に認められた〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]080102（M 4.2.1.1-8）〕。

［結論］

コンシズマブのマウス型である Mu4F36（10 nmol/L）は、FVIII の非存在下又は低濃度（0～0.05 IU/mL）においてトロンビン生成を著しく増加させたことから、コンシズマブは重症及び中等症 HA の血液凝固プロセスを補強するのに有用である可能性が示唆された。

図 2.6.2-13　ヒト血小板及び様々な濃度の FVIII を添加した FVIII 欠乏血漿におけるトロンビン生成に対する Mu4F36 の作用



Note: Thrombin generation was monitored in human plasma containing TF (0.12 pmol/L), washed- platelets (135,000/μL), and the indicated various concentrations of FVIII (n=1), without (left panel) or with Mu4F36 (10 nmol/L, right panel). mAb = monoclonal antibody. Source study: [redacted]080102

2.6.2.2.3.8　*In vitro* 薬理試験の結論

結論として、ヒトタンパク質を用いた酵素アッセイ並びにヒト血漿及び全血を用いたアッセイにおいて、コンシズマブは血液凝固を促進させた。また、コンシズマブはウサギ及びカニクイザルの血漿における dPT を短縮させるとともに、カニクイザルの全血における血栓形成を促進させ、EC_{50} 値はヒト血漿又は血液で得られた値と同程度であった。これらのデータから、非臨床におけるコンシズマブの評価にウサギ及びカニクイザルを使用することが支持された。

2.6.2.2.4　*In vivo* 薬理試験

FVIII 中和抗体の投与により HA を誘発した麻酔ウサギの爪上皮出血モデルでコンシズマブの *in vivo* 薬理作用を評価した。アイソタイプ対照 IgG と比較した出血量の減少を、コンシズマブの血液凝固促進活性の指標とした。

2.6.2.2.4.1　抗体誘発血友病を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用〔試験番号：[redacted]110403／[redacted]110701（M 4.2.1.1-12）、[redacted]100301（M 4.2.1.1-13）、[redacted]090801（M 4.2.1.1-14）、[redacted]100602（M 4.2.1.1-15）及び 300077（M 4.2.1.4-3）〕

［目的］

抗体誘発血友病 A を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用を評価することを目的として、一連の試験を実施した。

［方法］

雌性ニュージーランドホワイト種（NZW）ウサギに、出血開始前にマウス抗ヒト FVIII mAb〔2000～3000 ウサギベセスダ単位（RBU）/kg〕を静脈内投与し、一過性の血友病 A を誘発した。その後、ウサギを麻酔し、第 3 指の爪をスライディングブレード式のギロチンネイルクリッパーで爪上皮先端が含まれるように約 2 mm 切断することにより、動脈及び静脈両方からの出血を開始させた。

出血前又は出血後にアイソタイプ対照抗体又はコンシズマブ（0.125～8 mg/kg）を静脈内投与した（表 2.6.2-3）。その後、生理食塩液中に漏出した赤血球を回収し、赤血球中のヘモグロビン蓄積量を分光測定法で測定することにより、出血（出血量）を 60 分間測定した。ヘモグロビンの量を対数変換し、一元配置分散分析（ANOVA）実施後、実験ごとに Dunnett の検定、Tukey の検定又は Bonferroni の検定を用いて解析した。ウサギから血液試料を採取し、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を添加した血液中の血小板数を血球分析装置で測定した。

表 2.6.2-3　　ウサギ爪上皮出血モデルを用いた *in vivo* 薬理試験で使用された投与レジメン

Study	**dosing timing**	**isotype control IgG dose (mg/kg)**	**concizumab dose (mg/kg)**	**study ID**
Exp.1[a]	35 min before initiation of bleeding	4 mg/kg (n=10)	1, 2, 4, 8 mg/kg (n=8)	[redacted]100301 (M 4.2.1.1-13)
Exp.2[b]		1 mg/kg (n=12)	0.125; 0.188, 0.25, 0.38, 0.5, 1 mg/kg (n=6 or 8)	[redacted]110403/[redacted]110701 (M 4.2.1.1-12)
Exp.3[a]	5 min after initiation of bleeding	2 mg/kg (n=8)	2 mg/kg (n=8)	[redacted]090801 (M 4.2.1.1-14)
Exp.4[b]		4 mg/kg (n=9)	0.5, 1, 2, 4 mg/kg (n=7 or 8)	[redacted]100602 (M 4.2.1.1-15)
Exp.5[b]	15 or 30 min after initiation of bleeding	2 mg/kg (n=8)	2 mg/kg (n=8)	300077[c] (M 4.2.1.4-3)

Isotype control IgG or concizumab (dissolved in a buffer containing 34 mmol/L histidine, 86 or 251 mg/mL sucrose, and 0.03% Tween 80) was intravenously infused (except for isotype control IgG at Exp. 1 and 2, control IgG was dissolved in 20 mmol/L phosphate buffered saline [PBS]). After cutting the cuticle, blood loss was monitored for 60 min.
a: Haemophilia A was induced by anti-human FVIII mAb (3000 RBU/kg)
b: Haemophilia A was induced by anti-human FVIII mAb (2000 RBU/kg)
c: This study comprises of 4 different experiments ([redacted]120302, [redacted]120304, [redacted]120601 and [redacted]120901). Dosing regimen shown above is based on [redacted]120302 and BLZ120901. For other experiment in this study, please see 2.6.2.5
Exp. = experiment, RBU = rabbit Bethesda unit

［結果］

実験 1：爪上皮切断前 35 分にコンシズマブ（1～8 mg/kg）を静脈内投与したとき、出血量が減少し、4 及び 8 mg/kg の用量で、アイソタイプ対照 IgG（4 mg/kg）と比較して有意な減少が認められた（図 2.6.2-14 左）〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]100301（M 4.2.1.1-13）〕。いずれの群においても実験期間中（-45 分から 60 分まで）に血小板数の明らかな変化はほとんど又は全く認められなかった。

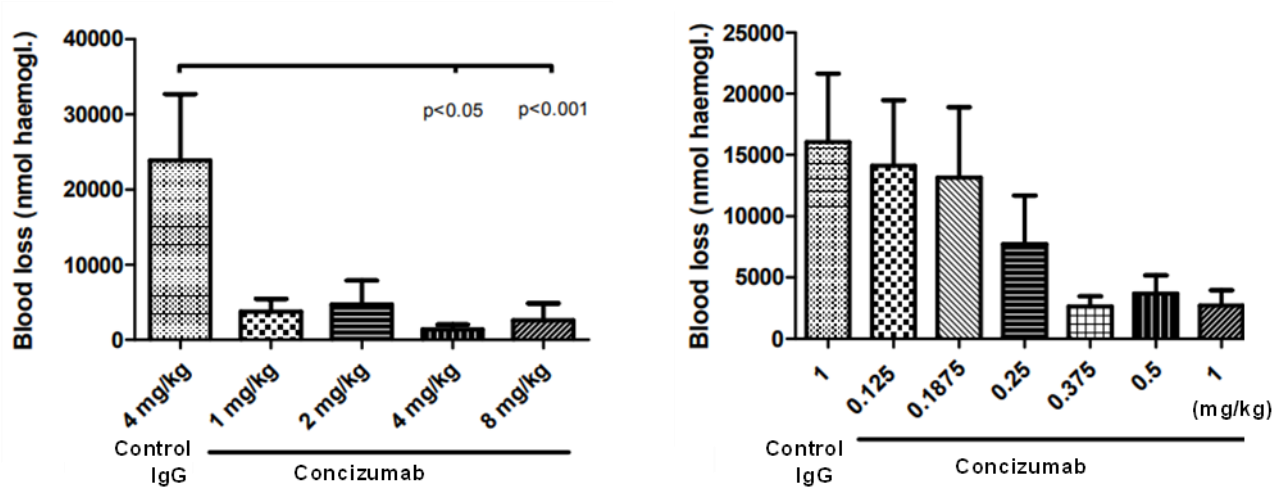
実験 2：爪上皮切断前 35 分にコンシズマブ（0.125～1 mg/kg）を静脈内投与したとき、出血量が用量依存的に減少した（p<0.05、Spearman の順位検定）。しかし、各用量における作用は、アイソタイプ対照 IgG（1 mg/kg）と比較して有意差は認められなかった（図 2.6.2-14 右）〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]110403／[redacted]110701（M 4.2.1.1-12）〕。いずれの群においても実験期間中（-45 分～60 分）に血小板数の明らかな変化はほとんど又は全く認められなかった。

実験 3：爪上皮切断後 5 分にコンシズマブ（2 mg/kg）を静脈内投与したとき、アイソタイプ対照 IgG と比較して統計学的に有意な出血量の減少が認められた〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]090801（M 4.2.1.1-14）〕。いずれの群においても実験期間中に血小板数の明らかな変化はほとんど又は全く認められなかった。

実験 4：爪上皮切断後 5 分にコンシズマブ（0.5、1、2 及び 4 mg/kg）を静脈内投与したとき、1、2 及び 4 mg/kg の用量で、アイソタイプ対照 IgG と比較して統計学的に有意な出血量の減少が認められた〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]100602（M 4.2.1.1-15）〕[20]。いずれの群においても実験期間中に血小板数の明らかな変化はほとんど又は全く認められなかった。

実験 5：爪上皮切断後 15 又は 30 分にコンシズマブ（2 mg/kg）を投与したとき、出血量に対する作用は認められなかった〔M 2.6.3.5、試験番号：300077（M 4.2.1.4-3）〕[20]。

図 2.6.2-14　抗体誘発血友病を有する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）の代表的な血液凝固促進作用（試験番号：[redacted]110403／[redacted]110701 及び [redacted]100301）



Note:
Each bar represents mean ±SEM (left panel: n=10 for control IgG and n=8 for concizumab groups, right panel: n=12 for control IgG and n=8 for other concizumab groups [except n=6 for 0.25 mg/kg dosing]
P <0.05, P <0.001: compared with the corresponding control IgG group (log translation and one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons post test) IgG = immunoglobulin G
Source documents: [redacted]110403/[redacted]110701 and [redacted]100301

［結論］

HA を有するウサギの出血モデルにおいて、コンシズマブを爪上皮切断前に 4 mg/kg 以上の用量で、切断後 5 分に 1 mg/kg 以上の用量で静脈内投与したとき、出血量の有意な減少が認められた。爪上皮切断後 15 又は 30 分にコンシズマブを 2 mg/kg の用量で投与したときには、出血に対する作用は認められなかった。いずれの群においても実験期間中に血小板数の明らかな変化は認められなかった。これらの結果から、本モデルにコンシズマブを出血開始前又は直後に投与すると、血液凝固促進活性がみられ、血小板に対する影響はほとんど又は全くないことが示された。

2.6.2.2.4.2　抗体誘発血友病を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用持続時間〔試験番号：209164（M 4.2.1.1-16）〕

［目的］

抗体誘発血友病 A を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用持続時間及び血漿中コンシズマブ濃度を評価することを目的として試験を実施した。

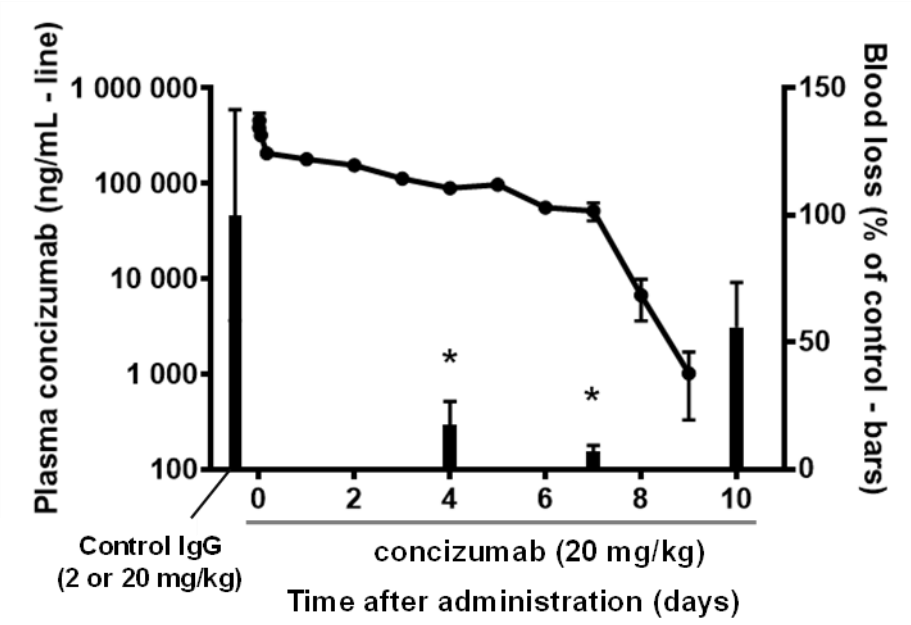
［方法］

前項と同様に、雌性 NZW ウサギにマウス抗ヒト FVIII mAb（2000 RBU/kg）を用いて抗体誘発血友病 A を発症させた。34 mmol/L ヒスチジン、86 mg/mL 精製白糖及び 0.03% Tween 80 を含有する緩衝液に、アイソタイプ対照 IgG Hz B72.3（2 又は 20 mg/kg）又はコンシズマブ（20 mg/kg）を溶解し、爪上皮出血開始前 96 時間（4 日）、168 時間（7 日）及び 240 時間（10 日）に静脈内投与した（対照群は n=4、薬物投与群は n=8）。爪上皮出血後 60 分までの出血量を、前項と同様に測定した。出血誘発前の -45 分（抗 FVIII mAb 注入前）及び-5 分並びに誘発後の 30 及び 60 分に血液を採取し、血漿中コンシズマブ濃度を、抗コンシズマブ抗体を用いた ELISA で測定した。EDTA を添加した全血を用いて血小板数を測定した。

［結果］

コンシズマブ（20 mg/kg）の静脈内投与後 4 及び 7 日に出血量の有意な減少が認められたが、静脈内投与後 10 日に明らかな変化は認められなかった。コンシズマブ投与後 4 及び 7 日のいずれにおいても血漿中に検出されたコンシズマブの濃度は 50,000 ng/mL を超えていたが、投与後 10 日の濃度は定量限界未満であり、出血量に対する明らかな作用がみられなかったことに一致していた。いずれの群においても試験期間中に血小板数の明らかな変化はほとんど又は全く認められなかった（図 2.6.2-15）〔M 2.6.3.2、試験番号：209164（M 4.2.1.1-16）〕[1]。

図 2.6.2-15　抗体誘発 HA を有するウサギにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固促進作用及び血漿中コンシズマブ濃度の変化



Note: Left axis (line): plasma concentration (ng/mL) of concizumab
Right axis (bars): blood loss (% of control) after cuticle bleeding.
Each point or bar represents the mean ± SEM (n=8) for treated groups dosed with concizumab (20 mg/kg) 4, 7, and 10 days before cuticle bleeding. 100% blood loss is defined as a mean of total 12 control rabbits, which are sum of 3 control groups dosed with isotype control IgG (2 mg/kg [n=1] or 20 mg/kg [n=3]) 4, 7, and 10 days before cuticle bleeding. The blood loss bar for each timepoint is shown as % of concurrent control group. IgG = immunoglobulin G *P <0.05 compared with the corresponding control IgG group[1]. Source documents: 209164

［結論］

抗体誘発 HA を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブ（20 mg/kg）を単回静脈内投与したとき、少なくとも 7 日間にわたり有意な血液凝固促進活性が認められた。この活性は血漿中コンシズマブ濃度の推移によく一致していた。実験期間中に血小板数の明らかな変化は認められなかった。

2.6.2.2.4.3　抗体誘発血友病を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブを皮下投与したときの血液凝固促進作用〔試験番号：[redacted]090501（M 4.2.1.1-17）〕

［目的］

抗体誘発血友病 A を有するウサギの爪上皮出血モデルにコンシズマブ（10 mg/kg）を皮下投与したときの血液凝固促進作用を評価することを目的として試験を実施した。

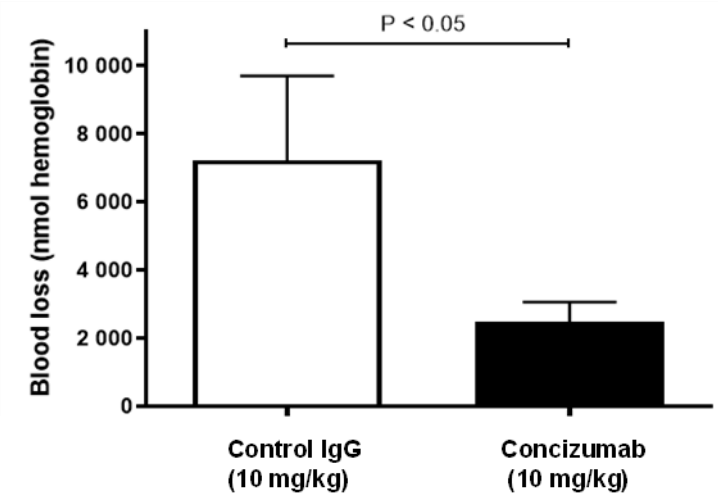
［方法］

前項と同様に、雌性 NZW ウサギに、爪上皮出血開始前 45 分（-45 分）に、マウス抗ヒト FVIII mAb（2000 RBU/kg）を用いて抗体誘発血友病 A を発症させた。34 mmol/L ヒスチジン、86 mg/mL 精製白糖及び 0.03% Tween 80 を含有する緩衝液に、アイソタイプ対照 IgG Hz B72.3（10 mg/kg）又はコンシズマブ（10 mg/kg）を溶解し、爪上皮出血開始前 24 時間に頚部に皮下投与した。爪上皮出血後 60 分までの出血量を、前項と同様に測定した。EDTA を添加した全血を用いて血小板数を測定した。

［結果］

コンシズマブ投与群では、アイソタイプ対照抗体投与群と比較して、出血量が有意に減少した（図 2.6.2-16）。いずれの群においても実験期間中に血小板数の明らかな変化はほとんど又は全く認められなかった〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]090501（M 4.2.1.1-17）〕

図 2.6.2-16　抗体誘発 HA を有する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）の血液凝固促進作用



Note:
Each bar represents mean ±SEM (n=8) for treated groups dosed with control IgG (10 mg/kg) or concizumab (10 mg/kg) 24 hrs before induction of cuticle bleeding. IgG = immunoglobulin G.
*P <0.05 compared with the corresponding control IgG group (two tailed t-test after log transformation to achieve variance homogeneiety)[1]. Source documents: [redacted]090501

［結論］

抗体誘発 HA を有するウサギの爪上皮出血モデルにおいて、爪上皮出血誘発前 24 時間にコンシズマブ（10 mg/kg）を単回皮下投与したとき、有意な血液凝固促進活性が認められた。実験期間中に血小板数の明らかな変化は認められなかった。

2.6.2.2.4.4　非血友病ウサギにコンシズマブを静脈内投与したときの血液凝固系に対する作用〔試験番号：[redacted]090201（M 4.2.1.1-18）及び[redacted]090802（M 4.2.1.1-19）〕

［目的］

結紮顔面静脈障害により局所血栓形成を起こした非血友病ウサギにコンシズマブ（2 mg/kg）を静脈内投与したときに、血液凝固系の急性活性化と血液凝固バイオマーカーの変化が誘導されるか検討することを目的として、試験を 2 つ実施した。2 つ目の試験において、コンシズマブによって誘発される局所血栓形成に対する LMWH の抑制作用も評価した。

［方法］

実験 1〔試験番号：[redacted]090201（M 4.2.1.1-18）〕：アイソタイプ対照 IgG B72.3（2 mg/kg、n=4、溶媒組成：34 mmol/L ヒスチジン、251 mmol/L 精製白糖、0.03% Tween 80、pH 6.5）又はコンシズマブ（2 mg/kg、n=6、溶媒組成：34 mmol/L ヒスチジン、pH 6.5）を溶解し、ペントバルビタールによる麻酔下の雌性 NZW ウサギの辺縁静脈に投与した。投与後 10 分に左右顔面静脈をクランプし、その静脈

を血液で満たした。次に、2 つ目のクランプを、2 つのクランプ間に約 1.5 cm のセグメントが隔離されるように行った。血流停止後 30 分に、この静脈セグメントにおける血栓形成を評価した。全血試料を投与前、投与後 15 分並びに投与後 1、3 及び 5 時間に採取した。EDTA を添加した試料は血液学的検査に、クエン酸を添加した試料は血液凝固検査に使用した。

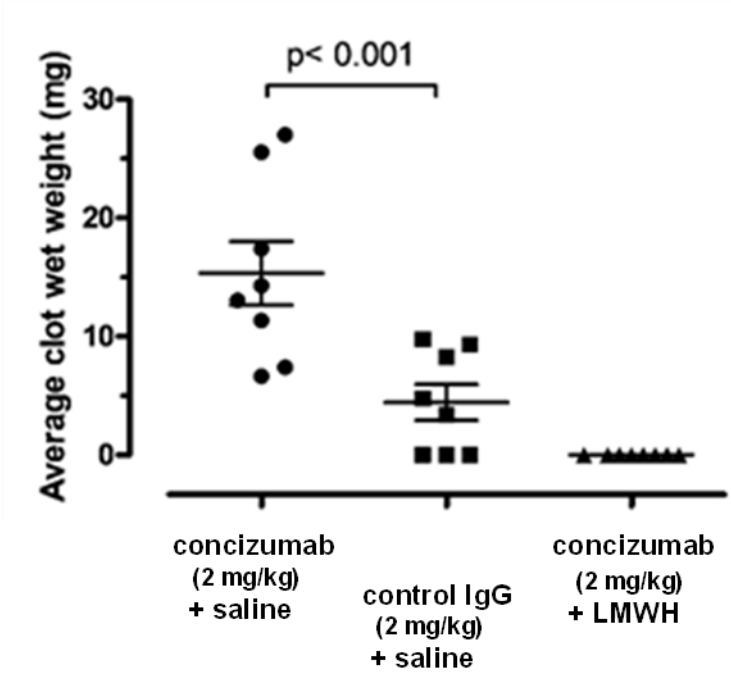
実験 2〔試験番号：[redacted]090802（M 4.2.1.1-19）〕：雌性 NZW ウサギを麻酔し、3 群に分けた（n=8/群）。対照群の辺縁静脈にアイソタイプ対照 IgG B72.3（2 mg/kg）を投与し、その 5 分後に生理食塩液（1 mL/kg）を投与した。薬物投与群には同様にコンシズマブ（2 mg/kg）を投与し、その 5 分後に生理食塩液（1 mL/kg）又はチンザパリンナトリウム［LMWH、500 IU/mL（抗 FXa 活性）］を投与した。薬物投与後 10 分に、上記のように顔面静脈の隔離セグメントを作製し、ゴム製カテーテルを付けた持針器でこのセグメントを 3 回圧搾した。血流停止後 30 分に、この静脈セグメントにおける血栓形成を評価した。全血試料を投与前並びに投与後 15 及び 40 分に採取し、上記と同様に分析した。

［結果］

実験 1：対照群では顔面静脈セグメント 1/8 匹（12.5%）で、コンシズマブ投与群では 4/12 匹（33%）で血栓が形成され、2 つの群間に有意差は認められなかった。また、いずれの時点の血小板数、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）複合体、フィブリノゲン値及びフィブリン・フィブリノゲン分解産物（FDP）にも有意差は認められなかった。投与後 15 分及び 1 時間の白血球（WBC）数は、対照群よりもコンシズマブ投与群の方がわずかに多かった。投与後 1、3 及び 5 時間における活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）は、対照群よりもコンシズマブ投与群の方がわずかに短かったが、対照群では投与後 3 時間まで APTT の延長がみられた。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[21]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〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]090201（M 4.2.1.1-18）〕。

実験 2：隔離顔面静脈セグメントを用いた局所血栓形成モデルに、セグメントを外部から圧搾する操作を追加して改変した。コンシズマブ投与群の血栓重量平均値は 15.3 ± 2.5 mg であり、対照群の 4.4 ± 1.5 mg よりも有意に大きかった。一方、コンシズマブと LMWH とを投与した群では、血栓は認められなかった（図 2.6.2-17）〔M 2.6.3.2、試験番号：[redacted]090201（M 4.2.1.1-19）〕。血小板数、WBC 数、PT 及びフィブリノゲンについては、いずれの時点においても対照群とコンシズマブ投与群の間に有意差は認められなかった。コンシズマブ投与群では、投与後 15 及び 45 分の APTT が、対照群と比較してわずかに短かった。LMWH は血小板数及び WBC 数に明らかな影響を及ぼさなかったが、対照群及びコンシズマブ投与群と比較して PT を延長させ、フィブリノゲン値を減少させた。

図 2.6.2-17　　正常ウサギにおける局所血栓形成に対する LMHW 存在下又は非存在下でのコンシズマブ（静脈内投与）の作用



Note:
Each point represents the clot weight formed in the isolated facial vein segments in individual rabbit, and each line represents the mean ±SEM (n=8). P <0.001 compared with the corresponding control IgG group (ANOVA followed by one sample Student t-test against a hypothetical mean value of zero.) IgG = immunoglobulin G, LMWH = low molecular weight heparin Source documents: [redacted]090201

［結論］

非血友病ウサギにおいて、隔離した顔面静脈セグメントにおける局所血栓形成を評価したところ、コンシズマブ（2 mg/kg、静脈内投与）は血液凝固系の急性活性化をほとんど誘導しないか又はわずかに誘導した。隔離した顔面静脈セグメントを外部から圧搾した後には、より大きな局所血栓が形成された。この局所血栓形成は、コンシズマブ投与後に LMWH［500 IU/kg（抗 FXa 活性）］を投与することで抑制された。

2.6.2.2.4.5　*In vivo* 薬理試験の結論

要約すると、抗体誘発 HA ウサギの爪上皮出血モデルを用いた試験において、コンシズマブを予防的に静脈内投与したとき、出血量が用量依存的に減少した。コンシズマブを 20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、作用が 7 日間まで持続し、10 mg/kg の用量で皮下投与したときには、投与後 24 時間に出血量が減少した。いずれの群においても実験期間中に血小板数の明らかな変化は認められなかった。非血友病ウサギの結紮顔面静脈障害による局所血栓形成において、コンシズマブは血液凝固系の急性活性化をほとんど誘導しないか又はわずかに誘導し、LMWH 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。

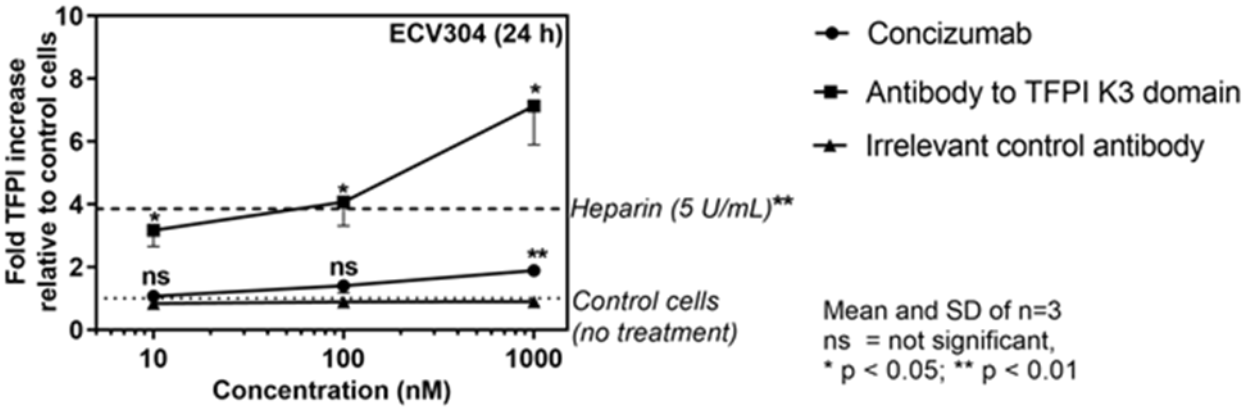
2.6.2.3　副次的薬理試験

2.6.2.3.1　　コンシズマブは高濃度でのみ内皮細胞からの TFPI 遊離を誘発した〔試験番号：215093（M 4.2.1.2-1）〕

ヘパリンは内皮細胞又は細胞外マトリックスからの TFPI の遊離を誘発することから[2,3]、TFPI アンタゴニストは内皮細胞からの TFPI の遊離を誘発する可能性が考えられる[22]。本試験では、内皮細胞からの TFPI の遊離に対するコンシズマブの影響を、ヘパリンが TFPI 遊離を誘発する条件下で検討した。ヒト内皮細胞株 ECV304 細胞を 0.5% BSA 含有無血清培地中でコンシズマブ（10、100 及び 1,000 nmol/L）、抗ヒト TFPI K3 mAb（10、100 及び 1,000 nmol/L）、抗トリニトロフェノール mAb（10、100 及び 1,000 nmol/L）又はヘパリン（5 U/mL）とともに 37°C で 24 時間インキュベートした。抗 TFPI K3 mAb（mAB 0001）はヒト TFPI の K3 ドメインに対する mAb であり、K3 ドメインは TFPI の細胞への固定に関与している。抗トリニトロフェノール mAb は、TFPI に結合しない陰性対照抗体として添加した。上清中の TFPI 遊離量を ELISA で測定し、細胞数（核染色で測定）で補正した。

TFPI 遊離に対するコンシズマブの統計学的に有意な軽度の作用（約 2 倍に増加）が高濃度（1,000 nmol/L、150,000 ng/mL）のみで認められた。ヘパリン（5 U/mL）及び抗 TFPI K3 mAb はコンシズマブ（1,000 nmol/L）よりも強い TFPI 遊離を誘発し、低濃度のコンシズマブは統計学的に有意な TFPI 遊離を誘発しなかった（図 2.6.2-18）〔M 2.6.3.2、試験番号：215093（M 4.2.1.2-1）〕。抗 TFPI K3 抗体では顕著な作用がみられ、TFPI の細胞への固定に K3 が関与している[9]ことに一致していた。

図 2.6.2-18　　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



Note: Release of TFPI is shown as fold increase relative to control cells treated without any test compounds. Each point represents a mean ±SD (n =3). *P <0.05, **P <0.001: compared with control cells treated without any antibodies (one-sample t-test). ns = not significant. Source document: 215093.

2.6.2.3.2　コンシズマブはプロテイン C の活性化及びアンチトロンビン活性に影響を及ぼさなかった

TFPI 以外に、APC 及び AT も血液凝固のダウンレギュレーション因子であり、それぞれ FVIIIa/FVa 及びトロンビンを阻害する。APC はプロテイン C の活性化により生成し、この変換は、トロンビンと、内皮細胞上に発現している TM との複合体によって媒介される。コンシズマブが TM 結合型トロ

ンビンによるプロテインCの活性化、ATによるTM結合型トロンビンの阻害に影響を及ぼすか否かを検討するため、TFPI及びTMの供給源としてHUVECを用いた*in vitro*試験を実施した。トロンビン及びプロテインCを細胞に添加し、生成したAPCの量を測定した。飽和濃度（50及び250 µg/mL）のコンシズマブの非存在下と存在下で、APC生成に差は認められなかった。同様に、ATを飽和濃度未満の濃度で添加したとき、コンシズマブの非存在下と存在下で、APC生成に差は認められなかった〔M 2.6.3.3、試験番号：[redacted]100601（M 4.2.1.2-2）〕。

これらの結果は、AT及びプロテインC濃度に毒性学的に意義のある変化が認められなかったサル反復投与毒性試験〔M 2.6.7.7.A、試験番号：210130（M 4.2.3.2-1）、M 2.6.7.7.B、試験番号：209206（M 4.2.3.2-2）、M 2.6.7.7.C、試験番号：211087（M 4.2.3.2-3）及びM 2.6.7.7.D、試験番号：213542（M 4.2.3.2-4）〕で得られた血漿試料の分析結果により裏付けられた。

2.6.2.4　安全性薬理試験

コンシズマブの*in vitro*安全性薬理試験プログラムとして、FcRへの結合、ADCC、補体結合及び末梢血液細胞への結合を評価した。

2.6.2.4.1　*In vitro*におけるFc受容体（FcR）への結合

ヒトFcRに対するコンシズマブの1価での結合の親和性をSPRで測定した〔M 2.6.3.4、試験番号：210178（M 4.2.1.3-1）〕。アイソタイプ（IgG4）対照抗体及びコンシズマブをSPRセンサーチップに固定化し、種々の遺伝子組換えヒト可溶性FcR（FcRn、FcγRIIa、FcγRIIb及びFcγRIII）を様々な濃度（3.9～1,000 nmol/L）で流して結合をモニタリングした。結合曲線のグローバルフィッティングによりK_D値を算出した（表 2.6.2-4）。

表 2.6.2-4　　ヒトFc受容体に対するコンシズマブの結合定数（K_D）

Fc receptor	K_D (µmol/L)	
	Control IgG4	Concizumab
FcRn (H-274)	1.1	1.1
FcγRI (CD64)	0.0015	0.0021
FcγRIIa 131R[a] (CD32a)	1.2	1.3
FcγRIIa 131H[a] (CD32a)	1.4	1.7
FcγRIIb (CD32b)	0.30	0.37
FcγRIIIa 158F[a] (CD16b)	Too weak	Too weak
FcγRIIIa 158V[a] (CD16b)	1.3	1.1

[a] Genetic polymorphism.

コンシズマブはFcγRIに結合し（K_D値は2 nmol/L）、FcRn、FcγRIIa（131R及び131Hバリアント）、FcγRIIb及びFcγRIIIa（158Vバリアント）にも結合した（親和性は0.4～1.7 µmol/L）が、FcγRIIIa（158Fバリアント）には弱い結合しか示さなかった。ヒトIgG4対照抗体でも同程度の親和性が認められた。これらのデータは、文献で報告されている値[23]によく一致していた。これらのデータから、コンシズマブはそのFc領域で生理学的にFcRに結合し、Fab領域の寄与はないことが示された。

この試験を拡大し、カニクイザル FcR に対する結合を、上記と同じ方法を用いて分析した。ヒト FcγRII 及び FcγRIII バリアントに対する単量体コンシズマブの結合について、前の試験とほぼ同様のデータが得られた。コンシズマブはカニクイザル FcγRIIa（131R 及び 131H バリアント）、FcγRIIb 及び FcγRIIIa（158V バリアント）に結合し（K_D 値は 2～6 μmol/L）、ヒト FcγRIIIa（158F バリアント）にも結合した（K_D 値は 9 μmol/L）。カニクイザル FcγRIIa、FcγRIIb 及び FcγRIIIa に結合することは、K_D 値が 2～6 μmol/L と、ヒト FcR への結合と同じ範囲内であったことから裏付けられた〔M 2.6.7.17.B、試験番号：215094（M 4.2.3.7.3-3）〕。

2.6.2.4.2　抗体依存性細胞傷害（ADCC）

コンシズマブの ADCC 誘導能を評価することにより、*in vitro* での細胞傷害性を検討した〔M 2.6.3.4、試験番号：209148（M 4.2.1.3-2）〕。本アッセイでは、コンシズマブの標的介在性結合によるヒト PBMC の TFPI 発現標的細胞（内皮細胞株 EA.hy926WT）に対する細胞傷害誘導能を評価した。コンシズマブは、TFPI を発現している EA.hy926WT 細胞に特異的かつ濃度依存的に結合し、TFPI を発現していない対照細胞（EA.hy926AR）には結合しなかった。コンシズマブは、標的には結合したが、250 μg/mL までの広範な濃度で、TFPI 発現細胞（EA.hy926WT）における ADCC 誘導能は示さなかった。これらのデータは、IgG4 抗体は FcR への親和性が低いため、ADCC を誘導しないとの予想された結果に一致していた。

同様のアッセイにおいて、TFPI を発現している初代培養 HUVEC に対するコンシズマブの溶解能を検討した〔M 2.6.7.17.B、試験番号：214488（M 4.2.3.7.3-4）〕。炎症部位における活性化内皮細胞の ADCC 能を模倣するため、ADCC アッセイの標的細胞として TNFα 刺激 HUVEC を使用した。コンシズマブは非刺激及び TFN-α 刺激 HUVEC においても ADCC を誘導しなかった。したがって、コンシズマブは *in vitro* で ADCC を誘導しなかった。

2.6.2.4.3　抗原－抗体複合体依存性の補体結合

TFPI と複合体を形成したコンシズマブの補体カスケードへの *in vitro* での結合能及びその活性化能を ELISA ベース補体結合アッセイで評価する実験を実施した〔M 2.6.3.4、試験番号：209134（M 4.2.1.3-3）〕。TFPI と複合体を形成したコンシズマブは、補体第 4 成分（C4）（抗体－抗原複合体が結合し、それによって活性化されると、古典的補体カスケードが開始される）に結合しなかった。陽性対照として使用したポリクローナル抗 TFPI 抗体と TFPI との複合体は C4 に結合し、この結果は、既知の補体系アクチベーターである IgG1 及び IgG3 アイソタイプがこのポリクローナル抗体に含まれていることから予想されるものであった。TFPI と複合体を形成したコンシズマブが C4 に結合しなかったことから、コンシズマブは補体系を活性化しないと考えられた。

2.6.2.4.4　血液細胞への結合

コンシズマブがヒト末梢血液細胞に結合するか評価するため、ヒト顆粒球、単球、リンパ球、血小板及び赤血球に対するコンシズマブの特異的な結合をフローサイトメトリーで解析した〔M 2.6.3.4、試験番号：209137（M 4.2.1.3-4）〕。コンシズマブは 300 μg/mL までの濃度で末梢血液細胞のいずれのサブセットにも結合しなかった。

2.6.2.4.5 *In vivo* 安全性薬理試験

ICH S6（R1）[4]及び ICH S7A[5]ガイドラインに従い、*in vivo* 安全性薬理評価項目（血圧、ECG、呼吸数、尿検査及び該当する CNS 評価項目）及びサイトカイン（IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、TNFα、IFN-γ）放出の有無の評価は、カニクイザルを用いた用量設定毒性試験〔M 2.6.3.4、試験番号：208250（M 4.2.3.1-1）（毒性試験の一部）〕及びカニクイザルを用いた重要な 13 週間反復投与毒性試験〔M 2.6.3.4、試験番号：209206（M 4.2.3.2-2）（毒性試験の一部）及び M 2.6.6.3.2〕で実施した。ECG 測定及び尿検査は、カニクイザルを用いた重要な 52 週間反復投与毒性試験で実施した〔M 2.6.3.4、試験番号：213542（M 4.2.3.2-4）（毒性試験の一部）及び M 2.6.6.3.4〕。これらのいずれの試験においても、安全性薬理評価項目に対するコンシズマブの影響は、検討した最高用量（200 mg/kg/週 1 回静脈内投与及び 50 mg/kg/日皮下投与）まで認められなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用試験

rFVIIa（ノボセブン®）及び aPCC（ファイバ®）は、臨床において、インヒビター（抗 FVIII 又は抗 FIX 同種／自己抗体）を有する血友病患者の出血の治療に使用されており、コンシズマブで予防治療中の患者の破綻出血の治療に使用される可能性がある。同様に、rFVIII 及び rFIX はインヒビターを有しない HA 又は HB 患者の出血の治療に使用されている。したがって、これらの血液凝固促進剤（止血剤）とコンシズマブとの薬物相互作用を評価した。

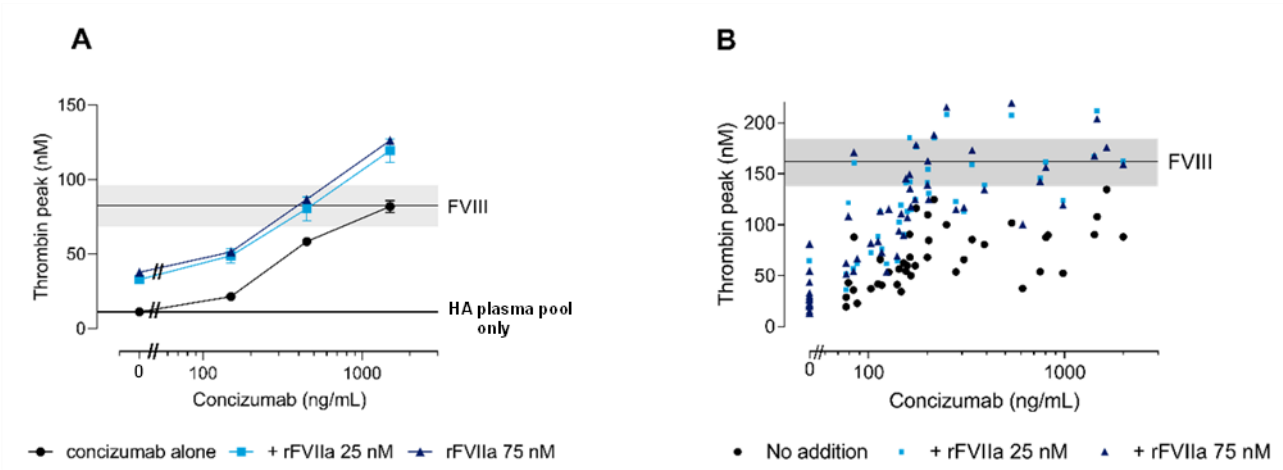
2.6.2.5.1 コンシズマブと rFVIIa との薬物相互作用

コンシズマブと rFVIIa との薬物相互作用の有無を、*in vitro*〔M 2.6.3.5、試験番号：319076（M 4.2.1.4-1）〕[24,25]及びウサギ爪上皮出血モデル〔M 2.6.3.5、試験番号：300077（M 4.2.1.4-3）〕[24]で評価した。抗体誘発 HA を有するヒト血液の TEG 解析及び多血小板血漿を用いたトロンビン生成試験の両方において、コンシズマブと rFVIIa とを併用したときの血液凝固促進作用は、個々の作用を合わせたものよりも強く、相乗的であることが示された[24]。抗体誘発血友病のウサギ出血モデルを用いた *in vivo* 試験では、コンシズマブと rFVIIa との相加作用又は相乗作用を示す徴候は認められなかった。

HA 血漿プール及び第 2 相試験（319076 試験、4310 試験及び 4255 試験）[25]でコンシズマブによる予防治療中の患者の血漿を用いたトロンビン生成試験において、コンシズマブと rFVIIa の作用を定量した。血漿プール（図 2.6.2-19A）において、コンシズマブと rFVIIa の併用作用は主に相加的であった。1,500 ng/mL のコンシズマブと 25 又は 75 nmol/L の rFVIIa との併用では、統計学的に有意な相乗作用（$p<0.05$）が認められた。1,500 ng/mL のコンシズマブと 25 nmol/L 又は 75 nmol/L の rFVIIa を併用したとき、得られた相互作用の総計に占める相加作用の割合は約 85%であった（それぞれ 85.5 及び 84.7%、n=3 の平均値）。コンシズマブによる予防治療中のインヒビターを有する（4310 試験、図 2.6.2-19B）又は有しない（4255 試験）HA 患者の血漿において、rFVIIa はトロンビンのピーク値を増加させた。コンシズマブと rFVIIa の併用時の作用は主に相加的で、得られた相互作用の総計に占める割合は 60 ± 38%（25 nmol/L rFVIIa、4255 試験、28 例の被験者のデータの平均値及び SD）、67 ± 8%（75 nmol/L rFVIIa、4255 試験、24 例の被験者のデータの平均値及び SD）及び 78 ± 14%（75 nmol/L rFVIIa、4310 試験、15 例の被験者のデータの平均値及び SD）であった。全体として、これらのデータ

から、コンシズマブ含有血漿において rFVIIa はトロンビン生成を促進させ、コンシズマブと rFVIIa の併用時の作用は主に相加的であり、相互作用の総計に占める統計学的に有意な相乗作用の割合は、最大 40%であることが示された。

図 2.6.2-19　　HA 血漿プール又はコンシズマブによる予防治療中の HA 患者の血漿試料におけるトロンビン生成に対するコンシズマブと rFVII の併用作用



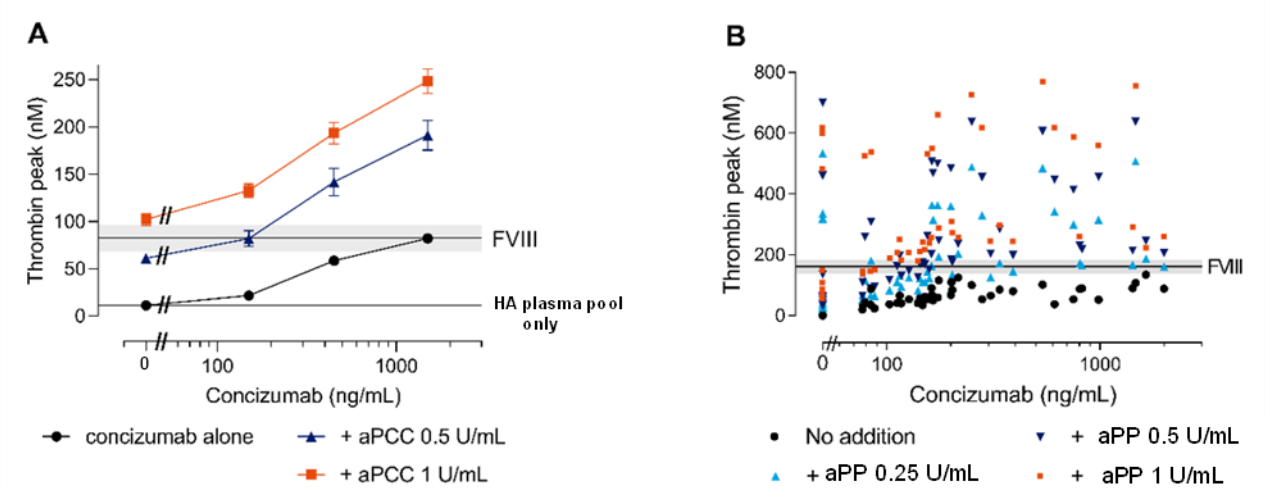
Note:
A: Thrombin was generated in HA plasma pool by adding concizumab (150, 450, and 1,500 ng/ml) with rFVIIa at 25 nmol/L (crossed square), 75 nmol/L (crossed triangle), or without rFVIIa (crossed circle). Each point represents mean ±SD (n=3) of thrombin peak. The grey area depicts the mean ±SD (n=3) observed upon addition of normal level of rFVIII (1 IU/mL).
B: Thrombin was generated in plasma samples from HA patients on concizumab prophylaxis (trial NN7415-4310, n=15 baseline samples) with rFVIIa at 25 nmol/L (crossed square), 75 nmol/L (crossed triangle), or without rVIIa (crossed circle). Each point represents thrombin peak for individual patient (one baseline sample and three samples at steady state), whose plasma concizumab concentration is indicated on horizonal axis. The grey area depicts the mean and 95% CI observed upon addition of normal level of rFVIII (1 IU/mL) to baseline samples from HA patients in trial NN7415-4255. HA = haemophilia A, rFVIIa = recombinant activated coagulation factor VII, rFVIII = recombinant coagulation factor VIII. Source: 319076

2.6.2.5.2　　コンシズマブと aPCC との薬物相互作用

コンシズマブと aPCC（ファイバ®）との薬物相互作用を、rFVIIa と同時に実施したトロンビン生成試験で評価した〔M 2.6.3.5、試験番号：319076（M 4.2.1.4-1）〕[25]。aPCC は HA 血漿プール（図 2.6.2-20A）及びコンシズマブによる予防治療中のインヒビターを有する HA 患者の血漿（4310 試験、図 2.6.2-20B）においてコンシズマブの非存在下及び存在下でトロンビンのピーク値を増加させた。コンシズマブと aPCC を併用時の作用は主に相加的であり、血漿プールで得られた相互作用の総計に占める割合は 83%（150 ng/mL コンシズマブと 1 U/mL aPCC との併用）～67%（1,500 ng/mL コンシズマブと 0.5 U/mL aPCC との併用）であった。患者の試料においてコンシズマブと 1 U/mL aPCC を併用時の相加作用は、相互作用の総計の 80 ± 22%に相当した（4310 試験、15 例の被験者のデータの平均値及び SD）。4255 試験において、統計学的に有意な相乗作用は認められなかった。

全体として、これらのデータから、コンシズマブ含有血漿において aPCC はトロンビン生成を促進させ、コンシズマブと aPCC の併用時の作用は主に相加的であり、相互作用の総計に占める統計学的に有意な相乗作用の割合は、最大 33%であることが示された。

図 2.6.2-20　　HA 血漿プール又はコンシズマブによる予防治療中の HA 患者の血漿試料におけるトロンビン生成に対するコンシズマブと aPCC の併用作用



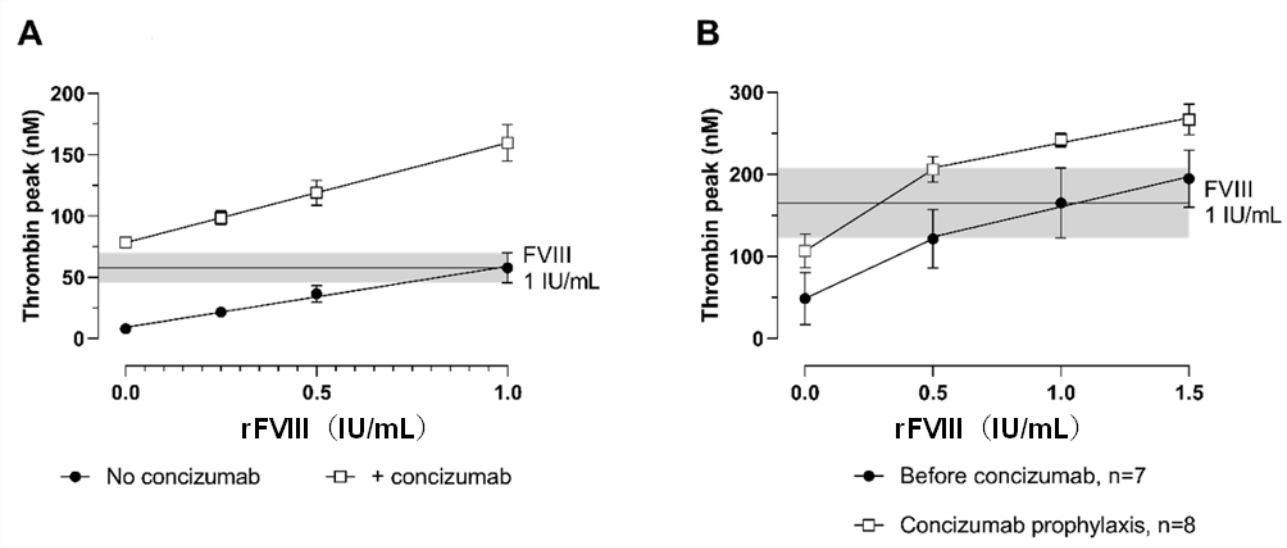
Note:
A: Thrombin was generated in HA plasma pool by adding concizumab (150, 450, and 1,500 ng/ml) with aPCC at 0.5 U/L (crossed triangle), 1 U/mL (crossed square), or without aPCC (crossed circle). Each point represents mean ±SD (n=3) of thrombin peak. The grey area depicts the mean ±SD (n=3) observed upon addition of normal level of rFVIII (1 IU/mL).
B: Thrombin was generated in plasma samples from HA patients on concizumab prophylaxis (trial NN7415-4310, n=15 baseline samples) with aPCC at 0.25 U/L (light blue crossed triangle), 0.5 U/mL (dark blue crossed triangle), or without aPCC (crossed circle). Each point represents thrombin peak for individual patient (one baseline sample and three samples at steady state), whose plasma concizumab concentration is indicated on horizonal axis. The grey area depicts the mean and 95% CI observed upon addition of normal level of rFVIII (1 IU/mL). aPCC = activated coagulation complex concentrates. HA = haemophilia A, rFVIII = recombinant coagulation factor VIII. Source: 319076

2.6.2.5.3　　コンシズマブと rFVIII との薬物相互作用

rFVIII（ノボエイト®）を単独又はコンシズマブとの併用で HA 血漿プールに添加し（図 2.6.2-21A）、また、コンシズマブによる予防治療中の 8 例の患者から採取した血漿 33 検体〔遊離型 TFPI（コンシズマブとの複合体を形成していない TFPI）はアッセイの検出限界未満〕に添加した（図 2.6.2-21B）〔M 2.6.3.5、試験番号：321538（M 4.2.1.4-2）〕[25]。比較のため、これらの患者の 7 例から得られた投与前の血漿検体に rFVIII を添加した。rFVIII はコンシズマブの非存在下及び存在下でトロンビンピーク値を増加させた。血漿プールにおいて、1 IU/mL の rFVIII と 1,500、4,500 及び 15,000 ng/mL のコンシズマブとの併用、0.5 IU/mL の rFVIII と 1,500 及び 4,500 ng/mL のコンシズマブとの併用並びに 0.25 IU/mL の rFVIII と 4,500 及び 15,000 ng/mL のコンシズマブとの併用で、統計学的に有意な相乗作用が認められた。これらの検討において、コンシズマブと rFVIII とを併用時の相加作用は、相互作用の 78%（1 IU/mL rFVIII と 4,500 ng/mL コンシズマブとの併用）～90%（0.25 IU/mL rFVIII と 15,000 ng/mL コンシズマブとの併用）であった。患者の血漿では、rFVIII とコンシズマブとの併用による有意な相乗作用は認められなかった。

したがって、rFVIII とコンシズマブを併用時の、相互作用に占める相乗作用の割合は認められないか、もしくは最大 22%であった。

図 2.6.2-21　　HA 血漿プール又はコンシズマブによる予防治療中の HA 患者の血漿試料におけるトロンビン生成に対するコンシズマブと rFVIII の併用作用



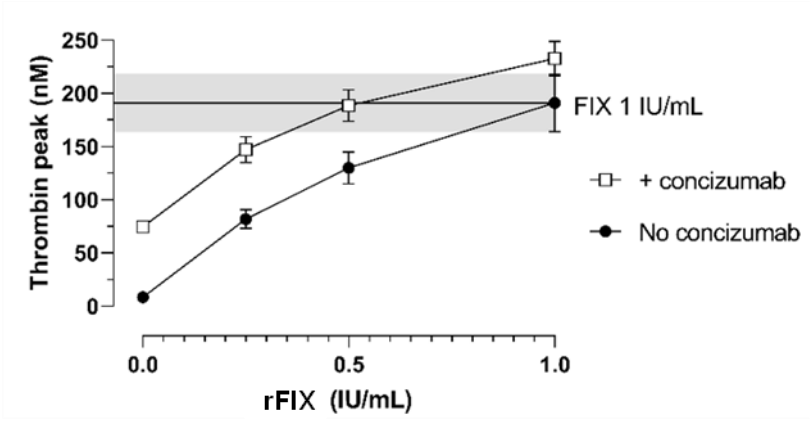
Note:
A: Thrombin was generated in HA plasma pool by adding rFVIII (0, 0.25, 0.5, and 1.0 U/mL) with (open square, n=3) or without (crossed circle, n=3) concizumab.
B: Thrombin was generated by adding rFVIII (0, 0.25, 0.5, and 1.0 U/mL) to plasma samples obtained from HA patients before (crossed circle, one baseline samples from 7 patients) or after (open square, 33 samples from 8 patients) on concizumab prophylaxis. Each point represents mean ±SD of the thrombin peak (nmol/L). The grey area depicts the mean ± SD observed upon addition of normal level of rFVIII (1 IU/mL). HA = haemophilia A, rFVIII = recombinant coagulation factor VIII. Source; 321538.

2.6.2.5.4　　コンシズマブと rFIX との薬物相互作用

rFIX（Benefix®）を単独又はコンシズマブとの併用で HB 血漿プールに添加した〔M 2.6.3.5、試験番号：321538（M 4.2.1.4-2）〕[25]。rFIX は HB 血漿においてコンシズマブの非存在下及び存在下でトロンビンのピーク値を増加させた（図 2.6.2-22）。1 IU/mL の rFIX と 1,500、4,500 及び 15,000 ng/mL のコンシズマブとの併用、0.5 IU/mL の rFIX と 100 nmol/L のコンシズマブとの併用により、統計学的に有意な負の薬物相互作用が認められた。コンシズマブと 1 IU/mL の rFIX を併用時の相加作用は、得られた相互作用の総計の 111%（1,500 ng/mL コンシズマブ）～113%（15,000 ng/mL コンシズマブ）に相当し、15,000 ng/mL コンシズマブと 0.5 IU/mL の rFIX とを併用したときの相加作用は、得られた相互作用の総計の 112%に相当した。

これらのデータから、コンシズマブと rFIX を併用すると、コンシズマブの作用がわずかに減少することが示唆された。

図 2.6.2-22　　HB 血漿プールにおけるトロンビン生成に対するコンシズマブと rFIX との併用作用



Note:
Thrombin was generated in HB plasma pool by adding rFIX (0, 0.25, 0.5, and 1.0 IU/mL) with (open square, n=3) or without (crossed circle, n=3) concizumab (1,500 ng/mL). Each point represents mean ±SD of the thrombin peak (nmol/L). The grey area represents the mean ±SD obtained upon adding normal level of rFIX (1 IU/mL). HB = haemophilia B, FIX = coagulation factor IX.
Source: 321538.

2.6.2.5.5　　薬物相互作用試験の結論

データから、rFVIIa、aPCC、rFVIII 及び rFIX は、コンシズマブ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。得られた相乗作用は、コンシズマブと検討した血液凝固促進因子の作用機序（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、これらの血液凝固促進タンパク質により生成した FXa がより持続的にトロンビンを生成すると考えられる。抗体誘発血友病のウサギ出血モデルを用いた *in vivo* 試験では、コンシズマブと rFVIIa との相加作用又は相乗作用を示す徴候は認められなかった。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。

2.6.2.6　考察及び結論

HA 及び HB 患者では、それぞれ FVIII 及び FIX の欠乏により血液凝固プロセスにおける伝播が不十分であるため、FXa 生成能が低下しており、その結果として、トロンビン生成量が少なく、出血障害が生じる。HA 及び HB 患者に対する標準治療は、出血の予防及び治療のいずれにおいても、それぞれ欠乏している FVIII 及び FIX の補充療法である。しかし、rhFVIII 又は rhFIX を連続投与すると、FVIII 又は FIX に対する同種抗体が発現し、それらが rhFVIII 又は rhFIX に結合することにより有効性が低下する。

TFPI は、多価の Kunitz 型セリンプロテアーゼインヒビターであり、血漿中及び内皮細胞表面の TF/FVIIa 複合体を FXa 依存的にフィードバック阻害することにより TF 誘発血液凝固を制御する。コンシズマブは、TFPI の K2 ドメインに対する遺伝子組換えヒト化 mAb であり、FXa の活性部位に対する K2 の結合を阻害することにより、FXa 及び FVIIa/TF/FXa 複合体の両方（図 2.6.2-4）並びに初期のプロトロンビナーゼ複合体（FVa/FXa）の阻害を抑制する。TFPI の阻害活性が低下すると、FVIIa/TF 複合体により産生された FXa が、より多量のプロトロンビンを活性化してトロンビンを生成し、それによって血栓形成が促進され、止血に至る可能性がある。コンシズマブの作用機序は FVIII 及び FIX の有無には左右されないため、抗 FVIII 又は抗 FIX 同種抗体といったインヒビターの生成に関係なく、HA 及び HB 両方の患者の治療薬として開発されている。

コンシズマブの *in vitro* 評価として、TFPI に対する親和性の測定、TFPI 上のエピトープマッピング及び TFPI の機能アッセイを実施した。コンシズマブにより TFPI を中和すると、精製タンパク質を用いたアッセイで FXa の生成が増加し、血漿ベースアッセイ並びに抗体誘発 HA 又は HB を有する全血のアッセイでトロンビン生成が増加し、血栓形成が促進された。これらのアッセイにおける EC_{50} 値は、nmol/L 未満～低 nmol/L であった。コンシズマブは、FVIII 値又は FIX 値が正常値の 1%未満 [19] である重症 HA 患者（内因性 FVIII インヒビターを有する又は有しない）及び重症 HB 患者の血漿におけるトロンビン生成も増加させた。これらの結果から、コンシズマブは HA 及び HB 患者に対する止血薬として作用する可能性が示された。

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。ヒトのエピトープを実験動物における TFPI のアミノ酸配列と比較すると、ウサギ及びサル TFPI の K2 ドメインのみに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 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。マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、カニクイザル、ブタ及びヒトの血漿を用いた改変 PT 凝固一段法により、機能的な交差反応性を評価した。コンシズマブの交差反応性は、ウサギ及びカニクイザルの TFPI に対してのみ認められた。

コンシズマブの薬理作用は、ヒトドナー及びカニクイザルの血液を用いた TEG によって裏付けられた。コンシズマブは、ヒト及びカニクイザル両方の血液において、濃度依存的に血液凝固時間を短縮させ、血栓形成を改善させた。

これらのデータ及びげっ歯類動物種には交差反応性を示さないことに基づき、非臨床の効力を裏付ける試験に使用する動物種としてウサギを、非臨床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、両動物種を薬物動態／薬力学評価に使用した。安全性試験動物種としてカニクイザルを使用することは、カニクイザルとヒトで止血系が非常に類似している[26]ことから更に支持された。カニクイザルとヒトでは、臨床的に意義のある多くの血液凝固パラメータの値が同じ範囲内にある[27]。例えば、52 週間反復投与毒性試験（試験番号：213542）で得られたベースライン時の血漿中総 TFPI 濃度の平均値は 0.74～0.94 nmol/L であり、これはヒトで報告されている TFPI 濃度（1.6 nmol/L、70 ng/mL）[15]と同じ範囲内であった。最後に、TAT 及び D-ダイマーといった臨床における血液凝固のバイオマーカーは、カニクイザルで十分に確立されている[28]。

In vivo Proof-of-concept 試験は、抗体誘発 HA を有するウサギの爪上皮出血モデルを用いて実施された。コンシズマブを爪上皮切断前に 4 mg/kg 以上の用量で、切断後 5 分に 1 mg/kg 以上の用量で静脈内投与したとき、出血量の有意な減少が認められた。20 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、作用が 7 日間持続した。コンシズマブを 10 mg/kg の用量で単回皮下投与したときには、投与後 24 時間に出血量の有意な減少が認められた。実験期間中、いずれの群においても血小板数に明らかな変化は認められなかった。ウサギを用いた以上の試験から、コンシズマブは血液凝固促進活性を有し、血友病モデルにコンシズマブを静脈内及び皮下投与することにより出血が抑制され、血小板への影響はほとんど又は全くないことが示された。

コンシズマブは、100 nmol/L（15,000 ng/mL）までの濃度において、内皮細胞からの TFPI の遊離を誘発しなかった。また、コンシズマブは、TM 結合型トロンビンによるプロテイン C 活性化に影響を及ぼさず、TM 結合型トロンビンに対する AT の阻害作用にも影響を及ぼさなかった。これらの結果は、サル反復投与毒性試験（M 2.6.6）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た。

In vitro トロンビン生成試験において、コンシズマブと rFVIIa、aPCC、rFVIII 又は rFIX を併用時の作用は主に相加的であったが、認め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。このことから、コンシズマブによる予防治療を受ける患者の破綻出血の治療に rFVIIa、aPCC、rFVIII 及び rFIX の使用が支持された。

コンシズマブで実施した *in vitro* 及び *in vivo* 安全性薬理試験プログラムにおいて、安全性に関する警告は認められなかった。*In vitro* 安全性薬理試験プログラムには、FcR への結合、ADCC、補体結合アッセイ及び末梢血液細胞へのコンシズマブの結合の分析が含まれた。また、血液凝固カスケードの制御メカニズム、AT 及び APC にコンシズマブの影響は認められなかった。*In vivo* のサル毒性試験において、*in vivo* 安全性薬理評価項目（CNS、CV 及び呼吸系）及び *in vivo* サイトカイン濃度測定値に、コンシズマブの投与による影響は認められなかった。

結論として、非臨床薬理試験から、コンシズマブは HA 及び HB の血液中の TFPI を阻害することにより、望ましい薬理作用である血液凝固促進作用を示し、薬理試験及び安全性薬理評価からは毒性が認められなかった。

参考文献

[1] 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.

[2] 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.

[3] Peterson JA, Maroney SA, Martinez ND, Mast AE. Major Reservoir for Heparin-Releasable TFPIα (Tissue Factor Pathway Inhibitor α) Is Extracellular Matrix. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2021;41(6):1942-55.

[4] 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.

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

[6] Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22(9):1381-9.

[7] Wood JP, Bunce MW, Maroney SA, Tracy PB, Camire RM, Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor-alpha inhibits prothrombinase during the initiation of blood coagulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(44):17838-43.

[8] Hackeng TM, Seré KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(9):3106-11.

[9] Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. Biochemistry. 1990;29(33):7539-46.

[10] Mast AE. Tissue Factor Pathway Inhibitor: Multiple Anticoagulant Activities for a Single Protein. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36(1):9-14.

[11] Piro O, Broze GJ. Comparison of cell-surface TFPIalpha and beta. J Thromb Haemost. 2005;3(12):2677-83.

[12] Maroney SA, Hansen KG, Mast AE. Cellular expression and biological activities of alternatively spliced forms of tissue factor pathway inhibitor. Curr Opin Hematol. 2013;20(5):403-9.

[13] Petersen LC, Sprecher CA, Foster DC, Blumberg H, Hamamoto T, Kisiel W. Inhibitory properties of a novel human Kunitz-type protease inhibitor homologous to tissue factor pathway inhibitor. Biochemistry. 1996;35(1):266-72.

[14] Petersen LC. Memo Report (Study ID 319212) edited by Jacobsen H. Concizumab: Assessment of potential cross reactivity to TFPI-2. 20 Sep 2019.

[15] Broze GJ, Girard TJ. Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. Front Biosci (Landmark Ed). 2012;17:262-80.

[16] Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, Bonesho CE, Nielsen LV, Johansen PB, et al. Absence of hematopoietic tissue factor pathway inhibitor mitigates bleeding in mice with hemophilia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(10):3927-31.

[17] Abildgaard U. Antithrombin - early prophecies and present challenges. Thromb Haemost. 2007;98(1):97-104.

[18] Castellino FJ, Ploplis VA. The protein C pathway and pathologic processes. J Thromb Haemost. 2009;7 Suppl 1:140-5.

[19] Waters EK, Sigh J, Friedrich U, Hilden I, Sørensen BB. Concizumab, an anti-tissue factor pathway inhibitor antibody, induces increased thrombin generation in plasma from haemophilia patients and healthy subjects measured by the thrombin generation assay. Haemophilia. 2017;23(5):769-76.

[20] Lauritzen B, Hilden I. Concizumab promotes haemostasis via a tissue factor-factor VIIa-dependent mechanism supporting prophylactic treatment of haemophilia: Results from a rabbit haemophilia bleeding model. Haemophilia. 2019;25(6):e379-e82.

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

[22] 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.

[23] Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. Ann Hematol. 1998;76(6):231-48.

[24] Lauritzen B, Olling J, Abel KL, Augustsson C, Balling K, Bjelke M, et al. Administration of recombinant FVIIa (rFVIIa) to concizumab-dosed monkeys is safe, and concizumab does not affect the potency of rFVIIa in hemophilic rabbits. J Thromb Haemost. 2019;17(3):460-9.

[25] Kjalke M, Kjelgaard-Hansen M, Andersen S, Hilden I. Thrombin generation potential in the presence of concizumab and rFVIIa, APCC, rFVIII, or rFIX: In vitro and ex vivo analyses. J Thromb Haemost. 2021;19(7):1687-96.

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

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

[28] Ravanat C, Freund M, Dol F, Cadroy Y, Roussi J, Incardona F, et al. Cross-reactivity of human molecular markers for detection of prethrombotic states in various animal species. Blood Coagul Fibrinolysis. 1995;6(5):446-55.

コンシズマブ（遺伝子組換え）

2.6.3 薬理試験の概要表

ノボ ノルディスク ファーマ株式会社

目次

ページ

目次 2
薬理試験の概要表 3
2.6.3.1 薬理試験一覧表 3
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 7
2.6.3.3 副次的薬理試験 15
2.6.3.4 安全性薬理試験 16
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用 18

薬理試験の概要表

2.6.3.1 薬理試験一覧表

Test article: concizumab

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Primary pharmacodynamics					
In vitro pharmacology					
Epitope mapping of concizumab	Human proteins	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209161	4.2.1.1-2
In vitro characterisation of antigen-antibody binding by surface plasmon resonance (SPR) analysis	Rabbit, cynomolgus monkey and human proteins	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	210179	4.2.1.1-1
In vitro effect (neutralisation) of concizumab in dilute PT clot assay (dPT) in animal and human plasma	Mouse, rat, guinea pig, rabbit, dog, cynomolgus monkey, pig, human plasma	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209168	4.2.1.1-3
Thromboelastography (TEG) of HzTFPI4F36 in haemophilia A (HA)-like human blood	Human blood	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209169	4.2.1.1-4
Effect of concizumab spiked HA and haemophilia B (HB)-like human blood evaluated by TEG	HA & HB-like human blood	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]100201	4.2.1.1-10
Effect of concizumab spiked in haemophilia-like cynomolgus monkey blood evaluated by TEG	Haemophilia-like cynomolgus monkey blood	*In vitro*	[redacted]	[redacted]091002	4.2.1.1-5
Neutralisation of TFPI inhibition of FXa	Human proteins	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209144	4.2.1.1-6
Neutralisation of TFPI inhibition of FVIIa/TF/FXa	Human proteins	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	210180	4.2.1.1-7

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Neutralisation of TFPI on endothelial cells	ECV304 cells and TNF-α / IL1-β-stimulated HUVECs	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]080802	4.2.1.1-8
Neutralisation of endogenous TFPI in plasma from human, cynomolgus monkey, and rabbit ("Actichrome® TFPI activity assay")	Rabbit, cynomolgus monkey and human plasma	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]100403	4.2.1.1-9
Neutralising TFPI in the presence of various concentrations of rFVIII (thrombin generation and TEG)	Human plasma and human platelets	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]080102	4.2.1.1-11
In vivo pharmacology					
Effect of concizumab on cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]110403/[redacted]110701	4.2.1.1-12
Effect of concizumab on cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]100301	4.2.1.1-13
Effect of 'on-demand' concizumab on cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]090801	4.2.1.1-14
Effect of 'on-demand' concizumab on cuticle bleeding in haemophilic rabbits, dose-response	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]100602	4.2.1.1-15
Effect of concizumab on cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	209164	4.2.1.1-16
Effect of concizumab on cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit	s.c.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]090501	4.2.1.1-17

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
Effect of concizumab in a venous stasis model	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]090201	4.2.1.1-18
A low molecular weight heparin can prevent the pro-coagulant effect of concizumab on local clot formation in a venous injury model in rabbits	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]090802	4.2.1.1-19
Secondary pharmacodynamics					
In vitro pharmacology					
TFPI release from endothelial cells	ECV304 and EAhy 926 cells	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	215093	4.2.1.2-1
Activation of protein C and action of antithrombin in endothelial cells	HUVECs	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	[redacted]100601	4.2.1.2-2
Safety pharmacology					
In vitro safety pharmacology					
In vitro binding to Fc receptors by SPR	Recombinant human proteins	*In vitro*	Novo Nordisk Research Centre China, Novo Nordisk A/S, China	210178	4.2.1.3-1
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)	EA hy926WT and EA hy926AR cell lines and human blood cells	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209148	4.2.1.3-2
Complement fixation assay	Human mouse and rabbit proteins, human plasma and rabbit serum	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209134	4.2.1.3-3
Binding to blood cells	Human blood cells	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	209137	4.2.1.3-4

Type of study	Test system	Method of administration	Testing facility	Study ID	Location in CTD
In vivo safety pharmacology					
Safety pharmacology endpoints included in single-dose escalating dose-range-finding study	Cynomolgus monkey	s.c.	[redacted]	208250 (part of toxicity study)	4.2.3.1-1
Safety pharmacology endpoints included in 13-week toxicology study[a]	Cynomolgus monkey	i.v. and s.c.	[redacted]	209206 (part of toxicity study)	4.2.3.2-2
Safety pharmacology endpoints included in 52-week toxicology study[a]	Cynomolgus monkey	s.c.	[redacted]	213542 (part of toxicity study)	4.2.3.2-4
Pharmacodynamic drug interactions					
Thrombin generation assay in plasma from HA subjects dosed with concizumab (trial NN7415-4310 and -4255) and spiked with rFVIIa or aPCC	Human plasma and proteins	*In vitro*	Novo Nordisk A/S, DK	319076	4.2.1.4-1
Effect of the combination of concizumab and rFVIIa on cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit	i.v.	Novo Nordisk A/S, DK	300077	4.2.1.4-3
Thrombin generation assay in HA or HB plasma with or without concizumab; spiking with rFVIII or rFIX	Human plasma and proteins	*In vitro* and *ex vivo*	Novo Nordisk A/S, DK	321538	4.2.1.4-2

[a]GLP compliance.

2.6.3.2　効力を裏付ける試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
***In vitro* pharmacology**							
Epitope mapping of concizumab	Human proteins	*In vitro*	N/A	N/A	X-ray crystallography identified the epitope of TFPI where the murine antibody TFPI4F36 binds: E10, E11, D12, P13, R17, Y19, T21, Y23, F24, N26, Q28, Q31, C32, E33, R34, K36, L50 Concizumab has the same K2 epitope as TFPI4F36. The description of the epitope and the comparison with the binding surface for FXa on K2 explain the neutralising effect of concizumab.	No	209161
Binding affinity of concizumab to rTFPI from rabbit, cynomolgus monkey and human	Rabbit (New Zealand White [NZW]), cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) and human	*In vitro*	N/A	N/A	Binding affinity was measured by SPR K_D for concizumab to TFPI from Rabbit: 0.22 nM Cynomolgus monkey: 0.06 nM Human: 0.04 nM The results indicate that concizumab binds equally well to TFPI from rabbit, cynomolgus monkey and human.	No	210179

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
Neutralisation of plasma TFPI (dPT assay)	Mouse, rat, guinea pig, rabbit (NZW), dog, cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis)*, pig, and human plasma	*In vitro*	0.02-20 nM	N/A	Concizumab shortened dPT of human plasma (both normal and FVIII-deficient plasma), cynomolgus plasma and rabbit plasma with similar potency as judged by EC_{50} values: Rabbit: 0.49 nM Cynomolgus monkey: 0.44 nM Normal human: 0.56 nM Human FVIII-deficient: 0.62 nM MuTFPI4F36 had no effect on dPT in mouse, rat, dog, and pig plasma, and concizumab had no effect on dPT in guinea pig plasma.	No	209168
TEG in human blood	Human blood with antibody-induced HA	*In vitro*	0.01-50 nM	N/A	Concizumab improved the clotting process (clot time and clot development) in a concentration-dependent manner when spiked in HA-like human blood. EC_{50} values (blood concentrations) were as follows: Clot time (R): 0.36 ± 0.08 nM Maximal thrombus generation (MTG): 0.99 ± 0.31 nM	No	209169

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
TEG in human blood	Human blood with antibody-induced HA and HB	*In vitro*	0.01-50 nM	N/A	Concizumab improved clot time and clot development (MTG) in a concentration-dependent manner when spiked in human blood with induced HA or HB. EC_{50} values (blood concentrations) were as follows: HA: Clot time (R): 0.43 ± 0.14 nM MTG: 2.2 ± 0.70 nM HB: Clot time (R): 0.44± 0.13 nM MTG: 2.6 ± 0.89 nM The data confirm the pro-haemostatic potential of concizumab in HA- and HB-like human blood	No	[redacted]100201
TEG in cynomolgus monkey blood	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis)* blood with antibody-induced HA	*In vitro*	0.01-50 nM	N/A	Concizumab improved the clotting process (clot time and clot development) in a concentration-dependent manner when spiked in HA-like cynomolgus blood. EC50 values (blood concentrations) were as follows: Clot time (R): 0.38 ± 0.09 nM MTG: 0.54 ± 0.26 nM The data confirm species cross-reactivity of concizumab to cynomolgus.	No	[redacted]091002

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
Neutralisation of TFPI inhibition of FXa	Human proteins	*In vitro*	0.24-15 nM	N/A	FXa activity increased with increasing concizumab concentrations demonstrating TFPI neutralisation in a concentration-dependent manner. An EC_{50} value of 0.8 nM for neutralisation of 6 nM TFPI was obtained.	No	209144
Neutralisation of TFPI inhibition of FVIIa/TF/FXa	Human proteins	*In vitro*	0.16-30 nM	N/A	FXa generation was increased with increasing concizumab concentrations demonstrating TFPI neutralisation in a concentration-dependent manner. An EC_{50} of 1.1 nM was found for neutralisation of 1 nM TFPI.	No	210180
Neutralisation of TFPI on endothelial cells measured in FX activation assay after adding FVIIa (5 pM) and FX (50 nM)	Human cell line and primary cells: ECV304 cells and TNFα / IL1β-stimulated HUVECs	*In vitro*	0.04-5 nM (ECV304 cells) or 0.3-20 nM (HUVECs)	N/A	TF/FVIIa-mediated activation of FX activation was stimulated by MuTFPI4F36 and concizumab in a similar, concentration-dependent manner with EC_{50} < 0.5 nM. The data show that concizumab neutralised cell-bound TFPI and abolish its inhibition of TF/FVIIa-mediated FX activation.	No	[redacted]080802
Neutralisation of plasma TFPI ("Actichrome® TFPI activity assay")	Rabbit (NZW), cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis)* and human	*In vitro*	0.63-630 nM	N/A	Addition of concizumab to the plasmas resulted in a concentration-dependent increase in FXa activity. EC_{50} values were estimated to: Rabbit, induced HA: 5.8 nM Cynomolgus monkey: 1.6 nM Human: 6 nM	No	[redacted]100403

Organ systems evaluated	**Species/ strain**	**Method of administration**	**Doses[a] (mg/kg)**	**Gender and no. per group**	**Noteworthy findings**	**GLP compliance**	**Study ID**
Neutralisation of TFPI in the presence of various concentrations of rFVIII analysed by thrombin generation and TEG in FVIII-depleted plasma added phospholipids or platelets	Human plasma and platelets	*In vitro*	Concentrations: MuTFPI4F36: 10 nM rFVIII: 0.005-1 IU/mL	N/A	MuTFPI4F36 increased coagulation in FVIII-depleted plasma in both thrombin generation and TEG to approximately the same level as obtained when FVIII was added to 1 IU/mL. The effect of MuTFPI4F36 was most pronounced and close to normalization in the absence or at low levels of FVIII. Only a relatively minor effect was observed by MuTFPI4F36 at normal FVIII level (1 IU/mL).	No	[redacted]080102
***In vivo* pharmacology**							
Cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	0.125; 0.1875; 0.25; 0.375; 0.5 or 1 mg/kg concizumab or 1 mg/kg isotype control antibody	F/6-8 in each group receiving concizumab; F/12 in the group receiving isotype control antibody	A single dose of concizumab administered 35 min before induction of cuticle bleeding, dose-dependently reduced bleeding time. The ED_{50} was 0.23 mg/kg. No signs of adverse effects, e.g. decrease in platelet numbers, were observed.	No	[redacted]110403/[redacted]110701

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
Cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	1; 2; 4 or 8 mg/kg concizumab or 4 mg/kg isotype control antibody	F/8 in each group receiving concizumab; F/10 in the group receiving isotype control antibody	A single dose of concizumab administered 35 min before induction of cuticle bleeding, dose-dependently reduced bleeding time reaching statistical significance at 8 mg/kg. Blood loss was reduced at all dose levels reaching statistical significance at 4 and 8 mg/kg. No signs of adverse effects, e.g. decrease in platelet numbers, were observed.	No	[redacted]100301
Cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	2 mg/kg concizumab or 2 mg/kg isotype control antibody or 9 mg/kg rFVIIa	F/8	On demand-treatment with concizumab or rFVIIa 5 min after induction of bleeding reduced blood loss significantly. A comparable reduction in bleeding time was observed for concizumab and rFVIIa, although not statistical significant for either compound.	No	[redacted]090801
Cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	0.5; 1; 2 or 4 mg/kg concizumab or 4 mg/kg isotype control antibody	F/7-8 concizu-mab F/9 isotype control antibody	On demand-treatment with 1, 2 or 4 mg/kg concizumab 5 min after induction of bleeding reduced blood loss significantly, while the effect of 0.5 mg/kg concizumab did not reach statistical significance. Bleeding time was reduced significantly at 2 mg/kg concizumab.	No	[redacted]100602

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
BLZ090801Cuticle bleeding in haemophilic rabbits – duration of action	Rabbit (NZW)	i.v.	20 mg/kg concizumab or 20 or 2 mg/kg isotype control antibody	F/24 concizu-mab F/12 isotype control antibody	A single dose of 20 mg/kg concizumab reduced bleeding for at least 7 days, whereas no effect was observed 10 days after dosing. At day 10 after dosing, it was not possible to detect concizumab in plasma. No signs of adverse effects, e.g. decrease in platelet numbers, were observed.	No	209164
Cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit (NZW)	s.c.	10 mg/kg of concizumab or 10 mg/kg isotype control antibody	F/8	Concizumab reduced bleeding time and blood loss significantly when administered 24 hours before induction of bleeding. No signs of adverse effects, e.g. decrease in platelet numbers, were observed.	No	[redacted]090501
Venous stasis model in normal rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	2 mg/kg of concizumab or 2 mg/kg isotype control antibody	F/6 concizu-mab and F/4 control antibody	No significant difference in number of clots and clot size in ligated veins between rabbits receiving concizumab and control antibody. No statistically significant difference in platelet counts, PT, TAT and fibrinogen levels. Histopathological examination: thrombi in 3 of 6 concizumab and 1 of 4 control antibody-treated animals. No clear relationship between clot formation in ligated veins, activation of coagulation system measured in plasma samples and observed thrombi. The observed thrombus formation was considered to be related to the surgical and prolonged anaesthetic procedures, but a relation to treatment cannot be ruled out.	No	[redacted]090201

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
Prevention of procoagulant effect in a venous stasis model in normal rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	2 mg/kg concizumab plus saline or 2 mg/kg isotype control antibody plus saline or 2 mg/kg concizumab plus 500 anti-FXa IU/kg low molecular weight heparin (LMWH)	F/8	Local clot formation was significantly increased with concizumab when compared to the control antibody. When the administration of concizumab was followed by injection of LMWH before the crush injury, the local clot formation was completely prevented. No relevant changes in the measured coagulation parameters were observed.	No	[redacted]090802

[a]Single dose unless specified otherwise. For *in vitro* studies, concentration of concizumab is given where applicable.

2.6.3.3 副次的薬理試験

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
***In vitro* pharmacology**							
TFPI release from endothelial cells	Human cell lines ECV304 and EAhy 926	*In vitro*	10 and 100 nM concizumab or control antibodies (EAhy 926 cells), or 10; 100 and 1000 nM concizumab or control antibodies (ECV304 cells). 5 U/mL heparin	N/A	Treatment of cells with concizumab (10 or 100 nM) did not cause any significant release of TFPI. Concizumab at 1000 nM induced a significant 2-fold increased release of TFPI in ECV304 cells. This effect was smaller than the TFPI release caused by heparin or an anti-TFPI Kunitz 3-domain antibody.	No	215093
Activation of protein C and inhibition of thrombin by antithrombin on endothelial cells	Human primary cells: HUVECs	*In vitro*	50 µg/mL (0.3 mM) and 250 µg/mL (1.7 mM) concizumab	N/A	Concizumab bound TFPI expressed on HUVECs with a KD of 0.42 nM. At 50 and 250 µg/mL concizumab, all TFPI was saturated with concizumab. Concizumab did not affect thrombin-mediated protein C activation or antithrombin inhibition of thrombin.	No	[redacted]100601

[a]Concentration of concizumab is given.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test article: concizumab

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
***In vitro* safety pharmacology**							
In vitro binding to Fc receptors by SPR	Human proteins	*In vitro*	N/A	N/A	FcγRI bound to immobilised concizumab with a K_D of 2 nM, and FcRn, FcγRIIa (131R and 131H variants). FcγRIIb, and FcγRIIIa (158V variant) had K_D values of 0.4 – 1.7 µM, while only weak binding of FcγRIIIa (158F variant) was observed. Similar affinities were obtained for the human IgG4 control antibody.	No	210178
Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)	Human blood cells and human endothelial cells	*In vitro*	0.64 ng/mL to 250 µg/mL	N/A	Concizumab did not induce ADCC in either TFPI expressing EA hy926WT cells or in TNF-α stimulated HUVEC *in vitro*.	No	209148
Complement fixation assay	Human proteins	*In vitro*	N/A	N/A	Concizumab in complex with TFPI did not cause any binding of the C4 component of the complement system and will therefore not activate the complement system.	No	209134
Binding to blood cells	Human blood cells	*In vitro*	6 pg/mL to 300 µg/mL	N/A	No binding of concizumab to any peripheral blood cell subset at concentrations up to 300 µg/mL was observed.	No	209137

Organ systems evaluated	Species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
***In vivo* safety pharmacology**							
Cytokine measurement, urinalysis, CNS, respiratory and cardiovascular function – integrated part of single-dose escalating dose-range-finding study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c.	2/20/80 20/80/160 80/160/200	M/1 + F/1	All cytokine levels measured (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IFN-γ) were low. No changes in urinalysis, CNS function (general behaviour and activity), respiratory or cardio-vascular system (blood pressure and ECG) were observed.	No	208250
Cytokine measurement, urinalysis, CNS, respiratory and cardiovascular function – integrated part of 13-week toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (daily) i.v. (weekly)	0, 1, 10, 50 200	M/5 + F/5	All cytokine levels measured (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α, IFN-γ) were low. No changes in urinalysis, CNS function (general behaviour and activity), respiratory or cardio-vascular system (blood pressure and ECG) were observed.	Yes	209206
Urinalysis and ECG – integrated part of 52-week toxicity study	Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)	s.c. (daily)	0, 0.5, 1, 9	ECG: M/5 + F/5 (0 mg/kg/day: M/3 + F/3) Urinalysis: 0, 0.5, 1 mg/kg/day: M/9 + F/9 9 mg/kg/day: M/13 + F/13	No overall test item-related effects on urinalysis or ECG were observed.	Yes	213542

[a]For *in vitro* studies, concentration of concizumab is given where applicable.

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用

Study type	Test system or species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
In vitro and *ex vivo* thrombin generation	HA plasma pool and patient plasma from trials 4310 and 4255.	*In vitro* and *ex vivo*	*In vitro*: Concizumab: 1, 3, 10, 30 or 100 nM Alone or spiked with rFVIIa: 25 or 75 nM (~90 and 270 mg/kg) or FEIBA®: 0.5 or 1 U/mL. *Ex vivo*: Plasma samples spiked with FEIBA®: 0.25; 0.5 or 1 U/mL or with rFVIIa: 25 nM (~90 mg/kg) or 75nM (~270 mg/kg).		Addition of rFVIIa or FEIBA® to HA plasma with or without inhibitors increased thrombin peak both in the absence or presence of concizumab. Thrombin peak remained within the 100% FVIII range when 25 or 75 nM rFVIIa or 0.5 U/mL FEIBA® was added to a HA plasma pool where concizumab was added at a clinically relevant concentration. Increasing concizumab from 10 nM to 30 and 100 nM had no or only limited further effect on the thrombin peak. In plasma from subjects dosed with concizumab (explorer™4 and explorer™5) addition of rFVIIa resulted in an increased thrombin peak within or only modestly above the 100% FVIII range. Addition of FEIBA® to concizumab-containing samples resulted in a thrombin peak substantially above the 100% FVIII level for some, but not all, subjects, in particular on the highest concentration (1 U/mL). The effects of concizumab and rFVIIa or aPCC were mainly additive accounting for ≥60% of the total observed effect.	No	319076

Study type	Test system or species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
Cuticle bleeding in haemophilic rabbits	Rabbit (NZW)	i.v.	BLz120302: 2 mg/kg concizumab/isotype control antibody and 0 or 9 mg/kg rFVIIa BLz120304: 1 mg/kg concizumab/isotype control antibody and 0 or 9 mg/kg rFVIIa BLz120601: 0.25 mg/kg concizumab/isotype control antibody and 0 or 1 mg/kg rFVIIa BLz120901: 2 mg/kg concizumab/isotype control antibody and 0, 1, 3 or 9 mg/kg rFVIIa	F/8 F/8 F/6, 7 or 8 F/8	The four studies on the effect of rFVIIa and concizumab on cuticle bleeding in rabbits with antibody-induced haemophilia demonstrated that the presence of concizumab did not influence the effect of rFVIIa. Furthermore, no signs of adverse effects, e.g. decrease in platelet counts, were observed in during the one-hour post-dosing observation period.	No	300077

Study type	Test system or species/ strain	Method of administration	Doses[a] (mg/kg)	Gender and no. per group	Noteworthy findings	GLP compliance	Study ID
In vitro and *ex vivo* thrombin generation	HA and HB plasma pools and patient plasma from Trial 4255	*In vitro* and *ex vivo*	*In vitro*: Concizumab: 10, 30 or 100 nM Alone or spiked together with rFVIII or rFIX: 0.25; 0.5 or 1 IU/mL. *Ex vivo*: Plasma samples spiked with 0.5; 1 or 1.5 IU/mL rFVIII	N/A	rFVIII and rFIX increased thrombin peak in HA and HB plasma, respectively, both in the absence and presence of concizumab. The concentration-response curves obtained by rFVIII or rFIX had increased thrombin peak levels in the presence of concizumab relative to the levels in the absence of concizumab. The effect of rFVIII and concizumab were mainly additive accounting for ≥78% of the observed effect of spiking both rFVIII and concizumab into a HA plasma pool and to all the observed effect when rFVIII was spiked into patient plasma. For rFIX spiked into a HB plasma pool, the additive effects of concizumab and rFIX were for the highest concentrations greater than the total observed effect, reflecting an up to 10% negative drug-drug interaction.	No	321538

[a]Single dose unless specified otherwise. For *in vitro* studies, concentration of concizumab is given where applicable.